

Aneka Kļaviņa

ORCID 0000-0001-9392-5819

Sapropēja izpēte un tā integrācija
bioaktīvos hidrogelos ar
nātrija karboksimetilcelulozi:
īpašību analīze un praktiskais potenciāls

Promocijas darba kopsavilkums zinātnes doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – medicīnas bāzes zinātnes, tai skaitā farmācija

Apakšnozare – zāļu formu tehnoloģija

Rīga, 2026

Promocijas darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātes Darba drošības un vides veselības institūta Higiēnas un arodslimības laboratorijā un Farmācijas fakultātē, Latvijā

Promocijas darba vadītājas:

Dr. sc. ing. vadošā pētniece **Ilona Pavlovskā**,
Rīgas Stradiņa universitātes Darba drošības un vides veselības institūts,
Higiēnas un arodslimību laboratorija, Latvija

Dr. pharm. asociētā profesore **Baiba Mauriņa**,
Rīgas Stradiņa universitātes Farmācijas fakultāte, Latvija

Zinātniskā konsultante:

Dr. med. vadošā pētniece **Inese Mārtiņšone**,
Rīgas Stradiņa universitātes Darba drošības un vides veselības institūts,
Higiēnas un arodslimību laboratorija, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Ph.D. docente **Inga Sīle**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. chem. docente **Inese Mieriņa**,
Rīgas Tehniskā universitāte, Latvija

Ph.D. profesore **Jurga Bernatoniene**,
Lietuvas Veselības zinātņu universitāte

Promocijas darbs tiks aizstāvēts Medicīnas bāzes zinātņu, tai skaitā farmācijas promocijas padomes atklātajā sēdē 2026. gada 22. janvārī plkst. 14.00 204. telpā, Konsula ielā 21, Rīgas Stradiņa universitātē

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU tīmekļa vietnē:
<https://www.rsu.lv/promocijas-darbi>

NACIONĀLAIS
ATTĪSTĪBAS
PLĀNS 2020



EIROPAS SAVIENĪBA
Eiropas Sociālais
fonds

I E G U L D Ī J U M S T A V Ā N Ā K O T N Ē

Darbs ir izstrādāts, pateicoties ES projekta
“Medicīnā izmantojamo dūņu īpašību izpēte un rūpnieciskās ieguves metodoloģijas izstrāde”
(projekts Nr. 1.1.1.1/16/A/165) finansējumam.

Darbs ir izstrādāts, pateicoties projekta Nr. 8.2.2.0/20/I/004
“Atbalsts doktorantu iesaistei zinātniski pētnieciskajā un studiju darbā” līdzfinansējumam.

Promocijas padomes sekretārs:

Dr. pharm. docents **Konstantīns Logviss**

Satura rādītājs

Darbā izmantotie saīsinājumi	4
Ievads	5
Darba mērķis.....	6
Darba uzdevumi.....	6
Darba hipotēze.....	7
Darba novitāte.....	7
Sapropelis: veselības un skaistuma resurss	8
Sapropēļa atradņu ģeoloģiskais un bioloģiskais profils	10
Sapropēļa bioloģiski aktīvo vielu ekstrakcija un analīze	14
Hidrogels ar sapropēļa ekstraktu: pagatavošana un stabilitāte	19
Secinājumi	22
Priekšlikumi	23
Publikāciju, ziņojumu un patentu saraksts par promocijas darba tēmu.....	24
Literatūras un avotu saraksts	25

Darbā izmantotie saīsinājumi

AS	Antioksidanta statuss (<i>Total antioxidant status</i>)
BALB/c 3T3	Peļu fibroblastu šūnu līnija, kas tika izveidota 1968. gadā
CMC	Karboksimetilceluloze
CMC-Na	Karboksimetilcelulozes nātrijs sāls
DDT/DDE	Dihlordifeniltrihioretāns/dihlordifenildihloretilēns
FS	Fulvīnskābe
HaCaT	Spontāni imortalizēta cilvēka keratinocītu šūnu līnija
HMS	Himatomelānskābe
HS	Humīnskābe
HV	Humusvielas
ISO	Starptautiskā standartizācijas organizācija
KVV	Koloniju veidojošās vienības
LOI	Zudumi pēc izkarsēšanas (<i>Loss-on-ignition</i>)
NRU	Neitrālās sarkanās krāsvielas uzņemšanas citotoksicitātes tests
SCCS	Patērētāju drošības zinātniskā komiteja (<i>The Scientific Committee on Consumer Safety</i>)
UV	Ultravioletā gaisma

Ievads

Cilvēka centieni saglabāt veselību, uzlabot fizisko izskatu, vairot skaistumu un cīnīties ar slimībām ir nemainīgi cauri gadsimtiem. Jau 5. gadsimtā p.m.ē. sengrieķu domātāji, tostarp Hērodots un Hipokrats, aizsāka raksturot minerālūdeņu un sālsūdens terapeitisko izmantojumu, kas vēlāk kļuva par pamatu balneoloģijas attīstībai. 19. gadsimtā, pateicoties angļu ārstam Dž. Karijam (no angļu val. *J. Currie*) un austriešu ārstam V. Prīsnicam (*V. Priessnitz*), radās balneoloģija – zinātnes nozare, kas pēta minerālūdeņu, termālo ūdeņu un dūņu izmantošanu veselības uzlabošanai un slimību ārstēšanai.

Laika posmā no 17. līdz 19. gadsimtam dūņu terapija guva plašu popularitāti visā Eiropā, veicinot balneoloģisko klīniku izveidi vairākās valstīs. H. Rauta (*H. Routh*) pārskatā (Routh, 1996) aprakstīta virkne eksperimentu un pētījumu, ko veikuši dažādi zinātnieki, lai izpētītu peloīdu, dūņu un minerālūdeņu terapeitisko potenciālu. Šajos pētījumos uzmanība koncentrēta uz faktoru ietekmes novērtēšanu. F. Veniale (*F. Veniale*) savā pārskata rakstā par termālajām dūņām (Veniale et al., 2007) konstatē, ka būtiska nozīme ārstēšanas efektivitātē ir temperatūras svārstībām lietošanas laikā, procedūras ilgumam un ķīmiskajam sastāvam, īpaši sēra un slāpekļa oksīdu koncentrācijai dūņās. Abos pārskatos tiek uzsvērts, ka eksperimentu mērķis bija pilnveidot dūņu un minerālūdeņu terapijas lietojumu, lai sasniegtu optimālu terapeitisko efektu. Dūņu preparāti tajā laikā guva popularitāti arī kosmetoloģijā un estētiskajā ķirurģijā, kur tie tika izmantoti ādas reģenerācijas paātrināšanai. 20. gadsimta sākumā balneoloģijas apakšnozare hidroterapija tika apvienota ar citām ārstniecības metodēm, piemēram, masāžu, fizioterapiju un fiziskām aktivitātēm, kas izrādījās efektīvas dažādu balsta un kustību aparāta slimību ārstēšanā, tai skaitā osteoartrīta, fibromialģijas, spondilozes ārstēšanā.

Lai gan dūņām, minerālūdeņiem un peloīdiem, tostarp sapropelim, ir sena vēsture, zinātniski pamatoti pierādījumi par to efektivitāti joprojām ir aktīva pētniecības joma. Pieaugoša interese par nemedikamentozām ārstēšanas metodēm ir aktualizējusi nepieciešamību pēc rezultātiem, balstītiem uz pierādījumiem, kas apliecinātu sapropeļa pozitīvo ietekmi uz veselību, veicinot tā drošu un efektīvu izmantošanu medicīnā un kosmētikā. Tādējādi sapropeļa lietojums veselības aprūpē un medicīniskajā kosmētikā varētu tikt būtiski paplašināts.

Lai arī sapropelis var šķist noslēpumaina viela, kas slēpjas ezeru, jūru un purvu dzīlēs, tas ir vērtīgs materiāls ar senām tradīcijām veselības uzlabošanā un ārstēšanā. Latvijas ezeru gultnēs bieži sastopamais sapropelis ir smalkgraudains nogulums, kas ir bagāts ar organiskām vielām. Tas veidojas sedimentācijas un biotransformācijas rezultātā, kad sadalās ūdensaugi un dažādi ūdenī mītoši organismi, apvienojoties ar minerāldaļiņām.

Viena no vērtīgākajām sapropeļa īpašībām ir augstais humusvielu (HV) saturs, īpaši humīnskābe (HS) un fulvīnskābe (FS). Tiek uzskatīts, ka šīs skābes ir atbildīgas par daudziem sapropeļa veselību veicinošajiem efektiem, tostarp antioksidantu, pretiekaisuma un antibakteriālo iedarbību. Latvijas saldūdens sapropelis ir īpaši interesants tieši augstās HS un FS koncentrācijas dēļ, kas liecina par tā potenciālu farmaceitisko un kosmētisko produktu izstrādē.

Tradicionāli sapropeli terapeitiski izmanto termālajās dūņu vannās un tieši uzklājot uz ādas. Tipiska dūņu vanna ietver 1 kg sapropeļa uz 10 litriem ūdens, dūņu vannas temperatūra ir 37 °C, procedūra ilgst no 15 līdz 20 minūtēm. Šī metode ir devusi pozitīvus rezultātus ādas slimību, piemēram, ekzēmas un dermatīta, kā arī plaukstu osteoartrīta ārstēšanā. Tomēr tradicionālās sapropeļa lietošanas metodes bieži prasa lielu sapropeļa daudzumu, specializētus uzglabāšanas apstākļus, kā arī sapropeļa notīrīšanu no ādas un telpas iztīrīšanu, kas bieži ir darbietilpīga un neērta un apgrūtina terapijas īstenošanu pacientam ērtākā vidē, piemēram, mājās. Tas ierobežo ārstēšanas pieejamību, koncentrējot to tikai ārstniecības centros, klīnikās vai sanatorijās, kas ne vienmēr var būt pieejams visiem pacientiem.

Šie izaicinājumi norāda uz nepieciešamību pēc alternatīvām, pacientam draudzīgām sapropeļa piegādes formām, īpaši tā bioaktīvo komponentu HS un FS nodrošināšanai. Viens no potenciālajiem risinājumiem ir stabils, ūdenī šķīstošu hidrogelu izstrāde ar sapropeļa ekstraktiem. Šādas zāļu formas varētu padarīt terapeitisko lietojumu vienkāršāku un pacientiem pieejamāku, veicinot sapropeļa integrāciju mūsdienu medicīnas un kosmētikas produktos.

Darba mērķis

Izpētīt sapropeļa un tā ekstraktu iestrādes iespējas karboksimetilcelulozi (CMC) saturošos hidrogelos, nodrošinot bioloģiskas izcelsmes materiālu inovatīvu izmantošanu ārstniecībā.

Darba uzdevumi

Promocijas darba mērķa sasniegšanai izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Iegūt un analizēt informāciju par Latvijas sapropeļa resursiem, tostarp ieguves metodes, juridiskos aspektus dabas resursu izmantošanā un potenciālās lietošanas jomas.
2. Veikt sapropeļa kvalitātes novērtējumu, nosakot piemaisījumus, potenciālos piesārņotājus: smagos metālus, pesticīdus.
3. Izvērtēt sapropeļa ekstraktu iegūšanas metodes un novērtēt to potenciālās terapeitiskās īpašības.
4. Izveidot karboksimetilcelulozes nātrija sāls (CMC-Na) hidrogelu ar sapropeli.

5. Pārbaudīt radīto hidrogelu stabilitāti.
6. Veikt fizikāli ķīmiskās un stabilitātes pārbaudes iegūtajiem hidrogeliem un novērtēt to praktisko lietojamību medicīnā un farmācijā.

Darba hipotēze

Sapropēja ekstrakts ir saderīgs ar karboksimetilcelulozes hidrogelu, palielinot tā potenciālo lietojumu zāļu formās.

Darba novitāte

Promocijas darbā piedāvāta jauna pieeja Latvijas sapropēja izmantošanai biomedicīnā, integrējot to ūdenī šķīstošā hidrogela sistēmā, kas ir balstīta uz karboksimetilcelulozes nātrija sāli. Šī metode ļauj kontrolētā veidā koncentrēt sapropēja bioaktīvās sastāvdaļas, potenciāli pārvarot tradicionālās dūņu terapijas ierobežojumus. Pētījums sniedz jaunas zināšanas par sapropēja ķīmisko sastāvu, drošumu un terapeitisko potenciālu, kā arī piedāvā zinātniski pamatotus rezultātus tā iekļaušanai inovatīvos medicīnas un kosmētikas līdzekļos. Papildus promocijas darbā tika izstrādāti un analizēti jauni karboksimetilcelulozi saturoši hidrogelu sastāvi, izvērtējot to stabilitāti un piemērotību medicīniskai lietošanai.

Sapropelis: veselības un skaistuma resurss

Sapropelis ir ezerdobes pamatnē vai jūras baseinos ilgākā laika periodā bioķīmisku un fizikālu pārvērtību rezultātā veidojušies organiskie nogulumi, kas uzkrājas, nogulsņējoties un pārveidojoties mirušajiem ūdensaugiem, fitoplanktonam un zooplanktonam, augstāko augu putekšņiem un sporu atliekām, sajaucoties kopā ar minerāldaļiņām. Sapropelis ir sastopams lielākajā daļā Latvijas ezeru, arī daudzos purvos zem kūdras slāņa. No kūdras sapropelis atšķiras ar smalku struktūru, vides reakciju, organisko vielu daudzumu un tā veidotājorganismiem, kā arī humusvielu daudzumu (Stankevica et al., 2016; Stankevica & Klavins, 2014; Vanadziņš et al., 2022).

Dažāda veida dūņas, t. sk. sapropelis, tika plaši lietotas daudzus gadsimtus – gan lauksaimniecībā, gan tautas medicīnā, kur dziedniecības vajadzībām tās izmantotas jau pirms simtiem gadu. Dūņu terapija jeb peloidoterapija bija populāra jau Senajā Ēģiptē, Grieķijā, Itālijā, Turcijā u. c. Eiropas valstīs (Veniale et al., 2007). Tradicionāli sapropeli uzklāj tieši uz ādas, izmantojot termiskās dubļu vannas. Dūņu terapijas ir uzrādījušas pozitīvus rezultātus ādas slimību, piemēram, ekzēmas un dermatīta, ārstēšanā, kā arī labvēlīgi ietekmē muskuļu tonusu un palielina locītavu kustību amplitūdu. Kakla osteohondrozes slimniekiem peloidoterapija palīdz, reflektori iedarbojoties uz intrakraniālo asinsriti, mazina venozo stāzi un veicina asins apgādi (Bellometti et al., 1996, 2000). Tomēr tradicionālajām lietošanas metodēm ir nepieciešamas specializētas iekārtas un liels materiāla daudzums, kas ierobežo to pieejamību pacientiem. Nepieciešamas lietotājam draudzīgākas sapropeļa bioloģiski aktīvo komponentu piegādes sistēmas (Fioravanti et al., 2014; Fortunati et al., 2016; Vanadziņš et al., 2022; Veniale et al., 2007).

Sapropeļa daudzfunkcionālā ietekme uz organismu ir saistāma ar tā sarežģīto ķīmisko un bioloģisko struktūru. Sapropeļa nogulumi ir bagāti ar humusvielām (HV). Humusvielas var veidoties dažādās vidēs, un šādām humusvielām ir autohtona izcelsme, vai arī tās var tikt ienestas no saistītām vidēm (alohtonā izcelsme), piemēram, augsnes humusvielām ieskalojoties virszemes vai pazemes ūdeņos. Humusvielas iedala četrās frakcijās, pamatojoties uz šķīdību: humīnskābe (HS), himatomelānskābe (HMS), fulvīnskābe (FS) un humīns (Klavina et al., 2019; 2020). Sapropeļa nogulumos ir arī plašs vitamīnu klāsts. Sapropelis galvenokārt satur ūdenī šķīstošus vitamīnus, piemēram, askorbīnskābi (C), B grupas vitamīnus – tiamīnu (B1), riboflavīnu (B2), pantotēnskābi (B5), piridoksīnu (B6), folskābi (B9) un ciānokobalamīnu (B12), kā arī taukos šķīstošus vitamīnus, piemēram, D vitamīnu un tokoferolu (E vitamīnu). Sapropelī sastopamais baktēriju un zilganzaļo aļģu radītais B12 vitamīns ieņem svarīgu lomu aminoskābju vielmaiņā un nukleīnskābju sintēzē ādas dziļākajos slāņos (Kļaviņa et al., 2024; Luhila et al., 2022; Pavlovskā et al., 2020; Vanadziņš et al., 2022).

Bez humusvielām sapropelis satur arī dažādus ogļhidrātus, aminoskābes, lipīdus (piemēram, ogļūdeņražus, karbonskābes, esterus, steroīdus) un olbaltumvielas, kurām visām piemīt bioloģiska aktivitāte, bet to koncentrācija ir relatīvi maza salīdzinājumā ar humusvielām (Stankevica et al., 2016; Stankevica & Klavins, 2014). Sapropeļi satur ļoti daudz mikroorganismu, kas var izdalīt antibiotiskas vielas, kuras ir antagoniskas virknei patogēnu saprofītisku mikroorganismu, šīs īpašības var palīdzēt sadziedēt brūces, mazināt iekaisumu un ādas infekcijas (Carretero, 2020a, 2020b; Fernández-González et al., 2017; Gomes et al., 2013).

Sapropeļim piemīt dažādas ārstnieciskas īpašības. Izmantojot sapropeli dūņu terapijā, cilvēka organismā notiek fizioloģiski terapeitisks efekts – vienlaicīgi termiskā, ķīmiskā un mehāniskā iedarbība. Siltuma ietekmē paplašinās asinsvadi un paātrinās asinsrite. Audi un šūnas saņem vairāk skābekļa un barības vielu, ātrāk tiek aiznesti vielmaiņas starpprodukti un galaprodukti. Mazinās muskuļu plastiskums un samazinās sāpes (Centini et al., 2015; Fioravanti et al., 2014; Gerencser et al., 2010; Glavas et al., 2017; Odabasi et al., 2007). Sapropeļa smalkā un koloidālā struktūra veicina bioaktīvo komponentu, piemēram, humusvielu, vitamīnu un aminoskābju, iekļūšanu ādā un dziļākos audos, radot terapeitisku efektu šūnu līmenī (Kļaviņa et al., 2024; Vanadziņš et al., 2022; Veniale et al., 2007). Humīnskābes un fulvīnskābes kopā ar polifenoliem pasargā šūnas no brīvo skābekļa radikāļu bojājumiem šūnu līmenī, tādējādi novēršot hroniskas slimības, mazinot iekaisumu un palēninot novecošanās procesu. Klīniskie pētījumi liecina, ka sapropelis var veicināt vielmaiņas un imūnsistēmas darbību, svešķermeņu iekapsulēšanu, brūču sadzīšanu un audu reģenerāciju un iedarbojas desensibilizējoši. Sapropeļi stimulē fagocītu aktivitāti, kuru darbības rezultātā notiek intensīva audu reģenerācija (Bellometti et al., 1996; 2000; 2002).

Kopumā sapropelis var uzlabot ādas struktūru, mazināt grumbas, stiprināt nagus un matus, kā arī normalizēt ādas dziedzeru sekrēciju, samazinot psoriāzes, ekzēmas un piņņu radīto kairinājumu. Neskatoties uz tā potenciālu, sapropeļa, it īpaši Latvijas sapropeļa, ārstnieciskās īpašības nav pietiekami pētītas, izmantojot mūsdienīgas zinātniskās metodes, kā rezultātā nepieciešama uz pierādījumiem balstītā sapropeļa iegūšanas un izmantošanas standartizācija. Kā arī sapropeļa neviendabīgums un variācijas atkarībā no tā izcelsmes un ieguves parametriem apgrūtina universālu standarta procedūru izstrādi tā izmantošanai medicīnā (Pavlovskā et al., 2020; Vanadziņš et al., 2022). Lai risinātu šīs problēmas, promocijas darbā pētīta stabila hidrogelu izstrāde, kur tiek iestrādāts sapropeļa ekstrakts. Hidrogels ar sapropeļa ekstraktu risinātu tradicionālās dūņu terapijas ierobežojumus, padarot terapiju vieglāk lietojamu, ērtāku un pieejamāku pacientiem.

Sapropela atradņu ģeoloģiskais un bioloģiskais profils

Sapropelis ir daļēji atjaunojams zemes dziļu resurss; to veido sīkgraudaini un irdeni kontinentālo ūdeņu nogulumi ar organiskajām vielām, tā veidošanās ātrums svārstās no 0,1 līdz 6,6 mm gadā. To bieži raksturo kā želejveida vai pastveida nogulumus, kuru krāsa ir no gaiši pelēkas, rozā, brūnas, brūnganas olīvas vai zaļgandzeltenas līdz gandrīz melnai atkarībā no organisko vielu un minerālvielu daudzuma tajā (Stankevica et al., 2016; Stankevica & Klavins, 2014). Latvijas kopējais sapropela krājums tiek lēsts ap 700 milj. m³, ievērojamas atradnes sastopamas Latgales reģionā, īpaši Rēzeknes, Preiļu un Daugavpils novadā (Obuka et al., 2018; Stankevica & Klavins, 2014).

Sapropelim ir četri galvenie veidi – organiskais, silikātus saturošais, karbonātu un jaukta tipa sapropelis – ar vairākiem apakštipiem, piemēram, kūdrainais, kramaļģu, kaļķainais, dzelzi saturošais un citi veidi. Galveno tipu nosaka pēc organisko un minerālvielu daudzuma un sapropela pelnainības. Organisko vielu saturs ezeros var ievērojami atšķirties – no 15 līdz 85 %. Sapropeli var klasificēt arī pēc tā izcelsmes – jūras ūdens sapropelis, saldūdens sapropelis vai kūdras sapropelis. Vispārpieņemtas klasifikācijas visiem sapropela veidiem nepastāv, bet tiek izmantots dažādu klasifikāciju apvienojums (Pavlovskā et al., 2020; Vanadziņš et al., 2022).

Latvijas tiesiskais regulējums nosaka, ka sapropela ieguvei ir jāseko dabas resursu efektīvai un ilgtspējīgai izmantošanai un vienlaicīgi ir jācenšas samazināt negatīvo ietekmi uz vidi un sabiedrību, kas varētu rasties sapropela ieguves laikā. Likumdošanas ievērošana ir būtiska ikvienam sapropela ieguves vietas īpašniekam, kas vēlas Latvijas teritorijā iegūt sapropeli. Ir svarīgi uzraudzīt un pārbaudīt sapropela ieguves vietas, lai novērtētu piesārņojuma līmeni un antropogēnās darbības ietekmi uz vidi. Sapropela nogulumi, pateicoties to struktūrai, darbojas arī kā piesārņojuma rezervuārs un ir neatņemama ūdens ekosistēmas sastāvdaļa (Environmental Protection Law, 2006; Pavlovskā et al., 2020). Ieguves vietās jāņem vērā arī virszemes ūdeņu kvalitāte un jāievēro likums “par zemes dziļēm”, kurā uzsvērta šo resursu racionāla un videi draudzīga izmantošana (Environmental Protection Law, 2006; On Environmental Impact Assessment, 1998). Tomēr Latvijas likumdošanā nav skaidri noteikti mehānismi šo normatīvo aktu piemērošanai vai sodi par to neievērošanu. Būtu nepieciešami turpmāki likumdošanas un juridiska tipa pētījumi, kuri skaidrotu sapropela ieguves tiesiskos aspektus un sodu piemērošanas metodiku (Pavlovskā et al., 2020).

Sapropela nogulumu paraugi tika iegūti no pieciem ezeriem Austrumlatvijā. Ezeru izvēle tika veikta, izmantojot Latvijas ezeru datubāzi (Latvian lakes database: ezeri.lv), kas ietver oficiālo Latvijas ezeru ģeoloģisko izpēti. Ezeru izvēlei tika ņemti vērā šādi faktori: sapropela nogulumu dziļums, ezeru koordinātas un vēsturiskās lauksaimniecības darbības ezeru

tuvumā. Paraugi tika ņemti no šādiem Latgales reģiona ezeriem – Audzeļu ezera, Dūnakļu ezera, Ivušku ezera, Zeiļu ezera un Mazā Kivdaloņas ezera (Pavlovskā et al., 2020).

Sapropela ieguve tika veikta ziemas periodā, kad ezeru virsma bija salusi. Pirms paraugu iegūšanas tika noteikts atbilstošā nogulumu slāņa biezums un dziļums katrā ezerā. Sapropela noguluma paraugi tika iegūti vairākos koordinātu punktos ezerā. Lai raksturotu sapropela nogulumus, paraugi tika ņemti no trim dažādiem dziļumiem katrā ieguves vietā un līdz pat vienpadsmit punktiem katrā ezerā. Kopumā katram ezeram tika iegūts 21 nogulumu paraugs, kas rezultējās ar 105 individuāliem paraugiem (Klavina et al., 2019; Pavlovskā et al., 2020; Vanadziņš et al., 2022). Pētījumā tika noskaidrots, ka balneoloģiski izmantojamais sapropela slānis atrodas 2,0–9,0 metru dziļumā no nogulumu virsmas. Precīzs dziļums atkarīgs no ezera un nogulumu iegūšanas vietas tajā; ja dziļums ir mazāks par 1,5 metriem no nogulumu virsmas, sapropela nogulumi nav pilnībā izveidojušies, šādi nogulumi turpmāk pētījumā netika izmantoti (Pavlovskā et al., 2020).

Visi sapropela paraugi tika uzglabāti slēgtos neitrālos plastmasas konteineros bez skābekļa klātbūtnes, lai novērstu oksidāciju un aktīvo komponentu degradāciju. Nogulumi tika turēti 4 °C temperatūrā aukstuma kamerā, kas atspoguļo dabisko ūdens temperatūru ezeru dibenā visu cauru gadu. Šādos apstākļos paraugi tika uzglabāti no 4 līdz 8 mēnešiem, kamēr tika veiktas analīzes un bioloģiski aktīvo vielu ekstrakcija (Klavina et al., 2020; Pavlovskā et al., 2020; Vanadzins et al., 2020b).

Sapropelim tika izstrādāti kvalitātes kritēriji, nodrošinot tā piemērotību terapeitiskai lietošanai: organoleptiskais novērtējums, fizikāli ķīmiskā nogulumu testēšana, nogulumu piesārņojuma parametru novērtēšana un mikrobioloģiskā testēšana. Organoleptiskais novērtējums ietver krāsas, konsistences un smaržas novērtēšanu (Pavlovskā et al., 2020; Vanadzins et al., 2020b). Paraugu krāsu organoleptiskā pārbaude atklāja, ka sapropela krāsa svārstās no zaļgani dzeltenas līdz melnai. Zaļgani dzeltenā krāsa norāda uz augstu silīcija saturu, bet melns sapropelis ir bagāts ar organiskajām vielām un sastopams ezeros ar zemu minerālvielu saturu, bet augstāku humusvielu daudzumu. Brūnais un tumši zaļais sapropelis ir jaukta tipa un saistīts ar planktonu, augstākajiem augiem vai kūdras slāņu ieslēgumiem. Sapropela nogulumu pH līmenis bija 7–8, kas norāda uz augstu minerālvielu saturu, pH līmenis glabāšanas laikā praktiski nemainījās. Literatūrā norādīts, ka sapropela un tā ekstrakta krāsa norāda uz humifikācijas pakāpi un skābju koncentrāciju, kas apstiprinājās arī šajā pētījumā (Pavlovskā et al., 2020). Paraugu tekstūra bija krēmveidīga līdz blīvi smilšaina un sniedza ieskatu par sapropela nogulumu vecumu un veidošanās ātrumu. Smarža galvenokārt bija neitrāla vai ar sērūdeņraža klātbūtni dažos izpētes punktos. Viens izņēmums bija Audzeļu ezerā,

kur tika konstatēta naftai raksturīga smarža, kas varētu liecināt par antropogēnu piesārņojumu (Klavina et al., 2019; Pavlovska et al., 2020; Vanadzins et al., 2020b).

Sapropēja minerālais un organisko vielu sastāvs tiek novērtēts pēc pelnainības jeb nosakot masas zudumu karsējot (angliski *loss-on ignition*, LOI). Nogulumus, kuros organisko vielu saturs ir vismaz 15 %, definē kā sapropeli. Tas ir viens no pamatkritērijiem, lai atšķirtu sapropeli no citu veidu nogulumiem. Organisko vielu saturs pārbaudītajos Latvijas sapropēja paraugos svārstījās no 20 līdz 90 %, vidēji organisko vielu saturs ezeros bija no 52 līdz 54 %, karbonātu saturs no 4,4 līdz 5,0 %. Lielāks organisko vielu saturs parasti norāda uz lielāku terapeitiskās iedarbības potenciālu (Pavlovska et al., 2020; Vanadziņš et al., 2022).

Visiem 105 sapropēja nogulumu paraugiem tika noteikts smago metālu – svina (Pb), kadmija (Cd), niķeļa (Ni), kobalta (Co) un hroma (Cr) – piesārņojuma līmenis, kas tika salīdzināts ar robežlielumiem, ko noteikusi Patērētāju drošības zinātniskā komiteja (SCCS) (Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), 2021). Smagie metāli tika konstatēti visos paraugos, un nevienā no tiem netika pārsniegtas maksimāli pieļaujamās robežvērtības cilvēka drošībai (Borowska & Brzóska, 2015; The European Pharmacopoeia 11th Edition, 2023; Witkowska et al., 2021). Bažas rada arī pesticīdu, jo īpaši hlororganisko pesticīdu, klātbūtne, jo lauku reģionos šos pesticīdus vēsturiski izmantoja insektu apkarošanā. Sapropelim, kas paredzēts lietošanai medicīnā, jābūt bez pesticīdu atliekām un smago metālu piejaukumiem. Pētījumā tika konstatēts, ka dihlordifeniltrihloretāna (DDT) un tā sadalīšanās produkta līmenis kopumā ir zems, vairākos punktos tas bija zemāks par metodes kvantitatīvās noteikšanas robežu (Pavlovska et al., 2020; Vanadzins et al., 2020b, 2020a; Vanadziņš et al., 2022).

Pēdējais sapropēja kvalitātes rādītājs pirms tā lietošanas medicīnā ir mikrobioloģiskā novērtēšana. Pētījumi rāda, ka ezera sapropeli ir ārkārtīgi daudz mikroorganismu – 1 grams svaiga sapropēja augšējā slānī satur 1–2 miljardus mikroorganismu, kas var ietekmēt drošu sapropēja izmantošanu dūņu terapijā un ietekmēt tā ārstnieciskās īpašības. Sapropelim, kas paredzēts lietošanai medicīnā, jābūt bez patogēniem mikroorganismiem. Lai nodrošinātu tā kvalitāti, izšķiroša nozīme ir konkrētu patogēnu, piemēram, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* un *Staphylococcus aureus*, skrīningam (Pavlovska et al., 2020; Vanadzins et al., 2020b, 2020a).

Testētajos ezeros tika konstatētas deviņas baktēriju sugas. Dūnakļu ezerā tika noteikts augstākais mikroorganismu daudzums – $2,3 \times 10^7$ KVV/g. Ivušku ezerā tika konstatēta zemākā vērtība – $1,1 \times 10^5$ KVV/g. Visbiežāk konstatētās sugas bija *Paenibacillus amylolyticus* un *Aeromonas bestiarum*, no kurām neviena nav pazīstama kā patogēni vai oportūnistiski patogēni. *Paenibacillus amylolyticus*, pateicoties spējai izdalīt antibiotiskās vielas, var pat nodrošināt antibakteriālas īpašības. Enterobaktērija un oportūnistisks patogēns *Serratia fonticola* tomēr

tika konstatēts dažos Zeiļu ezera paraugos, kas varētu liecināt par notekūdeņu ieplūšanu ezerā (Pavlovska et al., 2020; Suraganova et al., 2014).

Kaut arī neapstrādātos sapropeļa paraugos nav konstatēti aktīvi patogēni, koloniju veidojošo vienību (KVV) skaits visos sapropeļa paraugos pārsniedza pieļaujamo robežu, lai sapropeļa nogulumus neapstrādājot varētu izmantot kosmētisko un medicīnisko produktu ražošanai. Balsoties uz SCCS ieteikumiem, pirms sapropeļa lietošanas kosmētikā vai medicīnā ir nepieciešama tā papildu sterilizācija vai konservantu pievienošana, lai samazinātu mikroorganismu kopējo skaitu (Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), 2021; Suraganova et al., 2014; Vanadzins et al., 2020b). Starptautiskās standartizācijas organizācijas (ISO) standarta ISO 21426:2018 D pielikumu un SCCS pamatnostādnes var izmantot kā atsauces, lai novērtētu un nodrošinātu sapropeļa nekaitīgumu lietošanai medicīnā un balneoloģijā, jo īpaši tās vadlīnijas un robežvērtības, kas attiecas uz kosmētisko līdzekļu sastāvdaļu drošuma testēšanu. Šīs vadlīnijas palīdz arī izstrādāt un noteikt sapropeļa ekstrakta drošuma un toksiskuma rādītājus. Vadlīnijas var izmantot kā pamata dokumentu, līdz tiek izveidoti standartizēti sapropeļa nogulumu ekstrakcijas un testēšanas protokoli (Kļaviņa et al., 2024; Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), 2021; Technical Committee: ISO/TC 228, 2018).

Sapropēja bioloģiski aktīvo vielu ekstrakcija un analīze

Lai gan sapropelis satur daudz potenciāli vērtīgu savienojumu, primāro interesi rada humusvielas, īpaši humīnskābe un fulvīnskābe. Humusvielas veidojas sekundārās sintēzes (humifikācijas) rezultātā, satrūdot un transformējoties biomolekulām, kas veidojušās mikroorganismu iedarbībā no atmirušiem organismiem ūdens vidē. Tas nozīmē, ka dzīvu organismu audos HV dabiski neatrodas (Aeschbacher et al., 2012; Dolmaa et al., 2011; Tserenpil et al., 2010).

Humīnskābe (HS), kas ir galvenā sapropēja bioaktīvā sastāvdaļa, ir kompleksa aromātiska poliskābe ar dažādām funkcionālajām grupām, tās molekulmasa ir aptuveni 6500 daltoni. Tā šķīst ūdenī, ja pH līmenis ir neitrāls un bāzisks, bet izgulsnējas skābos apstākļos. HS piemīt spēcīgas antioksidatīvās un terapeitiskās īpašības, tiek uzskatīts, ka tā veicina audu reģenerāciju un samazina iekaisumu, reaģējot ar šūnu sienām un ādas receptoriem. HS veicina arī nervu audu reģenerāciju, stimulē makrofāgu aizsardzību, kā arī tai piemīt pretiekaisuma iedarbība ādas apdegumu un radzenes bojājumu gadījumos. Humīnskābe galvenokārt iedarbojas uz ādas virsmu savas lielā molekulmasas dēļ, kas traucē iekļūšanu zemākajos ādas slāņos. Humīnskābei nav konstatēta toksiska iedarbība, bet lietošanu medicīnā ierobežo tās struktūras izmaiņas (Almeida et al., 2019; Jacob et al., 2019; Jurcsik, 1994; Mirza, Agarwal, et al., 2011; Mirza, Ahmad, et al., 2011; Ozkan et al., 2015; Rensburg van, 2015; Zykova et al., 2018).

Atšķirībā no HS fulvīnskābe (FS) ir gan vāju alifātisko, gan aromātisko skābju maisījums. Fulvīnskābe šķīst ūdenī jebkurā pH līmenī. Fulvīnskābes molekulas ir mazākas par HS molekulām, un to absorbcijas spēja ir ievērojami lielāka, absorbciju pastiprina arī dažādu funkcionālo grupu klātbūtne. Tās mazais molekulas izmērs veicina FS dziļāku iekļūšanu audos, kas potenciāli uzlabo šūnu augšanu un audu reģenerāciju (Aeschbacher et al., 2012; Beer et al., 2000; Canellas et al., 2015; Chunxia et al., 1996; Lamar et al., 2014; Pena-Mendez et al., 2005; Rensburg van, 2015; Winkler & Ghosh, 2018). Tādējādi sapropēja ekstrakts, kas satur gan humīnskābi, gan fulvīnskābi, potenciāli var samazināt ādas iekaisumu, uzlabot ādas struktūru un veicināt komplicētu brūču ātrāku sadzīšanu (Klavina et al., 2019; Kļaviņa et al., 2024).

Sapropēja ekstraktu iegūšanai var izmantot vairākas ekstrakcijas metodes, tostarp cietvielu un šķidrums ekstrakciju ar dažādiem šķīdinātājiem, mikroviļņu ekstrakciju, ultraskaņas ekstrakciju, superkritiskā šķidrums ekstrakciju, paātrinātu šķīdinātāja ekstrakciju un hidrostatiskā spiediena ekstrakciju (Azmir et al., 2013; Hidayah & Abidin, 2017; Klavina et al., 2019, 2020; McDonnell & Tiwari, 2017; Ryzhova et al., 2013; Vinatoru et al., 2017). Visas minētās ekstrakcijas metodes ir pierādījušas efektivitāti dabisko vielu iegūšanā. Tās ļauj kontrolēt ekstrahēto savienojumu daudzumu, pielāgot procesu rūpnieciskiem

apstākļiem, kā arī integrēt papildu attīrīšanas procedūras, kas nodrošina piemaisījumu un potenciāli kaitīgu vielu elimināciju. Šādi optimizēts process ļauj iegūt galaproduktu, kas atbilst farmācijas nozares kvalitātes standartiem (Klavina et al., 2019, 2020). Promocijas darbā konstatēts, ka lielākā daļa sapropeļa nogulumu ekstrakcijas metožu ir piemērotas humīnskābes un fulvīnskābes iegūšanai.

Ķīmiskā ekstrakcija, izmantojot cietvielu un šķidrums ekstrakcijas metodi, ir viena no visbiežāk lietotajām metodēm bioloģiski aktīvo vielu iegūšanai no sapropeļa. Šī metode ietver dažādus neorganiskos un organiskos šķīdinātājus un to maisījumus, kā arī ūdens bāzes šķīdumus ar mainīgu pH līmeni un ir piemērota ekstrakta iegūšanai no svaiga, žāvēta vai liofilizēta sapropeļa nogulumiem. Metode ir tehnoloģiski vienkārša, nodrošina augstu bioloģiski aktīvo vielu ekstrakcijas efektivitāti, tomēr tā var būt laikietilpīga un nepieciešams izmantot lielu daudzumu šķīdinātāju. Ekstrakcijas metodes izvēle ir atkarīga no vairākiem faktoriem, tostarp sapropeļa veida, mērķa, bioloģiski aktīvajām vielām un ekonomiskajiem apsvērumiem (Klavina et al., 2019, 2020; Strus et al., 2021). Neskatoties uz ekstrakcijas metožu efektivitāti, šobrīd nav izstrādāti vienoti un vispārpieņemti standarti bioloģiski aktīvo vielu ekstrakcijai no sapropeļa, kā arī šo ekstraktu analīzei, kas apgrūtina sapropeļa ekstraktu pilnvērtīgu izmantošanu farmācijā un kosmētisko produktu ražošanā (Jarukas et al., 2021; Klavina et al., 2020; Strus et al., 2021).

Šajā pētījumā cietvielu un šķidrums ekstrakcija tika veikta, izmantojot nātrija hidroksīda šķīdumu. Pēc tā pievienošanas sapropeļa suspensijai pH līmenis paaugstinājās no neitrāla līdz pH 10, izraisot šūnu struktūras ķīmisko degradāciju. Maisīšanas rezultātā sārmainais šķīdums vienmērīgi sajaucās ar sapropeli, veidojot koloidālu sistēmu. Pēc centrifugēšanas smilšu daļiņas un nešķīstošie komponenti tika izgulsnēti un filtrēti. Pievienojot skābi, humīnskābe izgulsnējās cietā kristāliskā formā, savukārt fulvīnskābe palika šķīdumā. Ekstrakcijas rezultātā tika iegūti divu veidu ekstrakti: cietā, kristāliskā fāze, kas satur humīnskābi, un šķīdums ar augstu fulvīnskābes koncentrāciju (Klavina et al., 2020).

Izmantojot cietvielu un šķidrums ekstrakcijas metodi, no viena kilograma žāvēta sapropeļa tika iegūti aptuveni 22–28 g humīnskābes un 5–9 g fulvīnskābes. Vislielākā atšķirība starp ezeru sapropeļu paraugiem tika novērota tieši fulvīnskābes koncentrācijā, kur augstākās un zemākās vērtības atšķīrās par vairāk nekā 80 %. Savukārt kopējais organisko vielu daudzums bija relatīvi vienmērīgs, ar mazāk nekā 30 % starpību starp minimālajām un maksimālajām vērtībām. Rezultāti liecina, ka visaugstākā humīnskābes koncentrācija ir Audzeļu ezerā un Mazajā Kivdaloavas ezerā, kas korelē ar zemāku vides pH līmeni un sapropeļa tipu – organiskais sapropelis (Klavina et al., 2019; Vanadzins et al., 2020a).

Atšķirībā no augu ekstraktiem, kuru raksturošanai ir izstrādātas vispārpieņemtas vadlīnijas, sapropeļa ekstraktu analīzei šādu standartu pašlaik nav (The European Pharmacopoeia 11th Edition, 2023). Augu ekstraktu kvalitātes novērtēšanā parasti tiek izmantoti tādi rādītāji kā aktīvo vielu koncentrācija, pH vērtība, vizuālā novērtēšana un izejvielu kvalitāte. Promocijas darba ietvaros sapropeļa ekstraktu raksturošanai tika pielietoti analogi principi, lai nodrošinātu salīdzināmu kvalitātes novērtējumu (Klavina et al., 2019, 2020; Kļaviņa et al., 2024).

Sapropeļa ekstraktu antioksidatīvās īpašības

Sapropeļa ekstraktiem piemīt nozīmīgas antioksidatīvās īpašības, kuras lielā mērā nosaka to augstais polifenolu saturs. Ir konstatēta cieša korelācija starp polifenolu koncentrāciju un kopējo antioksidatīvo statusu (AS) sapropeļa ekstraktos (Kļaviņa et al., 2024), kas norāda uz polifenolu būtisko ieguldījumu šo ekstraktu antioksidatīvajā aktivitātē. Sapropeļa antioksidatīvās īpašības var labvēlīgi ietekmēt ādas aizsardzību pret apkārtējās vides faktoriem un samazināt oksidatīvā stresa izraisītos bojājumus. Augsta antioksidatīvā aktivitāte var arī paātrināt lēni dzīstošu brūču dzīšanu, īpaši pacientiem ar II tipa cukura diabētu (Guimarães et al., 2021; Ji et al., 2016; Sim et al., 2022).

Promocijas darbā tika konstatēts, ka humīnskābes un fulvīnskābes koncentrācija sapropeļa ekstraktos ievērojami atšķiras, ko nosaka humusvielu ķīmiskās struktūras variabilitāte, sapropeļa mineralizācijas pakāpe un organisko vielu saturs nogulumos. Pētījuma rezultāti liecināja, ka nav būtiskas izmaiņas starp sapropeļa slāņiem, kā rezultātā tālākos pētījumos tika izmantots vidējais paraugs. Rezultāti atklāja būtiskas atšķirības antioksidantu aktivitātē un humusvielu koncentrācijā starp ezeriem, norādot, ka sapropeļa veids ir nozīmīgs faktors tā potenciālā lietojuma noteikšanā. Audzeļu ezera paraugā tika konstatēts augstākais kopējais antioksidantu statuss ($1,08 \pm 0,03$ mmol/L) un augstākais kopējais polifenolu daudzums ($146,26 \pm 1,16$ µg GAL/ml). Humīnskābes koncentrācija šajos paraugos sasniedza 39,5 mg/g kas tiek uzskatīta par augstu. Savukārt Ivušku ezera paraugos tika novērots viszemākais AS ($0,31 \pm 0,01$ mmol/L) un polifenolu koncentrācija ($42,07 \pm 0,55$ µg GAL/ml), neskatoties uz to, ka fulvīnskābes koncentrācija bija visaugstākā (40,8 mg/g). Tika konstatēta augsta korelācija starp AS un HS koncentrāciju ($R^2 = 0,90$), kā arī starp kopējo polifenolu daudzumu un antioksidantu statusu ($R^2 = 0,93$), kas norāda uz to ka polifenoli, kas saistīti ar humīnskābi, ir galvenie antioksidatīvās aktivitātes veicinātāji. Savukārt fulvīnskābes koncentrācija neuzrādīja statistiski nozīmīgu korelāciju ar antioksidatīvo aktivitāti, kas liecina par atšķirīgu šo savienojumu lomu antioksidatīvajos procesos (Klavina et al., 2019; Kļaviņa et al., 2024).

Standartizētu metožu trūkums sapropeļa ekstraktu analīzei apgrūtina iegūto rezultātu salīdzināmību starp dažāda līmeņa pētījumiem un palielina risku nekorektai datu interpretācijai un publicēšanai. Sapropeļa ekstraktu kompleksais ķīmiskais sastāvs, kas ietver humusvielas, vitamīnus, peptīdus un minerālvielas, būtiski sarežģī analītisko procedūru izstrādi. Lai nodrošinātu vispusīgu ekstraktu raksturojumu, nepieciešams lietot dažādu analīzes metožu kombināciju, kas spēj aptvert plašo komponentu spektru (Azmir et al., 2013; Klavina et al., 2020; Neha et al., 2019; The European Pharmacopoeia 11th Edition, 2023).

Citotoksicitātes novērtējums

Neitrālās sarkanās krāsvielas uzņemšanas citotoksicitātes tests (*Neutral Red Uptake Cytotoxicity assay*, NRU) un šūnu augšanas izmaiņu monitorēšana ar *Cell IQ* reālā laika sistēmu tika izmantoti, lai novērtētu dažādu Latvijas ezeru sapropeļa ekstraktu koncentrācijas atkarīgo citotoksicitāti un bioloģisko aktivitāti, īpaši fokusējoties uz to ietekmi uz šūnām un potenciālo lietojumu ādas kopšanas un brūču dziedēšanas kontekstā. NRU tests tika veikts uz peļu fibroblastu šūnu līniju (BALB/c 3T3), izmantojot fulvīnskābes koncentrācijas 17,5 µg/ml, 70,0 µg/ml un 140,0 µg/ml. Rezultāti uzrādīja statistiski ticamu korelāciju ar kontroles paraugiem tikai zemākajā koncentrācijā (17,5 µg/ml). Augstākās koncentrācijās tika novērotas neatbilstības starp standarta kontroli un testētajiem paraugiem, kas norāda uz iespējamu ekstrakcijas šķīdinātāja toksicitāti, īpaši pie 140,0 µg/ml, kur NRU rezultāti ievērojami samazinājās salīdzinājumā ar standarta kontroli, bet palielinājās attiecībā pret šķīdinātāja kontroli. Audzeļu ezera ekstrakti konsekventi uzrādīja pazeminātu NRU salīdzinājumā ar standarta kontroli visās koncentrācijās, bet paaugstinātu NRU salīdzinājumā ar šķīdinātāja kontroli augstākās koncentrācijās, kas pastiprina pieņēmumu, ka novērotā citotoksicitāte var būt saistīta ar izmantoto šķīdinātāju, nevis ar pašu humīnskābes un fulvīnskābes iedarbību. Savukārt Ivušku un Zeiļu ezera ekstrakti pie 17,5 µg/ml neuzrādīja kaitīgu ietekmi un pat demonstrēja potenciālu pozitīvu efektu uz šūnu dzīvotspēju. Dūnakļu un Mazā Kivdaloņas ezera ekstrakti uzrādīja mērenus rezultātus, kas atkal norāda uz iespējamu šķīdinātāja izraisītu stresu (Klaviņa et al., 2024).

Citotoksicitātes pētījuma eksperimentālajā modelī bija nepieciešama sapropeļa ekstrakta koncentrācijas regulēšana, ko panāca, atšķaidot šūnu kultūras barotni līdz 40 %. Šī pieeja radīja divkāršus stresa apstākļus – pazeminātu vides pH līmeni un barības vielu koncentrācijas samazinājumu. Tā kā peļu fibroblastu šūnas ir jutīgas pret pH izmaiņām, zemais pH līmenis paraugos varēja būtiski ietekmēt eksperimenta rezultātus. Iespējams, ka sapropeļa ekstrakta buferkapacitāte palīdzēja stabilizēt barotnes pH, veicinot šūnu dzīvotspēju ilgākā laika periodā, nekā to nodrošinātu tikai barības vielas (Phelan & May, 2016, 2017).

Šūnu augšanas novērtējums

Šūnu augšanas izmaiņu analīze, izmantojot *Cell IQ* reālā laika monitorēšanas sistēmu, sniedza papildu ieskatu šūnu augšanas dinamikā. Zemās sapropeļa ekstraktu koncentrācijās (3,5 µg/ml un 7 µg/ml) netika novērota būtiska nelabvēlīga ietekme uz šūnu augšanu, izņemot atsevišķos paraugos konstatēto augšanas inhibīciju pēc 24 stundu inkubācijas. Koncentrācijā 17,5 µg/ml BALB/c 3T3 šūnās sākotnēji tika novērota augšanas stimulācija, kam sekoja inhibīcija. Savukārt pie 35 µg/ml HaCaT šūnu augšana saglabājās stabila, lai gan Mazā Kivdaloņas un Audzeļu ezeru ekstrakti pēc 24 stundām izraisīja augšanas inhibīciju. BALB/c 3T3 šūnās tika novērota līdzīga reakcija – sākotnēja stimulācija, kam sekoja augšanas samazinājums pēc 24 stundām. Koncentrācijā 70 µg/ml BALB/c 3T3 šūnās tika konstatēta izteikta augšanas aktivācija, kas pēc 9 stundām pārgāja inhibīcijā. HaCaT šūnas šajā koncentrācijā saglabāja augšanas stabilitāti līdz 12 stundām, pēc kurām tika novērota augšanas samazināšanās. Pie 140 µg/ml Audzeļu ezera ekstrakts veicināja HaCaT šūnu augšanu līdz 18 stundām un BALB/c 3T3 šūnu augšanu līdz 3 stundām, savukārt citu ezeru ekstrakti izraisīja minimālu stimulāciju un straujāku augšanas inhibīciju.

Sapropeļa ekstrakti demonstrēja īslaicīgu šūnu augšanas stimulāciju augstākās koncentrācijās, vienlaikus uzrādot arī citotoksisku iedarbību. Šūnu augšanas rezultāti, kā arī humīnskābes un fulvīnskābes koncentrācijas, antioksidatīvās īpašības – īpaši paraugos ar augstu antioksidantu spēju un polifenolu saturu – norāda uz potenciālu sapropeļa ekstraktu lietojumu lokālos ādas kopšanas produktos īslaicīgai terapijai (Kļaviņa et al., 2024). Tomēr šķīdinātāja toksicitāte un eksperimentālie apstākļi, kas varēja ietekmēt rezultātu interpretāciju, parādīja nepieciešamību pēc optimizētām procedūrām un standartizētām testēšanas metodēm (Phelan & May, 2016, 2017). Kopējie pētījuma rezultāti liecina, ka sapropeļa ekstraktiem ir no devas atkarīga ietekme uz šūnu dzīvotspēju un proliferāciju. Īslaicīga stimulējoša iedarbība tika novērota ar atsevišķu ezeru sapropeļa ekstraktiem, piemēram, Audzeļu ezera paraugiem, kas norāda, ka noteiktas sapropeļa nogulumu kompozīcijas var būt piemērotākas terapeitiskiem lietojumiem nekā citas (Kļaviņa et al., 2024; Vanadziņš et al., 2022).

In vitro šūnu kultūras testos iegūtās atziņas apvienojumā ar sapropeļa ekstrakta sastāva un antioksidatīvo īpašību analīzi veicina padziļinātu izpratni par tā iespējamo terapeitisko lietojumu, īpaši ādas kopšanas un brūču dziedēšanas kontekstā. Tomēr precīzi mehānismi, kā sapropeļa ekstrakti mijiedarbojas ar šūnām, šobrīd nav pilnībā noskaidroti. Lai raksturotu ekstraktu antioksidatīvās darbības mehānismus, nepieciešami turpmāki pētījumi. Nākotnes izpētē īpaša uzmanība jāpievērš toksicitātes modeļiem, kā arī vides pH līmeņa un bioloģiski aktīvo vielu koncentrācijas kontrolei, lai nodrošinātu precīzāku sapropeļa ekstrakta terapeitiskā potenciāla novērtējumu (Kļaviņa et al., 2024).

Hidrogels ar sapropeļa ekstraktu: pagatavošana un stabilitāte

Promocijas darbā tika pētīts stabilu hidrogelu ar sapropeļa ekstraktu izstrādes potenciāls un to iespējamā izmantošana farmācijas un kosmētikas nozarē. Hidrogela pagatavošanai tika izmantots karboksimetilcelulozes nātrija sāls (CMC-Na) kā primārā polimēru bāze kombinācijā ar glicerīnu, etanolu un bufersāļiem, lai optimizētu hidrogeļa fizikālās un ķīmiskās īpašības. Pagatavošanas procesā tika izmantots 2,5 masas % CMC-Na – bioloģiski saderīgs polimērs, kas pazīstams ar stabilu viskozitāti ūdens vidē un labām gela veidošanas spējām. Glicerīns (8 masas %) tika pievienots kā plastifikators, lai uzlabotu hidrogeļa elastību, savukārt etanols (8 masas %) kalpoja kā konservants, nodrošinot mikrobioloģisko stabilitāti ilgtermiņā. Aktīvā sastāvdaļa sapropeļa ekstrakts (5 masas %) tika standartizēts, lai saturētu 700 µg/g fulvīnskābes (Kļaviņa et al., 2025).

Karboksimetilcelulozi plaši izmanto farmaceitiskos un kosmētiskos preparātos, jo tā ir ūdenī šķīstoša, noturīga pret organiskiem šķīdinātājiem un spēj veidot caurspīdīgus, stabilus gelus. Tās struktūra, kas bagāta ar hidroksilgrupām, veicina trīsdimensiju gela tīklu veidošanos piemērotos apstākļos, īpaši pH diapazonā no 3,5 līdz 11. Glicerīnam un etanolam sastāvā ir papildu funkcijas, kas saistītas ar transdermālās absorbcijas veicināšanu. Glicerīns darbojas kā mitrinātājs, uzlabojot ādas hidratāciju un palielinot tās caurlaidību, savukārt etanols izjauc ādas lipīdu barjeru, tādējādi veicinot aktīvo vielu iekļūšanu dziļākajos ādas slāņos (Burgardt et al., 2015; Mo et al., 2022; Wellens et al., 2022).

Lai uzlabotu hidrogeļa stabilitāti un reoloģiskās īpašības, receptūrās tika iekļauti bufersāļi. Tika izmantoti trīs dažādi sāļi – nātrija hlorīds, magnija hlorīds un magnija sulfāts –, kas tika sagatavoti kā 0,2 M ūdens šķīdumi un pievienoti galaproduktam. Šie sāļi pozitīvi ietekmēja hidrogeļa viskozitāti, viendabīgumu un strukturālo integritāti, nodrošinot hidrogeļa stabilitāti ilgtermiņā. Visas receptūras tika pagatavotas, izmantojot vienotu maisīšanas stratēģiju. Cietās sastāvdaļas (CMC-Na) tika homogenizētas ar etanolu un glicerīnu, līdz izveidojās viendabīgs, biezas konsistences maisījums. Sapropeļa ekstrakts tika pievienots pakāpeniski, lai nodrošinātu vienmērīgu dispersiju. Bufersāļu šķīdums tika pievienots procesa noslēgumā, koriģējot kopējo tilpumu līdz 100 % pēc masas (Burgardt et al., 2015; Kļaviņa et al., 2025).

Hidrogeļu izstrādei tika izmantots modulārs laboratorijas reaktors, kas aprīkots ar enkura tipa maisītāju, plūsmas izkliedētāju, temperatūras sensoru un vakuuma sistēmu. Procesā laikā tika kontrolēti tādi tehnoloģiskie parametri kā maisīšanas ātrums, temperatūra, maisīšanas ilgums. Sākotnējais maisīšanas ātrums bija 50 apgriezieni minūtē, kas pēc ūdens pievienošanas tika palielināts līdz 100 apgriezieniem minūtē, lai novērstu polimēru agregāciju polimerizācijas laikā. Temperatūra tika uzturēta 40 °C, ar iespēju paaugstināt to līdz 60 °C, ja nepieciešams.

Maisīšanas ilgums bija 3 stundas, lai nodrošinātu vienmērīgu polimerizāciju un sastāvdaļu homogenizāciju. Pēc maisīšanas hidroģels tika aseptiski pārnestš sterilās, caurspīdīgās 100 ml tvertnēs. Pārliešana tika veikta sterilā vidē, lai novērstu mikrobioloģiskā piesārņojuma risku, kas varētu apdraudēt hidroģela stabilitāti ilgtermiņā. Pirms uzglabāšanas stabilitātes testēšanai hidroģelam ļāva atdzist līdz 30 °C. Atdzesēšanas laikā notika sol–gel pāreja, kuras rezultātā izejvielu šķīduma (sol) mazmolekulārie komponenti polimerizācijas un hidrolīzes reakciju rezultātā veidoja gelam līdzīgu trīsdimensiju tīklu (gel). Hidroģeli ar sapropeļa ekstraktu tika pagatavoti, balstoties uz iepriekš izstrādātām receptūrām, kas tiks detalizēti aprakstītas iesniegtajā patentā (Auce et al., 2022; Kļaviņa et al., 2025).

Mērķis bija izstrādāt viendabīgu un ilgtermiņā stabilu hidroģelu ar sapropeļa ekstraktu, bez kristāliskiem piemaisījumiem un gatavu lietošanai. Pētījumi liecina, ka karboksimetilcelulozes hidroģeli veidojas, pateicoties fizikāliem un ķīmiskiem šķērssaistīšanās mehānismiem. Tomēr hidroģeli, kas iegūti ar fizikālo šķērssaistīšanos, ir vāji un laika gaitā zaudē stabilitāti. Visbiežāk izmantotie šķērssaistītāji karboksimetilcelulozes bāzes hidroģelu pagatavošanai ir toksiski. Šajā pētījumā hidroģela sasaistes process notiek divos mehānismos, mainot fizikālos vai ķīmiskos apstākļus (Burgardt et al., 2015; Ghorpade et al., 2018; Mo et al., 2022; Pornpitchanarong et al., 2022; Wui et al., 2014).

Pētījuma rezultāti liecina, ka visi hidroģela sastāvi, kas detalizēti aprakstīti iesniegtajā patentā, demonstrēja vienmērīgu, homogēnu izskatu un stabilitāti. Hidroģeli bez sapropeļa ekstrakta bija caurspīdīgi, savukārt hidroģeli ar sapropeļa ekstraktu – gaiši dzelteni līdz caurspīdīgi. Visi formulējumi bija viegli uzklājami un uzrādīja pieņemamu stabilitāti. Organoleptisko īpašību analīzē pirmajos trijos mēnešos visi hidroģela sastāvi saglabāja nemainīgu kvalitāti visās testētajās temperatūrās (4 °C, 23 °C un 45 °C), saņemot maksimālo novērtējumu – 3 punktus. Pēc 90 dienām un pēc diviem gadiem daži sastāvi saņēma 2 punktus, bet pēc divu gadu uzglabāšanas 45 °C un UV gaismas iedarbības – 1 punktu. Novērtējuma skala tika definēta šādi: 3 punkti – nav novērotas izmaiņas smaržā, krāsā vai struktūrā salīdzinājumā ar ražošanas brīdi; 2 punkti – nelielas izmaiņas, kas būtiski neietekmē produkta stabilitāti; 1 punkts – būtiskas izmaiņas, kas liecina par stabilitātes zudumu (Auce et al., 2022; Fang et al., 2022; Kļaviņa et al., 2025).

Hidroģeli, kuros tika iekļauti bufersāļu šķīdumi (nātrija hlorīds, magnija hlorīds un magnija sulfāts), demonstrēja augstu stabilitāti un viendabīgumu, vienlaikus nodrošinot sapropeļa ekstrakta bioloģiski aktīvo funkcionalitāti. Šīs receptūras ir pielāgojamas specifiskiem biomedicīnas lietojumiem, ņemot vērā to fizikāli ķīmiskās īpašības un bioloģisko aktivitāti. Magnija jonus saturošie hidroģeli bija ar porainu struktūru, kas uzlabo to funkcionālās īpašības un padara tos ļoti pievilcīgus plašā farmaceitisko produktu lietojumu

klāstā, it īpaši brūču dziedēšanai, zāļu piegādei un citiem biomedicīniskiem mērķiem. Magnija sāļi, piemēram, magnija hlorīda, iekļaušana hidrogela sastāvā uzlabo tā struktūru, veicinot poraināka polimēru tīkla veidošanos. Palielinātā porainība ir īpaši nozīmīga, lai nodrošinātu ilgstošu aktīvo vielu izdalīšanos un optimizētu brūču mitrināšanu, kas palīdz samazināt rētaudu un kreveļu veidošanos. Šīs īpašības padara hidrogelus ar magnija sāļiem par piemērotu izvēli lokālai lietošanai uz ādas un kontrolētai zāļu piegādei dermatoloģijā (Al-Arjan et al., 2022; Fang et al., 2022). Hidrogeli, kas satur magnija sāļu bufersāļu šķīdumus, demonstrēja augstu stabilitāti, ko apstiprina gan promocijas darbā veiktie stabilitātes un struktūras testi, gan literatūrā aprakstītie rezultāti. Termiskās slodzes un centrifugēšanas testi papildus apliecināja šo sastāvu vispārējo stabilitāti, norādot uz to piemērotību ilgtermiņa lietošanai zāļu formās, piemēram, brūču plāksteros (Fang et al., 2022; Kļaviņa et al., 2025).

Sapropeļa ekstrakta pievienošana, kas ir bagāts ar HS un FS, veicina ūdeņraža saišu veidošanos, kas uzlabo hidrogela strukturālo stabilitāti un pazemina tā pH līmeni, padarot vidi skābu. Literatūrā šāda efekta nodrošināšanai bieži tiek izmantotas organiskās skābes, piemēram, citronskābe vai etiķskābe. Sapropeļa ekstrakts ne tikai stiprina hidrogela matricu un samazina ūdens zudumu, bet arī HS un FS darbojas kā dabiskie polielektrolīti, uzlabojot mijiedarbību starp polimēru ķēdēm un pozitīvi lādētiem joniem, piemēram, magnija joniem, tādējādi vēl vairāk stabilizējot hidrogela struktūru (Ghorpade et al., 2018; Kļaviņa et al., 2025).

Viena no būtiskākajām izstrādāto hidrogelu īpašībām ir to spēja saglabāt ūdeni, kas ir kritiski svarīga brūču mitrināšanai un dzīšanas procesa veicināšanai. Turklāt šie hidrogeli demonstrē pH jutību, reaģējot uz vides pH izmaiņām ar reversiblu uzbriešanu un saraušanos (Al-Arjan et al., 2022; Wach et al., 2003). Reoloģiskās un spektroskopiskās analīzes apstiprināja hidrogela struktūras nemainību un stabilitāti laika gaitā. Sol-gel pārejas identificēšana norāda, ka izstrādātās sistēmas atbilst hidrogela definīcijai (Burgardt et al., 2015; Kļaviņa et al., 2025; Stojkov et al., 2021).

Pētījuma rezultāti liecina, ka ar sapropeļa ekstraktu bagātināti hidrogeli ir daudzsolīga bioloģiski aktīvo savienojumu piegādes sistēma, kas pielāgojama dažādiem produktu veidiem atkarībā no lietošanas konteksta un lietotāja vajadzībām.

Secinājumi

1. Sapropelis ir sastopams lielākajā daļā Latvijas ezeru, kā arī daudzos purvos zem kūdras slāņa. Tā ieguvī regulē normatīvais regulējums, un šī pētījuma ietvaros tika izstrādātas vadlīnijas ilgtspējīgai sapropeļa izpētei. Galvenās bioaktīvās vielas ir humīnskābe un fulvīnskābe, kā arī lipīdi, olbaltumvielas, ogļhidrāti, vitamīni, minerālvielas un mikroorganismi. Pateicoties šo vielu klātbūtnei, sapropelim piemīt pretiekaisuma, antioksidanta, antimikrobiāla un reģenerējoša iedarbība. Tas palīdz uzturēt veselīgu ādas struktūru un var tikt izmantots tādu slimību kā akne, izsitumi un dermatīts mazināšanai.
2. Sapropeļa nogulumu kvalitātes novērtējumā smago metālu un pesticīdu atliekas testētajos paraugos nepārsniedza normas robežas, kas atļauj to izmantošanu. Neapstrādātiem sapropeļa paraugiem tika novērots augsts mikroorganismu skaits, pārsniedzot atļautās robežas, kas prasa obligātu sterilizāciju vai uzglabāšanas procesu ieviešanu.
3. Galvenās bioloģiski aktīvās vielas ir humīnskābe (HS) un fulvīnskābe (FS). Tās tiek iegūtas, izmantojot cietvielu un šķidrumu sārmainu ekstrakcijas metodi. To koncentrācija un aktivitāte atšķiras atkarībā no sapropeļa avota, kas liecina par nepieciešamību standartizēt sapropeļa ekstraktu. Sapropeļa ekstrakti uzrādīja antioksidatīvu aktivitāti un īstermiņa šūnu reģenerācijas veicināšanu *in vitro* testos.
4. Tika izveidotas astoņas nātrija karboksimetilcelulozes (CMC-Na) hidrogelu receptūras, četras saturēja sapropeļa ekstraktu. HS un FS klātbūtne sapropeļa ekstraktā atvieglo šķērssaistīšanās mehānismu CMC-Na polimēra tīklā. Magnija sāļi nodrošināja jonu sasaisti un veicināja hidrogela porainību, uzlabojot tādas īpašības kā ūdens saglabāšanos un lēnāku aktīvo vielu izdalīšanos no hidrogela.
5. Sapropeļa ekstraktu saturošie hidrogeli uzrādīja labu fizikālo stabilitāti, saglabāja biopieejamu pH līmeni un organoleptiskās īpašības. Sastāvi ar sapropeļa ekstraktu un magnija sāļiem demonstrēja labāku viskozitāti un ūdens zuduma ātrumu un nodrošināja labāku hidrogela kopējo stabilitāti un noturību.
6. Fizilāli ķīmisko īpašību un ilgnoturības testi apstiprināja hidrogelu piemērotību lokālai lietošanai uz ādas, risinot tradicionālos sapropeļa izmantošanas izaicinājumus.

Sapropeļa ekstrakts demonstrē saderību ar karboksimetilcelulozes hidrogeliem, pozitīvi ietekmējot to struktūras stabilitāti un uzlabojot to potenciālu kalpot par piegādes sistēmām terapeitiskajiem un kosmētiskajiem produktiem, īpaši tādās jomās kā ādas kopšana un brūču aprūpe.

Priekšlikumi

1. Izpētīt sapropeļa absorbcijas mehānismus ādā

Lai gan ir izvirzītas hipotēzes par sapropeļa savienojumu uzsūkšanās ceļiem caur ādu, nepieciešami mērķtiecīgi eksperimentāli pētījumi, lai tos apstiprinātu un kvantificētu. Turpmākajos darbos būtu jāizmanto *in vitro* un *ex vivo* ādas modeļi, lai padziļināti izprastu difūzijas dinamiku un optimizētu terapeitisko efektivitāti.

2. Novērtēt hidrogela un ādas saskares īpašības

Lai uzlabotu produkta efektivitāti un lietošanas komfortu, nepieciešami papildu pētījumi par fizikālajām mijiedarbībām hidrogela un ādas saskares zonās. Būtiskie parametri ietver kontaktleņķi, virsmas spriegumu, adhēzijas stiprumu un mitruma saglabāšanas spēju.

3. Veikt *in vivo* un klīniskos pētījumus

Balstoties uz daudzsološajiem *in vitro* rezultātiem, ir būtiski kontrolēti pētījumi ar dzīvniekiem un klīniskie pētījumi, lai novērtētu drošumu, bioloģisko saderību un terapeitiskos rezultātus reālās lietošanas situācijās, īpaši brūču aprūpē, dermatoloģijā un kosmētikā.

4. Izpētīt sapropeļa hidrogelu plašāku lietojumu

Papildus brūču dzīšanai sapropeļa bāzes hidrogeliem ir potenciāls iekaisīgu ādas slimību ārstēšanā un kā bioloģiski aktīvo vielu piegādes sistēmām. Lietojuma jomu paplašināšana var būtiski palielināt šī materiāla nozīmi medicīnā.

Publikāciju, ziņojumu un patentu saraksts par promocijas darba tēmu

Publikācijas:

1. Vanadzins, I., Martinsone, I., **Klavina, A.**, Komarovska, L., Auce, A., Dobkevica, L. and Sprudza, D. 2022. Sapropel – mining characteristics and potential use in medicine. *Proc. Latvian Acad. Sci., Section B.*. Received 29.06.2018. Published 02.06.2022. Vol. 76, No. 2 (737):188–197. doi: 10.2478/prolas-2022-0029.
2. Pavlovskā, I., **Klavina, A.**, Auce, A., Vanadzins, I., Silova, A., Komarovska, L., Silamikele, B., Dobkevica, L. and Paegle, L. 2020. Assessment of sapropel use for pharmaceutical products according to legislation, pollution parameters, and concentration of biologically active substances. *Sci Rep.* Published 09.12.2020. 10:21527. doi: doi.org/10.1038/s41598-020-78498-6.
3. **Klavina A.**, Auce A., Vanadzins I., Silova A., Dobkevica L. 2019. Extraction of Biologically Active Components from Freshwater Sapropel. *Environmental Technology. Resources. Proceedings of the 12th International Scientific and Practical Conference.*, Published: 20. 06.2019. 3:114–118. doi: 10.17770/etr2019vol3.4135.
4. **Klavina, A.**, Reste, J., Martinsone, I., Vanadzins, I., Lece, A., and Pavlovskā, I. 2024. Unlocking the Therapeutic Potential of Freshwater Sapropel Extracts: In Vitro Analysis and Antioxidant Profiling for Skincare Applications. *Medicina.* Published 27.03.2024. 60(4):546. doi: 10.3390/medicina60040546.
5. **Klavina, A.**, Reste, J., Martinsone, I., Vanadzins, I., Juhnevica, I., and Pavlovskā I. 2025. Sapropel-enriched sodium carboxymethyl cellulose gel systems: formulation approaches, stability and bioactive potential. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications.* 03.2025. 9:100669. doi: 10.1016/j.carpta.2025.100669.

Vadlīnijas:

1. Scientific workgroup: Vanadziņš, I., Pavlovskā, I., Mārtinsons, I., Sprūdža, D., Silova, A., Dobkeviča, L., Komarovska, L., Auce, A., Paegle, L., Muižnieks, A., Kļaviņa, A., Blāķe, I., Silamikele, B., Ribinska, L., Čerpaska, Z. Published on 30.03.2020. The sapropel extraction guidelines. Developed in project No.1.1.1.1/16/A/165. RSU. Riga, Latvia.
2. Developed in project No.1.1.1.1/16/A/165. Scientific workgroup: Vanadziņš, I., Pavlovskā, I., Mārtinsons, I., Sprūdža, D., Silova, A., Dobkeviča, L., Komarovska, L., Auce, A., Paegle, L., Muižnieks, A., Kļaviņa, A., Blāķe, I., Silamikele, B., Ribinska, L., Čerpaska, Z. Published on 31.03.2020. Guidelines for stability tests, use and preservation of therapeutic properties of sapropel. Developed in project No.1.1.1.1/16/A/165. RSU. Riga, Latvia.

Ziņojumi un tēzes starptautiskās konferencēs:

1. **Klavina, A.**, Maurina, B., Martinsone, I., 2018. Carboxymethyl cellulose gel systems with sapropel extract. 82nd PMM and 24th PNG: Polymers Networks and Gels. Abstracts: 17. – 21.06.2018., 30. Prague, Czech Republic.
2. **Klavina, A.**, Auce, A., Silova, A., Dobkevica, L., Vanadzins, I. 2019. Freshwater sapropel extract for use in medicine and pharmaceuticals. 3rd Global Conference on Pharmaceutics and Drug Delivery Systems Abstracts: 24.–26.06.2019., 84. Paris, France.
3. Auce, A., **Klavina, A.**, Komarovska, L., Silova, A., Pavlovskā, I., Vanadzins, I. 2019. Freshwater Sapropel as raw material in medicine and pharmaceutical production. 3rd Global Conference on Pharmaceutics and Drug Delivery Systems Abstracts: 24.–26.06.2019., 109. Paris, France.
4. Komarovska, L., Ribinska, L., **Klavina, A.**, Martinsone, I., Vanadzins, I., Dobkevica, L., Silova, A. 2019. Trace Element Determination in Sapropel from Five Lakes in Eastern Part of Latvia. The International Scientific Conference 10th Forum of Ecological Engineering: Abstracts, 9.–11.09.2019., 68. Kazimierz Dolny, Poland.

5. Auce, A., **Klavina, A.**, Komarovska, L., Silova, A., Dobkevica, L. 2019. Freshwater sapropel as raw material in pharmaceutical production. 2nd Middle East Pharmacy and Pharmaceutical Conference & 11th congress on Drug formulation & Analytical Techniques: Abstracts, 9.–10.12.2019., 29. ISSN:2167-065X Journal of Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics. Dubai, UAE.
6. Paegle, L., Pavlovskā, I., Muiznieks, A., Vanadzins, I., **Klavina, A.** 2020. Impact Assessment of Freshwater Sapropel Applications. ICPTSTC 2020: International Conference on Physical Therapy Science in Treatment and Care. Abstracts: 16.–17.01.2020., 947. Roma, Italy.
7. Pavlovskā I., **Klavina A.**, Vanadzins I., Silamikele B. 2020. Freshwater Source of Sapropel for Healthcare. ICPTSTC 2020: International Conference on Physical Therapy Science in Treatment and Care. Abstracts: 16.–17.01.2020., 948. Roma, Italy.
8. **Klavina, A.**, Auce, A., Silova, A., Pavlovskā, I. 2020. Total Antioxidant Status in Sapropel Extracts: Layer by Layer. Pharma R&D-2020 Abstracts: 24.–26.02.2020., 34. Los Angeles, California, US.
9. **Klavina A.**, Auce A., Komarovska L., Silova A., Pavlovskā I. 2020. Total antioxidant status in sapropel extracts in different sediment depth in lakes in Latvia. The 78th International Scientific Conference of the University of Latvia. Abstracts: 6.03.2020., 24. Riga, Latvia.
10. **Klavina, A.**, Auce, A., Pavlovskā, I. and Vanadzins, I. 2020. Freshwater sapropel: biologically active components and methods of extraction. International Conference of innovations in Science and Education: Proceedings of CBU in Natural Sciences and ICT. 1:37–46: 16.11.2020. Prague, Czech Republic.
11. **Klavina A.** 2021. Sapropel – black gold in Latvian lakes. InnovaSPA Study Visit in Latvia. Information seminar, 28.04.2021., Riga, Latvia.

Ziņojumi un tēzes vietēja mēroga kongresos un konferencēs:

1. Vanadzins, I., Siliva, A., **Klavina, A.**, Dobkevica, L., Mārtiņšone, I., Komarovska, L., Ribkinska, L. 2019. The level of pesticide residues in the lakes of the sapropel deposit in the eastern regions of Latvia. Rīga Stradiņš University International Research Conference on Medical and Health Care Sciences “Knowledge for Use in Practice”: Abstracts, 01.–03.04.2019, 677. Riga, Latvia.
2. Komarovska, L., Ribkinska, L., **Klavina, A.**, Siliva, A., Vanadzins, I., Mārtiņšone, I. 2019. Trace Element Determination in Sapropel. Rīga Stradiņš University International Research Conference on Medical and Health Care Sciences “Knowledge for Use in Practice”: Abstracts, 01.–03.04.2019, 717. Riga, Latvia.
3. **Klavina, A.**, Vanadzins, I., Dobkevica, L., Auce, A., Komarovska, L. 2019. Extraction of Active Ingredients for Pharmaceutical Use from Freshwater Sapropel in Latvia. Rīga Stradiņš University International Research Conference on Medical and Health Care Sciences “Knowledge for Use in Practice”: Abstracts, 01.–03.04.2019, 401. Riga, Latvia.

Patents:

1. Auce, A., Dobkevica, L., Komarovska, L., **Klavina, A.**, Silova, A., Silamikele, B., Pavlovskā, I. and Vanadzins I. 2022. Water-soluble gel system with sapropel extract and the method of its preparation. P-19-63. LV15514, 20.05.2022. 5/2022. [Available <https://databases.lrpv.gov.lv/patents/P-19-63>].

Literatūras un avotu saraksts

1. Aeschbacher, M., Graf, C., Schwarzenbach, R. P., & Sander, M. (2012). Antioxidant properties of humic substances. *Environmental Science and Technology*, 46(9), 4916–4925. <https://doi.org/10.1021/es300039h>
2. Al-Arjan, W. S., Khan, M. U. A., Almutairi, H. H., Alharbi, S. M., & Razak, S. I. A. (2022). pH-Responsive PVA/BC-f-GO Dressing Materials for Burn and Chronic Wound Healing with Curcumin Release Kinetics. *Polymers*, 14(10), 1949. <https://doi.org/10.3390/polym14101949>
3. Almeida, A. R., Jesus, F., Henriques, J. F., Andrade, T. S., Barreto, Â., Koba, O., Giang, P. T., Soares, A. M. V. M., Oliveira, M., & Domingues, I. (2019). The role of humic acids on gemfibrozil toxicity to zebrafish embryos. *Chemosphere*, 220, 556–564. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.12.133>
4. Auce, A., Silova, A., Klavina, A., Silamikele, B., Pavlovskā, I., Vanadzins, I., Komarovskā, L., & Dobkevica, L. (2022). *Water-soluble gel system with sapropel extract and the method of its preparation (Patent 15514)*. <https://databases.lrpv.gov.lv/api/api/Patents/44778/Documents/129422>
5. Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
6. Beer, A. M. M., Lukanov, J., & Sagorchev, P. (2000). The influence of fulvic and ulmic acids from peat, on the spontaneous contractile activity of smooth muscles. *Phytomedicine*, 7(5), 407–415. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80062-8](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80062-8)
7. Bellometti, S., Cecchetti, M., Lalli, A., & Galzigna, L. (1996). Mud pack treatment increases serum antioxidant defenses in osteoarthrotic patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 50(1), 37. [https://doi.org/10.1016/0753-3322\(96\)85097-9](https://doi.org/10.1016/0753-3322(96)85097-9)
8. Bellometti, S., Galzigna, L., Richelmi, P., Gregotti, C., & Bertè, F. (2002). Both serum receptors of tumor necrosis factor are influenced by mud pack treatment in osteoarthrotic patients. *International Journal of Tissue Reactions*, 24(2), 57–64. <http://europepmc.org/abstract/MED/12182234>
9. Bellometti, S., Poletto, M., Gregotti, C., Richelmi, P., & Bertè, F. (2000). Mud bath therapy influences nitric oxide, myeloperoxidase and glutathione peroxidase serum levels in arthritic patients. *International Journal of Clinical Pharmacology Research*, 20(3–4), 69–80.
10. Borowska, S., & Brzóska, M. M. (2015). Metals in cosmetics: implications for human health. *Journal of Applied Toxicology*, 35(6), 551–572. <https://doi.org/10.1002/jat.3129>
11. Burgardt, V. C. F., Züge, L. C. B., de Bonna Sartor, G., Waszczynskyj, N., Silveira, J. L. M., & Haminiuk, C. W. I. (2015). The addition of carboxymethylcellulose in caseinomacropeptide acid gels: Rheological, optical and microstructural characteristics. *Food Hydrocolloids*, 49, 11–17. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2015.03.005>
12. Canellas, L. P., Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Jones, D. L., Nebbioso, A., Mazzei, P., & Piccolo, A. (2015). Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>
13. Carretero, M. I. (2020a). Clays in pelotherapy. A review. Part I: Mineralogy, chemistry, physical and physicochemical properties. *Applied Clay Science*, 189, 105526. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2020.105526>
14. Carretero, M. I. (2020b). Clays in pelotherapy. A review. Part II: Organic compounds, microbiology and medical applications. *Applied Clay Science*, 189, 105531. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2020.105531>
15. Centini, M., Tredici, M. R., Biondi, N., Buonocore, A., Maffei Facino, R., & Anselmi, C. (2015). Thermal mud maturation: Organic matter and biological activity. *International Journal of Cosmetic Science*, 37(3), 339–347. <https://doi.org/10.1111/ics.12204>

16. Chunxia, W., Zijian, W., Chunlin, Y., Wenhua, W., & An, P. (1996). The evidence for the incorporation of fulvic acid into the bone and cartilage of rats. *Science of the Total Environment*, 191(3), 197–202. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(96\)05260-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(96)05260-6)
17. Dolmaa, G., Tserenpil, S., Ugtakhbayar, O., Shevchenko, S., Kliba, L., & Voronkov, M. (2011). Characterization and Organic Compounds in Peloids from Mongolia. *Proceedings of the Mongolian Academy of Sciences*, 3–21. <https://doi.org/10.5564/pmas.v0i4.42>
18. Environmental Protection Law (2006). <https://www.vestnesis.lv/ta/id/147917-vides-aizsardzibas-likums>
19. Fang, Y., Li, H., Chen, J., Xiong, Y., Li, X., Zhou, J., Li, S., Wang, S., & Sun, B. (2022). Highly Water-Absorptive and Antibacterial Hydrogel Dressings for Rapid Postoperative Detumescence. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.845345>
20. Fernández-González, M. V., Martín-García, J. M., Delgado, G., Párraga, J., Carretero, M. I., & Delgado, R. (2017). Physical properties of peloids prepared with medicinal mineral waters from Lanjarón Spa (Granada, Spain). *Applied Clay Science*, 135, 465–474. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2016.10.034>
21. Fioravanti, A., Tenti, S., Giannitti, C., Fortunati, N. A., & Galeazzi, M. (2014). Short- and long-term effects of mud-bath treatment on hand osteoarthritis: A randomized clinical trial. *International Journal of Biometeorology*, 58(1), 79–86. <https://doi.org/10.1007/s00484-012-0627-6>
22. Fortunati, N. A., Fioravanti, A., Seri, G., Cinelli, S., & Tenti, S. (2016). May spa therapy be a valid opportunity to treat hand osteoarthritis? A review of clinical trials and mechanisms of action. In *International Journal of Biometeorology* (Vol. 60, Issue 1, pp. 1–8). <https://doi.org/10.1007/s00484-015-1030-x>
23. Gerencser, G., Muranyi, E., Szendi, K., & Varga, C. (2010). Ecotoxicological studies on Hungarian peloids (medicinal muds). *Applied Clay Science*, 50(1), 47–50. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2010.06.022>
24. Ghorpade, V. S., Yadav, A. V., Dias, R. J., Mali, K. K., Pargaonkar, S. S., Shinde, P. V., & Dhane, N. S. (2018). Citric acid crosslinked carboxymethylcellulose-poly(ethylene glycol) hydrogel films for delivery of poorly soluble drugs. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 783–791. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.142>
25. Glavas, N., Mourelle, M. L., Gomez, C. P., Legido, J. L., Rogan Smuc, N., Dolenec, M., & Kovac, N. (2017). The mineralogical, geochemical, and thermophysical characterization of healing saline mud for use in pelotherapy. *Applied Clay Science*, 135, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2016.09.013>
26. Gomes, C., Carretero, M. I., Pozo, M., Maraver, F., Cantista, P., Armijo, F., Legido, J. L., Teixeira, F., Rautureau, M., & Delgado, R. (2013). Peloids and pelotherapy: Historical evolution, classification and glossary. *Applied Clay Science*, 75–76, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2013.02.008>
27. Guimarães, I., Baptista-Silva, S., Pintado, M., & Oliveira, A. L. (2021). Polyphenols: A promising avenue in therapeutic solutions for wound care. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(3), 1–20. <https://doi.org/10.3390/app11031230>
28. Hidayah, N. N., & Abidin, S. Z. (2017). The evolution of mineral processing in extraction of rare earth elements using solid-liquid extraction over liquid-liquid extraction: A review. *Minerals Engineering*, 112(July), 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2017.07.014>
29. Jacob, K. K., Prashob Peter, K. J., & Chandramohanakumar, N. (2019). Humic substances as a potent biomaterials for therapeutic and drug delivery system – a review. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 11(3), 1–4. <https://doi.org/10.22159/ijap.2019v11i3.31421>
30. Jarukas, L., Ivanauskas, L., Kasparaviciene, G., Baranauskaite, J., Marksa, M., & Bernatoniene, J. (2021). Determination of Organic Compounds, Fulvic Acid, Humic Acid, and Humin in Peat and Saproel Alkaline Extracts. *Molecules*, 26(10), 2995. <https://doi.org/10.3390/molecules26102995>

31. Ji, Y., Zhang, A., Chen, X., Che, X., Zhou, K., & Wang, Z. (2016). Sodium humate accelerates cutaneous wound healing by activating TGF- β /Smads signaling pathway in rats. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(2), 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.01.009>
32. Jurcsik, I. (1994). Possibilities of applying humic acids in medicine (wound healing and cancer therapy). *Elsevier Science B.V.*, 1331–1336. <https://www.serravit.com.tr/wp-content/uploads/2020/08/Possibilities-of-applying-humic-acids-in-medicine-wound-healing-and-cancer-therapy.pdf>
33. Klavina, A., Auce, A., Pavlovskā, I., & Vanadzins, I. (2020). Freshwater Sapropel: Biologically Active Components and Methods of Extraction. *Proceedings of CBU in Natural Sciences and ICT*, 1, 37–46. <https://doi.org/10.12955/pns.v1.119>
34. Klavina, A., Auce, A., Vanadzins, I., Silova, A., & Dobkevica, L. (2019). Extraction of biologically active components from freshwater sapropel. Environment. Technology. Resources. *Proceedings of the International Scientific and Practical Conference*, 3, 114. <https://doi.org/10.17770/etr2019vol3.4135>
35. Kļaviņa, A., Reste, J., Mārtiņšone, I., Vanadziņš, I., Juhņeviča, I., & Pavlovskā, I. (2025). Sapropel-enriched sodium carboxymethyl cellulose gel systems: formulation approaches, stability and bioactive potential. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 9, 100669. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2025.100669>
36. Kļaviņa, A., Reste, J., Mārtiņšone, I., Vanadziņš, I., Lece, A., & Pavlovskā, I. (2024). Unlocking the Therapeutic Potential of Freshwater Sapropel Extracts: In Vitro Analysis and Antioxidant Profiling for Skincare Applications. *Medicina*, 60(4), 546. <https://doi.org/10.3390/medicina60040546>
37. Lamar, R. T., Olk, D. C., Mayhew, L., & Bloom, P. R. (2014). A new standardized method for quantification of humic and fulvic acids in humic ores and commercial products. In *Journal of AOAC International* (Vol. 97, Issue 3, pp. 721–730). <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-393>
38. Latvian lakes database: ezeri.lv. *Datubase*. Retrieved 4 March 2019, from <https://www.ezeri.lv/database/>
39. Luhila, Ö., Paalme, T., Tanilas, K., & Sarand, I. (2022). Omega-3 fatty acid and B12 vitamin content in Baltic algae. *Algal Research*, 67, 102860. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2022.102860>
40. McDonnell, C., & Tiwari, B. K. (2017). Ultrasound: A Clean, Green Extraction Technology for Bioactives and Contaminants. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 76, 111–129. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2017.03.005>
41. Mirza, Mohd. A., Ahmad, N., Agarwal, S. P., Mahmood, D., Anwer, M. K., & Iqbal, Z. (2011). Comparative evaluation of humic substances in oral drug delivery. *Results in Pharma Sciences*, 1(1), 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.rinphs.2011.06.001>
42. Mo, Y., Wang, H., Jin, S., Peng, K., Yang, Z., Li, P., & Chen, Y. (2022). Preparation and properties of a fast curing carboxymethyl chitosan hydrogel for skin care. *Polymer Testing*, 113, 107667. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMERTESTING.2022.107667>
43. Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A., & Yar, M. S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178, 687–704. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2019.06.010>
44. Obuka, V., Boroduskis, M., Ramata-Stunda, A., Klavins, L., & Klavins, M. (2018). Sapropel processing approaches towards high added-value products. *Agronomy Research*, 16(Special Issue 1), 1142–1149. <https://doi.org/10.15159/AR.18.119>
45. Odabasi, E., Gul, H., Macit, E., Turan, M., & Yildiz, O. (2007). Lipophilic components of different therapeutic mud species. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* (New York, N.Y.), 13(10), 1115–1118. <https://doi.org/10.1089/acm.2007.0504>
46. On Environmental Impact Assessment (1998). <https://likumi.lv/ta/en/en/id/51522>
47. Ozkan, A., Sen, H. M., Sehitoglu, I., Alacam, H., Guven, M., Aras, A. B., Akman, T., Silan, C., Cosar, M., & Karaman, H. I. O. (2015). Neuroprotective Effect of Humic Acid on Focal Cerebral Ischemia Injury: an Experimental Study in Rats. *Inflammation*, 38(1), 32–39. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-0005-0>

48. Pavlovska, I., Klavina, A., Auce, A., Vanadzins, I., Silova, A., Komarovska, L., Silamikele, B., Dobkevica, L., & Paegle, L. (2020). Assessment of sapropel use for pharmaceutical products according to legislation, pollution parameters, and concentration of biologically active substances. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78498-6>
49. Pena-Mendez, E. M., Havel, J., & Patocka, J. (2005). Humic substances – compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine*, 3(1), 13–24. <https://doi.org/10.32725/jab.2005.002>
50. Phelan, K., & May, K. M. (2016). Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture. *Current Protocols in Toxicology*, 70, A.3B.1–A.3B.22. <https://doi.org/10.1002/cptx.13>
51. Phelan, K., & May, K. M. (2017). Mammalian Cell Tissue Culture. *Current Protocols in Human Genetics*, 94, A.3G.1–A.3G.22. <https://doi.org/10.1002/cphg.41>
52. Pornpitchanarong, C., Rojanarata, T., Opanasopit, P., Ngawhirunpat, T., Bradley, M., & Patrojanasophon, P. (2022). Maleimide-functionalized carboxymethyl cellulose: A novel mucoadhesive polymer for transmucosal drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 288, 119368. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119368>
53. Preece, K. E., Hooshyar, N., Krijgsman, A., Fryer, P. J., & Zuidam, N. J. (2017). Intensified soy protein extraction by ultrasound. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 113, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2016.09.003>
54. Rensburg van, C. E. J. (2015). The Antiinflammatory Properties of Humic Substances: A Mini Review. *Phytotherapy Research*, 29(6), 791–795. <https://doi.org/10.1002/ptr.5319>
55. Routh, H. (1996). Balneology, mineral water, and spas in historical perspective. *Clinics in Dermatology*, 14(6), 551–554. [https://doi.org/10.1016/S0738-081X\(96\)00083-1](https://doi.org/10.1016/S0738-081X(96)00083-1)
56. Ryzhova, G. L., Tyunina, M. A., & Dychko, K. A. (2013). Determination of Fatty Acids in Sapropel Products by Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry (RUS)*, 68(8), 808–814. <https://doi.org/10.7868/S0044450213080112>
57. Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). (2021). *The SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and Their Safety Evaluation*, 11th Revision.
58. Sim, P., Strudwick, X. L., Song, Y., Cowin, A. J., & Garg, S. (2022). Influence of Acidic pH on Wound Healing In Vivo: A Novel Perspective for Wound Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13655. <https://doi.org/10.3390/ijms232113655>
59. Stankevica, K., & Klavins, M. (2014). Sapropel and Its Application Possibilities. *Material Science and Applied Chemistry*, 29(29), 109. <https://doi.org/10.7250/msac.2013.028>
60. Stankevica, K., Vincevica-Gaile, Z., & Klavins, M. (2016). Freshwater sapropel (gyttja): its description, properties and opportunities of use in contemporary agriculture. *Agronomy Research*, 14(3), 929–947.
61. Stojkov, G., Niyazov, Z., Picchioni, F., & Bose, R. K. (2021). Relationship between Structure and Rheology of Hydrogels for Various Applications. *Gels*, 7(4), 255. <https://doi.org/10.3390/gels7040255>
62. Strus, O., Fedorovska, M., Holota, S., & Polovko, N. (2021). Development and validation of standardization methods of aqueous sapropel extract. *Pharmacia*, 68(4), 933–939. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.68.e71783>
63. Suraganova, S., Yessengabylova, A., Bissekov, A., Sarbassov, Y., & Kaiser, B. (2014). Sanitary and microbiological researches of therapeutic muds of the deposit “Kossor” of the Almaty oblast. *Life Science Journal*, 11(9), 276–279. <https://doi.org/10.7537/marslsj110914.38>
64. Technical Committee: ISO/TC 228. (2018). ISO 21426:2018 Tourism and related services – Medical spas – Service requirements. In International Standard confirmed [90.93] (Issue 1, pp. 1–29). <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:70912:en>
65. The European Pharmacopoeia 11th Edition (2023).
66. Tserenpil, S., Dolmaa, G., & Voronkov, M. G. (2010). Organic matters in healing muds from Mongolia. *Applied Clay Science*, 49(1–2), 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2010.04.002>

67. Vanadziņš, I., Mārtiņšone, I., Kļaviņa, A., Komarovska, L., Auce, A., Dobkeviča, L., & Sprūdža, D. (2022). Sapropel – Mining Characteristics and Potential Use in Medicine. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. *Natural, Exact, and Applied Sciences*, 76(2), 188–197. <https://doi.org/10.2478/prolas-2022-0029>
68. Vanadzins, I., Pavlovskā, I., Martinsone, I., Sprudza, D., Silova, A., Dobkevica, L., Komarovska, L., Auce, A., Paegle, L., Muiznieks, A., Klavina, A., Blake, I., Silamikele, B., Ribinska, L., & Cerpakovska, Z. (2020a). Guidelines for stability tests, use and preservation of therapeutic properties of sapropel.
69. Vanadzins, I., Pavlovskā, I., Martinsone, I., Sprudza, D., Silova, A., Dobkevica, L., Komarovska, L., Auce, A., Paegle, L., Muiznieks, A., Klavina, A., Blake, I., Silamikele, B., Ribinska, L., & Cerpakovska, Z. (2020b). Sapropel Extraction Guidelines.
70. Veniale, F., Bettero, A., Jobstraibizer, P. G., & Setti, M. (2007). Thermal muds: Perspectives of innovations. *Applied Clay Science*, 36(1–3), 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2006.04.013>
71. Vinatoru, M., Mason, T. J., & Calinescu, I. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*, 97, 159–178. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002>
72. Wach, R. A., Mitomo, H., Nagasawa, N., & Yoshii, F. (2003). Radiation crosslinking of carboxymethylcellulose of various degree of substitution at high concentration in aqueous solutions of natural pH. *Radiation Physics and Chemistry*, 68(5), 771–779. [https://doi.org/10.1016/S0969-806X\(03\)00403-1](https://doi.org/10.1016/S0969-806X(03)00403-1)
73. Wellens, J., Vermeire, S., & Sabino, J. (2022). The Role of Carboxymethylcellulose in Health and Disease: Is the Plot Thickening? *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2022.01.007>
74. Winkler, J., & Ghosh, S. (2018). Therapeutic Potential of Fulvic Acid in Chronic Inflammatory Diseases and Diabetes. *Journal of Diabetes Research*, 2018, 5391014. <https://doi.org/10.1155/2018/5391014>
75. Witkowska, D., Słowik, J., & Chilicka, K. (2021). Heavy Metals and Human Health: Possible Exposure Pathways and the Competition for Protein Binding Sites. *Molecules*, 26(19), 6060. <https://doi.org/10.3390/molecules26196060>
76. Wui, T., Amlizan, N., Wong, T. W., & Ramli, N. A. (2014). Carboxymethylcellulose film for bacterial wound infection control and healing. *Carbohydrate Polymers*, 112, 367–375. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.002>
77. Zykova, M., Schepetkin, I., Belousov, M., Krivoshechekov, S., Logvinova, L., Bratishko, K., Yusubov, M., Romanenko, S., & Quinn, M. (2018). Physicochemical Characterization and Antioxidant Activity of Humic Acids Isolated from Peat of Various Origins. *Molecules*, 23(4), 753. <https://doi.org/10.3390/molecules23040753>