



Aigars Reinis

***Staphylococcus epidermidis* un
Pseudomonas aeruginosa adhēzijas
un kolonizācijas intensitātes noteikšana
uz oriģināli sintezētu biomateriālu
virsmas *in vitro* un *in vivo* pētījumos
un to ietekme uz iekaisuma citokīnu
ekspresiju audos**

Promocijas darbs
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai
Specialitāte – medicīnas mikrobioloģija

Rīga, 2016

Aigars Reinis

Staphylococcus epidermidis un
Pseudomonas aeruginosa adhēzijas un
kolonizācijas intensitātes noteikšana uz oriģināli
sintezētu biomateriālu virsmas *in vitro* un *in vivo*
pētījumos un to ietekme uz iekaisuma citokīnu
ekspresiju audos

Promocijas darbs
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – medicīnas mikrobioloģija

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. habil. med. profesors **Jānis Vētra**

Dr. med. profesore **Juta Kroiča**

Darba zinātniskā konsultante:

Dr. habil. med. profesore **Māra Pilmane**

ANOTĀCIJA

Šī darba mērķis bija izpētīt *Staphylococcus epidermidis* un *Pseudomonas aeruginosa* adhēzijas un kolonizācijas intensitāti uz Latvijā oriģināli sintezētu biomateriālu virsmas *in vitro* pētījumā, kā arī izvērtēt šo baktēriju kolonizācijas intensitāti *in vivo* un izpētīt to ietekmi uz iekaisuma citokīnu (IL-10, TNF- α) un antimikrobo peptīdu (β defensīns-2) ekspresiju audos.

Zinot, ka normālās mikrofloras pārstāvjiem piemīt spēja kolonizēt organismā implantētos objektus, izraisot ar implantiem saistītās infekcijas, pētījuma gaitā bija nepieciešams noskaidrot, kuriem biomateriāliem pēc to sastāva un iegūšanas tehnoloģijas ir mazāka spēja piesaistīt baktērijas, līdz ar to – arī lielāka praktiskās izmantošanas perspektīva.

Pētījumā tika izmantoti 32 oriģināli ar dažādu ķīmisko sastāvu sintezēti un pēc atšķirīgām tehnoloģijām iegūti biomateriālu veidi.

HAp/TiO₂ un HAp/Ag biomateriālu virsmai baktērijas piesaistījās un to kolonizēja ievērojami mazāk intensīvi, līdz ar to šādus materiālus būtu nepieciešams attīstīt tālāk un rekomendēt praktiskai pielietošanai. *In vivo* pētījumos ar stikla keramikas biomateriāliem tika noteikts, ka, salīdzinot ar *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* biomateriālus kolonizē intensīvāk. Savukārt pseidomonām ir tendence izraisīt β defensīna-2 produkcijas izsīkumu audos, bet pārējo eksperimentā noteikto citokīnu ekspresijas intensitātes samazinājumu novērojām audu paraugos tikai pēc 3 mēnešu ekspozīcijas.

ANNOTATION

Aim of this work was to investigate in vitro the adhesion and colonization intensity of the *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on surfaces of biomaterials originally synthesized in Latvia, as well as to assess bacterial colonization intensity in vivo, and to study its effects on expression of inflammatory cytokines (IL-10, TNF- α) and antimicrobial peptides (beta-defensin-2) in tissues.

The normal microflora representatives have the ability to colonize the implanted objects which can cause implant-related infections; therefore during the research it was necessary to clarify biomaterials according to their chemical composition, manufacturing, and with ability to resist bacteria. Considering these features the most prospective biomaterials were chosen.

In this study we used 32 originally synthesized biomaterials with different chemical compositions and different types of manufacturing.

In vitro research showed that bacterial adhesion and colonization of HAp/TiO₂ and HAp/Ag containing biomaterials was much less intense. Therefore these biomaterials were recommended for further development and practical application.

The in vivo study discovered that ceramic biomaterials were colonized more intensely by *P. aeruginosa* than by *S. epidermidis*. Studies also showed that *Pseudomonas* tend to cause the depletion of β -defensin-2 production in the tissue, while after 3 months of exposure the expression of all cytokines was decreased in tissue samples only.

IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI

ATCC	– Amerikas tīrkultūru kolekcija
BCP	– bifāziskais kalcija fosfāts
EPS	– ekstracelulāra polimēra substance
HAp	– hidroksiapatīts
Il	– interleikīns
KVV	– koloniju veidojošās vienības
MHC	– galvenais audu saderības komplekss
<i>P. acnes</i>	– <i>Propionibacterium acnes</i>
PGE	– prostaglandīns
PIA	– polisaharīdu intracelulārie adhezīni
<i>P. aeruginosa</i>	– <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PSA	– kapsulārie polisaharīdu adhezīni
<i>S. epidermidis</i>	– <i>Staphylococcus epidermidis</i>
SEM	– skenējošā elektronmikroskopija
TSA	– triptikāzes sojas agars
TCP	– trikalcijfosfāts
Th	– T līdzētājšūnas subpopulācija (angl. <i>T helper</i>)
TiO ₂	– titāna dioksīds
TNF	– tumora nekrozes faktors
TSB	– triptikāzes sojas buljons

SATURS

Anotācija.....	2
Annotation.....	3
Izmantotie saīsinājumi	4
1. IEVADS.....	8
1.1. Darba mērķis.....	10
1.2. Darba uzdevumi.....	10
1.3. Darba hipotēzes.....	10
1.4. Darba novitāte.....	10
1.5. Personīgais ieguldījums.....	11
2. LITERATŪRAS APSKATS.....	12
2.1. Biomateriāli un ar tiem saistītais hospitalās infekcijas risks.....	12
2.1.1. Etioloģiskie aģenti un patogēnēze.....	12
2.1.2. Diagnostikas metodes.....	14
2.2. Biokeramikas un bioaktīvā stikla biomateriālu veidi un izmantošana.....	17
2.3. Hidroksilapatītu un trikalcija fosfātu biomateriāla veidi un izmantojums.....	18
2.4. Titāna oksīdu (TiO ₂) saturošo biomateriālu veidi un to izmantojums.....	19
2.5. Dažādu baktēriju adhēzijas un kolonizācijas mehānismi uz biomateriālu virsmas <i>in vitro</i> un <i>in vivo</i> modeļos.....	21
2.5.1. <i>S. epidermidis</i> adhēzijas un kolonizācijas mehānismi.....	21
2.5.2. <i>P. aeruginosa</i> adhēzijas un kolonizācijas mehānismi.....	23
2.6. Iekaisuma citokīni un antimikrobie peptīdi.....	26
2.6.1. Tumora nekrozes faktora α (TNF- α) raksturojums.....	26
2.6.2. Beta defensīni 2, 3 un to raksturojums.....	27
2.6.3. Interleikīna-10 (IL-10) raksturojums.....	28
3. MATERIĀLS UN METODEDES.....	30
3.1. Pētījumā izmantotie biomateriāli.....	30
3.1.1. Stikla keramikas biomateriāli.....	30
3.1.2. Kompozītmateriāli HAp/TiO ₂	32
3.1.3. Sintētiskie kalcija fosfātu saturošie biomateriāli.....	33
3.1.4. Hap/Ag saturošie biomateriāli.....	34
3.2. Pētījumā izmantotie mikroorganismi.....	34
3.3. Mikroorganismu adhēzijas noteikšana <i>in vitro</i>	34
3.4. Mikroorganismu kolonizācijas noteikšana <i>in vitro</i>	35

3.5. Mikroorganismu kolonizācijas noteikšana <i>in vivo</i>	35
3.6. Iekaisuma citokīnu ekspresijas noteikšana noteikšana <i>in vivo</i>	36
3.7. Statistikas metodes.....	37
4. REZULTĀTI.....	38
4.1. Stikla keramikas biomateriāli – <i>in vitro</i> un <i>in vivo</i> izpēte.....	38
4.1.1. Baktēriju adhēzija <i>in vitro</i> uz stikla keramikas biomateriālu paraugiem.....	38
4.1.2. Baktēriju kolonizācija <i>in vitro</i> uz stikla keramikas biomateriālu paraugiem.....	41
4.1.3. Stikla keramikas biomateriālu izmeklēšanas rezultāti ar skenējošo elektronmikroskopiju.....	45
4.1.4. Stikla keramikas biomateriālu kolonizācija <i>in vivo</i>	52
4.1.5. Stikla keramikas biomateriālu imūnhistoķīmisko pētījumu atrade.....	54
4.1.5.1. Citokīnu ekspresija audos ap kontroles grupas paraugiem.....	54
4.1.5.2. Citokīnu ekspresija audos ap stikla keramikas paraugiem, kas kontaminēti ar <i>S. epidermidis</i>	56
4.1.5.3. Citokīnu ekspresija audos ap stikla keramikas paraugiem, kas kontaminēti ar <i>P. aeruginosa</i>	60
4.2. Baktēriju adhēzijas un kolonizācijas <i>in vitro</i> izvērtēšana uz TiO ₂ /HAp kompozītmateriāliem.....	62
4.2.1. Izmantotie paraugi.....	63
4.2.2. <i>S. epidermidis in vitro</i> adhēzijas izvērtējums uz TiO ₂ /HAp kompozītmateriālu virsmas.....	63
4.2.3. <i>P. aeruginosa in vitro</i> adhēzijas izvērtējums uz TiO ₂ /HAp kompozītmateriālu virsmas.....	64
4.2.4. <i>S. epidermidis</i> un <i>P. aeruginosa in vitro</i> kolonizācijas izvērtējums uz TiO ₂ /Hap kompozītmateriālu virsmas.....	66
4.2.5. TiO ₂ /HAp kompozītmateriālu izmeklēšanas rezultāti ar skenējošo elektronmikroskopiju.....	68
4.3. Baktēriju adhēzijas un kolonizācijas intensitāte <i>in vitro</i> sintētisko kalcija fosfātu biomateriālu virsmā.....	72
4.3.1. Baktēriju adhēzijas intensitāte uz sintētisko kalcija fosfātu biomateriālu virsmas.....	72
4.3.2. Baktēriju kolonizācijas intensitāte uz sintētisko kalcija fosfātu saturošo biomateriālu virsmas.....	74
4.4. Baktēriju adhēzijas un kolonizācijas intensitāte <i>in vitro</i> hidroksiapatītu un sudrabu (HAp un Ag) saturošo biomateriālu virsmā.....	76
4.4.1. Baktēriju adhēzijas intensitāte <i>in vitro</i> Hap un Ag saturošo biomateriālu virsmā.....	76
4.4.2. Baktēriju kolonizācijas intensitāte <i>in vitro</i> Hap un Ag saturošo biomateriālu virsmā.....	78
5. DISKUSIJA.....	83
6. SECINĀJUMI.....	91
7. PRAKTISKĀS REKOMENDĀCIJAS.....	92

8. AR PĒTĪJUMU SAISTĪTĀS PUBLIKĀCIJAS.....	93
9. LITERATŪRAS SARAKSTS.....	99
Pateicības	106

1. IEVADS

Pēdējos gados Latvijā praktiskajā medicīnā bojātu kaulaudu reģenerācijai (*Bērziņa-Cimdiņa et al., 2011; Pavlova et al., 2011; Šalms et al., 2002*) aizvien plašāk sāk izmantot oriģināli sintezētu biokeramiku, kas satur hidroksiapatītu un bioaktīvos stiklus uz silikātu bāzes. Hidroksiapatīts kā galvenais dabīgā kaula minerāls veido tiešu saiti ar audiem, bez fibrozās kapsulas starpslāņa, un tas mazāk piesaista mikroorganismus. Tomēr nav apmierinoša hidroksiapatīta lēnā biodegradācija un mazā bioaktivitāte, tādēļ turpinās citu – bioloģiski aktīvāku – materiālu meklēšana un sintēze, modificējot apatīta struktūru vai pilnveidojot bioaktīvo stiklu materiālus (*Pavlova et al., 2011; Hench et al., 1997*).

Mūsdienās jaunu vielu radīšanai izmanto arī dažādu materiālu kombinēšanu, veidojot kompozītmateriālus. Tā sauc saliktus materiālus, kas sastāv no diviem vai vairākiem komponentiem vai fāzēm, kas pēc īpašībām ir ļoti atšķirīgas, savstarpēji nešķīstošas vai maz šķīstošas un atdalītas ar labi izteiktu robežvirsmu. Kompozītu pielietojums medicīnā ir relatīvi jauns atklājums, daudzi no šiem materiāliem vēl atrodas izpētes stadijā. Taču jau tagad to izmantošana implantu un medicīnas ierīču, piemēram, katetru, izgatavošanā ir daudz plašāka, ja salīdzina ar vienkāršiem, homogēniem materiāliem. Šajā gadījumā svarīgi ievērot, lai katrs komponents un biomateriāls kopumā būtu biosaderīgs un lai tas mijiedarbotos ar cilvēka organisma audiem (*Šalms et al., 2011*). Taču ar mikroorganismiem kontaminētiem implantiem ir aprakstītas blakusparādības. Tā ir būtiska problēma, jo veicina bioplēves jeb biofilmas veidošanos. Līdz ar to tikpat svarīgi, kā pētīt biofilmas un biosaderību, ir pētīt arī mikrobu adhēziju un kolonizāciju, kā arī ar tiem saistīto implantu infekcijas risku (*Sharma, 2014; Hidron, 2008; James et al., 2001*).

Saskaņā ar vairākiem pētījumiem (*Sharma, 2014 un Trampuz, 2008*) svarīgi ir noteikt baktēriju adhēzijas un kolonizācijas intensitāti *in vitro* un *in vivo*. Implantācijā izmantojamiem biomateriāliem piemīt reaktogenitāte – spēja izraisīt dažādas intensitātes makroorganisma atbildes reakciju (*Слуцкий Л., Ветра Я., 2001*). Pati atbildes reakcija pēc kvalitatīvām pazīmēm vienmēr ir vienāda – iekaisums un svešķermeņa ierobežošana ar saistaudu kapsulu, ja nav iespējams to degradēt vai izstumt laukā (*Слуцкий Л., Ветра Я., 2001*). Reaktogenitāti var ietekmēt daudzi faktori, piemēram, biomateriāla struktūra, makroorganisma īpašības, kā arī “trešais” spēks – mikroorganismi.

Pēdējo desmit gadu laikā plaši izmanto metālisko implantu pārklāšanu ar bioaktīvo HAp/TiO₂ slāni, lai uzlabotu fiksāciju starp dzīvo kaulu un implantu, lai nodrošinātu jaunu kaulu šūnu veidošanos, kā arī lai novērstu metāla koroziju. Visbiežāk pārklāti tiek titāna (Ti) un titāna sakausējuma implantanti, kas ir bioinerti materiāli (*Pavlova et al., 2011; Harle et al.,*

2006; Xiao et al., 2006; Heiman et al., 2004). HAp/TiO₂ kompozītceramikas pārklājumam ir lielāka sasaistes stiprība ar metālu, salīdzinot ar HAp bez piemaisījumiem. Palielinot TiO₂ daudzumu kompozītā, palielinās arī stiprība (Kim et al., 2005), turklāt TiO₂ piedeva var samazināt baktēriju saistīšanos pie biomateriāla (Pavlova et al., 2011), tādējādi samazinot arī iespējamo implanta kontaminācijas risku. Tomēr infekcijas risks ap TiO₂ saturošu implantu joprojām ir aktuāla problēma medicīnā (Renz et al., 2015; Zhou et al., 2009).

Biomateriālu pārbaudi reglamentē vairāki ISO standarti (ISO-10993-1-14), bet tajos nav akcentētas mikrobioloģiskās testēšanas metodes un virzieni, lai gan daudziem mikroorganismiem, bieži normālās floras pārstāvjiem, piemīt afinitāte pret organismā implantētiem mākslīgiem objektiem. Kā piemērus var minēt ādas mikrofloras stafilokokus, piemēram, *Staphylococcus epidermidis* (Renz et al., 2015; Trampuz et al., 2005; James et al., 2001), slimnīcas vidē izplatīto *Pseudomonas aeruginosa* (Renz et al., 2015; Trampuz et al., 2005) u.c. baktērijas. Līdz ar to šīs baktērijas ir vienas no nozīmīgākajiem ar implantiem un biomateriāliem saistīto infekciju ierosinātājiem. Šo baktēriju spēja veidot biofilmu, kas koloniju pasargātu no organisma nespecifiskās rezistences mehānismiem, kā arī dažādie rezistences mehānismi pret antibiotiskajām vielām var vēl vairāk apgrūtināt infekcijas ārstēšanu.

Biomateriālu bakteriālai kontaminācijai ir iespējami dažādi iemesli un divi galvenie kontaminācijas ceļi:

1. Tieša implantāta kontaminācija (Gregory et al., 2015; Trampuz et al., 2005; Yuehuei, Friedman, 2000), kas ir visbiežākais ceļš. Baktērijas nokļūst uz biomateriāla virsmas ķirurģiskās operācijas laikā un to kolonizē. Bakteriālā piesārņojuma avots varētu būt pacienta ādas vai gļotādu mikroflora, gaisa, medicīnas personāla mikroflora utt.
2. Implantāta kontaminācija baktēriju hematogēnas vai limfogēnas diseminācijas ceļā (Gregory et al., 2015; Trampuz et al., 2005; Yuehuei, Friedman, 2000) no bakteriālās kontaminācijas avota – ādas un gļotādas mikrofloras un perēkļveida infekcijas.

Lai gan tiek izmantotas efektīvas aseptikas un antiseptikas metodes, mikroorganismu spēja kontaminēt un kolonizēt implantēto biomateriālu vai katetru, mākslīgo vārstuli, locītavu u.c. joprojām ir aktuāla un tā ir hospitālo infekciju attīstības riska faktors (Gregory et al., 2015; Hetrick et al., 2006).

Tāpēc arvien aktuālāki kļūst pētījumi, kuros tiek izvērtēta adhēzijas un kolonizācijas intensitāte uz biomateriāliem, lai palīdzētu izprast infekcijas procesa ietekmi uz iekaisuma reakciju audos ap implantēto biomateriālu.

1.1. Darba mērķis

Darba mērķis ir pētīt mikroorganismu adhēzijas un kolonizācijas intensitāti uz 10 oriģināli sintezētiem biomateriāliem un tās ietekmi uz iekaisuma reakciju *in vivo* un citokīnu produkciju audos.

1.2. Darba uzdevumi

1. Noteikt *Staphylococcus epidermidis* un *Pseudomonas aeruginosa* adhēzijas intensitāti uz 10 oriģināli sintezētu biomateriālu virsmas *in vitro* pētījumā.
2. Noteikt *Staphylococcus epidermidis* un *Pseudomonas aeruginosa* kolonizācijas intensitāti uz 10 oriģināli sintezētu biomateriālu virsmas *in vitro* pētījumā.
3. Noteikt *Staphylococcus epidermidis* un *Pseudomonas aeruginosa* kolonizāciju uz 10 oriģināli sintezētu biomateriālu virsmas *in vivo* pētījumā.
4. Izvērtēt iekaisuma citokīnu ekspresiju audos pēc kontaminētu biomateriālu implantēšanas *in vivo* pētījumā.

1.3. Darba hipotēzes

1. Biomateriāla virsmas īpašības, izgatavošanas tehnoloģija un ķīmiskais satāvs var būtiski ietekmēt mikroorganismu adhēzijas un kolonizācijas spējas.
2. Mikroorganismu kolonizācija uz biomateriāla ietekmē tā reaktogenitātes elementu – iekaisuma citokīnu – ekspresiju.

1.4. Darba novitāte

Darbā tika pētīti 32 dažādi, oriģināli sintezēti biomateriāli ar atšķirīgu virsmas struktūru, 29 no tiem tika izmantoti *in vitro* testēšanā, bet 3 – *in vitro* un *in vivo* testēšanā. Izpētīta šo biomateriālu spēja piesaistīt baktērijas, kā arī bakteriālās kolonizācijas intensitāte un tās ietekme uz iekaisuma mediatoru ekspresiju audos. Virsmas īpašības tika mērķtiecīgi mainītas, lai samazinātu baktēriju adhēzijas un kolonizācijas intensitāti un baktēriju kolonizācijas ietekmi uz iekaisuma mediatoru ekspresiju audos. *In vivo* pētījumu veikšanai tika saņemta Pārtikas un veterinārā dienesta izmēģinājuma projekta atļauja Nr. 24 dzīvnieka izmantošanai procedūrā.

Pirmo reizi Latvijā pētāmo baktēriju atdalīšanai no biomateriāla parauga tika ieviesta sonikācijas metode, kas jau daudzus gadus ir populāra Rietumeiropā. Pirmo reizi Latvijā uzsākti pētījumi, lai noskaidrotu, kā mikroorganismi varētu ietekmēt citokīnu ekspresiju audos ap implantēto biomateriāla paraugu, kas bijis kontaminēts ar mikroorganismiem.

1.5. Personīgais ieguldījums

Autors pats ir veicis visus *in vitro* un *in vivo* pētījumus: kontaminējis biomateriālu paraugus un praktiski veicis baktēriju adhēzijas un kolonizācijas bakterioloģiskos izmeklējumus (1700 analīzes); asistējis laboratorijas dzīvnieku ķirurģiskajās operācijās; asistējis imūnhistoķīmisko preparātu pagatavošanas procesā, personīgi veicis to mikroskopisko analīzi iekaisuma citokīnu ekspresijas noteikšanai (162 mikroskopisko preparātu analīzes).

2. LITERATŪRAS APSKATS

2.1. Biomateriāli un ar tiem saistītais hospitālās infekcijas risks

2.1.1. Etioloģiskie aģenti un patoģenēze

Biomateriālus praktiskajā medicīnā izmanto ļoti plaši: mākslīgo locītavu, kaulaudu aizvietošanai, zobu implantiem, mākslīgajiem sirds vārstuļiem u.c. Piemēram, mākslīgo locītavu protezēšana mūsdienās kļūst aizvien aktuālāka, jo sabiedrība noveco. Tiek uzskatīts, ka turpmākajos 20 gados tā kļūs vēl aktuālāka (*Kurtz et al., 2007*). Protēžu infekcija nav ļoti izplatīta (1–3% gadījumu), tomēr to komplikācijas var būt smagas (*Ong et al., 2009; Kurtz et al., 2007*). Biežāk ar implantētām ierīcēm saistītās infekcijas veidojas, ja tiek lietoti katetri, lūzumu fiksācijas ierīces, zobu implantu un mākslīgās locītavas (*Darouiche et al., 2001*)

(2.1. tabula).

2.1. tabula

Biežākās ar implantētām ierīcēm saistītās infekcijas un iespējamais mirstības risks (adaptēta no *Darouiche RO. CID 2001;33:1567*)

Ierīce	Pielietojumu skaits gada laikā ASV, n	Infekcijas biežums, %	Iespējamais mirstības risks
Urīnpūšļa katetri	> 30 000 000	10–30	zems
Centrālie venozie katetri	5 000 000	3–8	vidējs
Lūzumus fiksējošas ierīces	2 000 000	5–10	zems
Zobu implantu	1 000 000	5–10	zems
Locītavu protēzes	600 000	1–3	zems
Asinsvadu implantu	450 000	1–5	vidējs
Sirdsdarbības stimulatori	300 000	1–7	vidējs
Krūšu implantu	130 000	1–2	zems
Mākslīgie sirds vārstuļi	85 000	1–3	augsts
Dzimumlocekļu implantu	15 000	1–3	zems

Ir zināmi divi galvenie ceļi, kā implantētie objekti kļūst par baktēriju mērķi:

- 1) implanta tieša kontaminācija ar baktērijām ķirurģiskas procedūras laikā. Baktērijas nokļūst uz biomateriāla virsmas ķirurģiskās operācijas laikā un to kolonizē. Bakteriālā piesārņojuma avots varētu būt pacienta ādas vai gļotādas mikroflora, gaisa, medicīnas personāla mikroflora utt. (*Zimmerli, Trampuz, Ochsner, 2004*);

2) baktērijas nokļūšana līdz implantam hematogēnas diseminācijas ceļā, izraisot vēlīnu implantu infekciju. Bakteriālās kontaminācijas avots – ādas un gļotādas mikroflora, kā arī fokālie infekcijas perēkļi (*Zimmerli, Trampuz, Ochsner, 2004*).

Pēc mikroorganisma piesaistīšanās implantētajam biomateriālam tajā notiek fenotipiskas izmaiņas un baktērija no planktoniskās (brīvi eksistējošas) fāzes kļūst par pie virsmas saistīto fāzi. Pie implantētā biomateriāla virsmas piesaistītās baktērijas sāk sekretēt ekstracelulāras gļotas, kas klājas aizvien biežākā slānī un veido matriksu – glikokaliksu. Baktērijām savairojoties, glikokalikss satur kopā baktēriju koloniju uz implanta, veidojot biofilmu (*Costerton, 1999*).

No biofilmu veidojošiem ierosinājumiem kā nozīmīgākie jāmin stafilokoki – gan koagulāzes pozitīvie *Staphylococcus aureus*, gan koagulāzes negatīvie stafilokoki, piemēram, *S. epidermidis*. Stafilokoki kā etioloģiskie aģenti ierosina apmēram 25% gadījumu no visām implantu infekcijām. Gramnegatīvie mikroorganismi, piemēram, *Pseudomonas aeruginosa*, ir otrs ar biomateriāliem saistītajām infekcijām nozīmīgākais etioloģiskais aģents (*Peel et al., 2012*). Ir pierādīta arī daudzu citu mikroorganismu, piemēram, enterokoku, streptokoku un patogēno sēņu, loma implantu infekciju ierosināšanā. Savukārt *Propionibacterium acnes* ir ādas rezidentās mikrofloras pārstāvis, un 40% gadījumu tas tiek saistīts ar pleca locītavas protēzes infekciju (*Piper et al., 2009; Zeller et al., 2007*).

Tātad ar biofilmu pārklātā mikroorganismu kolonija, atrodoties uz biomateriāla, var ierosināt ar implantiem saistīto infekciju, kuras patogēnēzes izpratnei tiek piedāvāta šāda klasifikācija (*Trampuz, 2008; Zimmerli, 2005; Murdoch, 2001*):

- 1) agrīna infekcija, kas veidojas pirmo 3 mēnešu laikā pēc implantācijas – parasti tiek iegūta implantēšanas procedūras laikā vai pirmo 2–4 dienu laikā. To ierosina tādi virulentī mikroorganismi kā *S. aureus* un vairākas gramnegatīvās nūjiņas;
- 2) aizkavējusies (subakūta, novēlota) zemas intensitātes infekcija, kas arī iegūta implantēšanas procedūras laikā, bet to ierosina mikroorganismi ar zemu virulenci, ādas mikrofloras pārstāvji, piemēram, koagulāzes negatīvie stafilokoki (*S. epidermidis*) un *Propionibacterium acnes*. Infekcija attīstās vidēji lēni, 3–24 mēnešu laikā;
- 3) vēlīna infekcija, kas veidojusies hematogēnas vai limfogēnas diseminācijas rezultātā, var attīstīties vairāku gadu laikā. Pacientam nav sūdzību, kas saistītas ar implantu, bet attīstās bakteriēmija un pat sepse.

2.1.2. Diagnostikas metodes

Ar biomateriāliem saistīto infekciju noteikšanā ir grūti izvēlēties pilnībā ideālu diagnostikas metodi ar augstu specifitāti un jutību. Līdz ar to zinātnieki iesaka kombinēt laboratoriskos, histopatoloģiskos, mikrobioloģiskos un attēlveidošanas izmeklējumus (*Trampuz et al., 2013, 2007, 2003*). Vislabākais variants, protams, būtu diagnosticēt un līdz ar to arī izslēgt infekciju pirms implantācijas operācijas veikšanas, jo, zinot konkrēto patogēno aģentu, iespējams sākt vispareizāko preoperatīvo antibakteriālo terapiju un izplānot pareizu operācijas vadību.

Mikrobioloģiskā izmeklēšana ietver sevī šādus diagnostiskos virzienus (*Trampuz et al., 2013, 2010, 2007, 2003*):

1. Preoperatīvā parauga izmeklēšana – šajā gadījumā kā uzsējums varētu kalpot materiāls, kas paņemts no ādas apkārt operācijas brūcei, bet ir jāņem vērā, ka uzsējums var uzrādīt maldinošus rezultātus, jo pastāv risks, ka pārsvarā gadījumu tiks izaudzēta ādas normālā mikroflora.

2. Intraoperatīvā parauga izmeklēšana – to uzskata par visefektīvāko, jo paraugos, kas ņemti no audiem, kuri aptvers implantu, visprecīzāk var noteikt potenciālo, ar implantiem saistīto infekciju ierosinātāju (*Pandey et al., 2000; Spangehl et al., 1999; Atkins et al., 1998*). Sakarā ar to, ka uztriepju mikroskopija ir orientējošā metode ar zemu diagnostisko jutību, iesaka paņemt vismaz 3 paraugus (*Trampuz et al., 2013, 2010, 2007, 2003; Atkins et al., 1998*). Gadījumā, ja pirms operācijas ir bijusi ilgstoša terapija ar antibiotiskajiem līdzekļiem, ir ieteicams to pārtraukt vismaz divas nedēļas pirms parauga paņemšanas (*Trampuz et al., 2013, 2010, 2007, 2003; Spangehl et al., 1999*). Savukārt, ja nepieciešama perioperatīvā profilakse, to varētu uzsākt tikai pēc tam, kad ir savākti paraugi mikrobioloģiskajam uzsējumam (*Widmer, 2001*).

3. Izņemtā implanta vai tā daļu parauga izmeklēšana – izmeklēšanas ieguvums ir tas, ka paraugs tiek paņemts tieši no infekcijas procesa vietas. Tomēr tas neizslēdz parauga kontaminācijas risku. Kā metode, kas var paaugstināt izmeklēšanas jutību, tiek ieteikta sonikācija. Sonikācija palīdz atdalīt mikroorganismus no eksplantētās ierīces vai implanta virsmas, kam seko vai nu tieša molekulārā izmeklēšana (*Levy, Fenollar, 2012*), vai arī parauga kultivēšana, lai iegūtu un identificētu tīrkultūru (*Trampuz, 2010; Tunney et al., 1999; Narumi Ueda 2013; Dapnut 2014*). (3. attēls)

Kāpēc sonikācija?

Implantu infekcijas gadījumā mikrobioloģiskajā diagnostikā iesaka izmantot sonikācijas metodi (jutība ~ 80%), jo tā vislabāk iespējams no biomateriāla parauga atdalīt biofilmu, lai

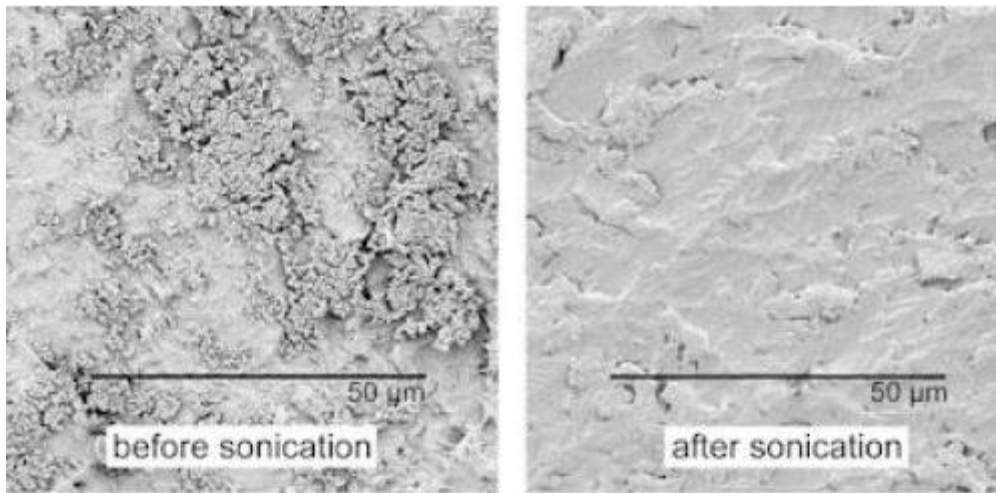
pēc tam varētu kvantitatīvi noteikt paraugā esošos mikroorganismus (*Trampuz, Piper, 2007*). Pētnieki liecina, ka ar sonikācijas metodi var izdalīt arī tādus vidē un pret barotnēm prasīgus mikroorganismus kā *P. acnes* (*Schafer P et al., 2008*).

Vibrācijas frekvenci, kas pārsniedz 18 kHz (18 000 vibrācijas sekundē), sauc par ultraskaņu. Vibrāciju rezultātā šķidrā vidē veidojas miljoniem vakuuma burbuļu. Augstspiediena fāzē tie uzsprāgst, izveidojot ļoti efektīvu spiediena vilni. Šo procesu sauc par kavitāciju, kuras efektu var izmantot dažādu daļiņu atdalīšanai no objektu virsmas. Zemākas frekvences (apmēram 20 kHz) tiek lietotas šūnu sagraušanai, jo tiek veidoti lielāka diametra burbuļi ar spēcīgāka spiediena viļņiem nekā augstākas frekvences (apm. 35 kHz) viļņu gadījumā, kas tiek izmantoti, lai tikai atdalītu šūnas vai citu organismu piesārņojumu no virsmas.

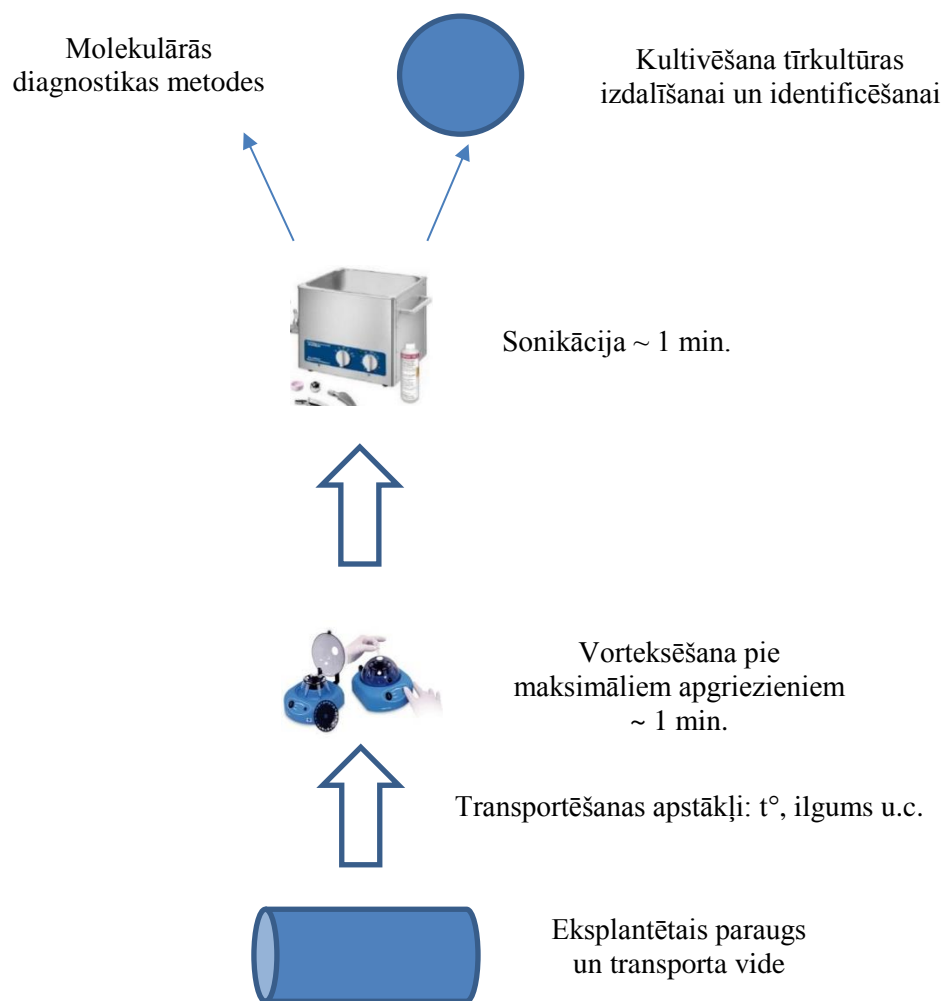
Iepriekš minētā sonikācijas tehnoloģija tiek izmantota, piemēram, BactoSonic® sonikatorā, ko kompānija piedāvā, lai no implantiem atdalītu biofilmā saistītās baktērijas (efektivitāte 99,9%), lai tālāk tās identificētu ar kultivēšanas vai citām diagnostikas metodēm (<http://monmouthscientific.co.uk/ultrasonic-baths>; 2.1., 2.2. un 2.3. attēls).



2.1. attēls. Eksplantētu biomateriālu mikrobioloģiskajai izmeklēšanai paredzētais BactoSonic® sonikators (augšā) un autora izmantotais (apakšā)



2.2. attēls. **BactoSonic® sonikatora efektivitāte**
 (Pēc sonifikācijas 99,9% no biofilmā esošajiem mikroorganismiem ir atdalīti no biomateriāla virsmas)



2.3. attēls. **Eksplantēto biomateriālu mikrobioloģiskās izmeklēšanas shēma**

Lai gan plaši tiek izmantotas aseptikas un antiseptikas metodes, mikroorganismu spēja kontaminēt un kolonizēt implantēto biomateriālu vai kādu ierīci joprojām ir aktuāla problēma un hospitālo infekciju attīstības riska faktors (*Hetric, Schoenfisch, 2006*). Tāpēc likum-sakarīgi kļūst pētījumi, lai noteiktu vienu no būtiskākajām biomateriālu īpašībām – to mikrobiālo kontaminācijas risku.

2.2. Biokeramikas un bioaktīvā stikla biomateriālu veidi un izmantošana

Bioaktīvā stikla materiālu izstrāde 20. gs. 60. gados bija atklājums un iedvesmoja jaunām un līdz šim neizmantotām iespējām medicīnā. Sākotnēji bioaktīvā stikla materiāli tika radīti, lai aizstātu kaulaudus. Vēlāk atklājās to terapeitiskās īpašības, jo materiāli izdalīja Ca^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} , Sr^{2+} , PO_3^{-4} jonus cilvēka organismā, kas uzlaboja dzīšanas procesu. Mūsdienās var izveidot Ag^+ pārklājumus uz bioaktīvā stikla, lai piešķirtu biomateriālam antibakteriālas īpašības (*Wern et al., 2012*).

Bioaktīvie stikli ir daudzu pētījumu objekts, tāpēc ir labi dokumentētas to īpašības. Piemēram, 45S5 bioaktīvajam stiklam piemīt tādas īpašības kā bioloģiskā aktivitāte, degradācijas spēja, osteokonduktivitāte un kaulu sadziedēšanas spēja. Bioaktīvajam stiklam 45S5 mijiedarbojoties ar fosfāta šķīdumu, kas ir līdzīgs ķermeņa šķidrums, uz tā izveidojas hidroksiapatītam līdzīga kārtiņa, kas nosaka tā bioloģisko aktivitāti un kaula sadziedēšanas spējas. Tomēr pētnieki apgalvo, ka 45S5 bioaktīvais stikls pārveidojas par hidroksiapatītu lēni un nepilnīgi (*Fu et al., 2012; Rahaman et al., 2011*).

Bioaktīvais stikls tiek izmantots ortopēdijā gan kā kaulu aizstājējs, gan kā pārklājums uz metāla protēzēm, lai veicinātu osteoindukciju, gan arī kā stikla / keramikas pamatne, kas atvieglo šūnu augšanu un proliferāciju pēc implantēšanās (*Ochoa et al., 2009*). Bioaktīvais stikls $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ parāda labas osteokonduktīvās un osteoinduktīvās īpašības. Tas var būt veidots kompozītmateriāls ar izteikti īpatnēju un specifisku virsmu, lai būtu biodegradējami (*Valerio et al., 2005*).

Veidojot medicīnā izmantojamus implantus, ierīces un materiālus, ir svarīgi padomāt par biomateriāliem vai biomateriālu pārklājumiem, kuri var reducēt piesaistījušos baktēriju daudzumu uz biomateriāliem, lai samazinātu ar biofilmām saistītās infekcijas risku. Ķirurģijā lietotie diegi ir biežs iemesls baktēriju kolonizācijai un infekcijas ierosināšanai, tāpēc ir svarīgi arī ķirurģiskos diegus izveidot “drošākus”. Līdzšinējos pētījumos saistībā ar ķirurģiskajiem diegiem tiek izmantotas deponētas sudraba daļiņas ar bioaktīvo stikla pulveri. Sudrabam piemīt labas antibakteriālās īpašības, turklāt tas ir gandrīz nekaitīgs cilvēka un

dzīvnieka audiem. Bioaktīvā stikla pārklājums ar deponētām sudraba daļiņām parāda daudz labākas antibakteriālās īpašības salīdzinājumā ar citiem pārklājumiem (*Pratten et al., 2004*).

Biokeramikai, piemēram, bioaktīvajam stiklam un kalcija fosfātam, piemīt osteokonduktīvas īpašības, tādējādi tā var efektīvi paātrināt kaulu audu sadzīšanu. Bioaktīvā stikla biomateriālu var izmantot, lai izveidotu bioaktīvu materiālu ar labām uzsūkšanās un biodegradācijas spējām, piemēram, izmantojot poli-L-pienskābes (PLLA) un bioaktīvo stiklu (*Zhou et al., 2007*).

2.3. Hidroksiapatītu un trikalcija fosfātu biomateriāla veidi un izmantojums

Hidroksiapatīts (HAp) un bifāziska kalcija fosfāta (BCP) biomateriāli tiek plaši izmantoti kā kaulu implanti to porainības un osteokonduktīvo īpašību dēļ. BCP, kurš sastāv no HAp un β -TCP, parāda labākas kaulu aizvietojoša implanta īpašības nekā HAp, jo β -TCP komponents ir vairāk šķīstošs un tajā ir vairāk Ca^{2+} un PO_4^{3-} jonu nekā HAp biomateriālos (*Kinnari et al., 2009*).

HAp bieži tiek izmantots titāna (Ti) biomateriālu pārklājumos. Tie var būt vienkārši HAp pārklājumi vai HAp pārklājumi kombinācijā ar citām vielām, visbiežāk šīs vielas ir ar antibakteriālām īpašībām. Viena no šādām vielām ir sudrabs (Ag), kuram piemīt plašs antibakteriālo īpašību spektrs un kas jau sen tiek izmantots brūču dzīšanā. Tomēr Ag izmantošana biomateriālu izraisītu infekciju novēršanā tādās jomās kā zobu protezēšana un ortopēdija ir maz pētīta. (*Chen et al., 2007*).

Kopš pagājušā gadsimta deviņdesmitajiem gadiem notiek aktīva fosfātu biomateriālu biosaderības un bioaktivitātes izpēte, lai izveidotu biomateriālu, kuru varētu plaši izmantot un kurš varētu novērst ar biomateriāliem saistītās infekcijas. Vieni no plašāk izmantotajiem biomateriāliem ir HAp un TCP. Ir zināms, ka TCP savās divās sastopamajās formās (α -TCP vai β -TCP) fizioloģiskā pH vidē šķīst vairāk nekā HAp. Tāpēc, kad vēlama strauja kaulu remodelācija, labāk ir izmantot bifāzisku kalcija fosfātu (BCP). Tiek izmantoti dažāda veida keramiskie materiāli, kuri sastāv no HAp, β -TCP vai BCP. To sastāvā ir 60 vai 70% HAp un 30 vai 40% β -TCP. Šādas kombinācijas ir vienas no populārākajām, ko izmanto klīniskām vajadzībām (*Santos et al., 2008*).

Kalcija fosfāts un tā atvasinājumi, tādi kā HAp ar ķīmisko formulu $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, ir biosaderīgi un bioaktīvi materiāli. HAp pirmo reizi tika lietots 1985. gadā, kad Osborns (*Capello, 2007; Osborn, 1985*) klīniskajos pētījumos novēroja, ka HAp 10 dienas pēc implanta operācijas piemīt labāka osteointegrācija. Kopš tā laika HAp mijiedarbība ar

kaulaudiem tiek plaši pētīta *in vivo* pētījumos, izmantojot dažādus dzīvniekus (Yang et al., 2005).

HAp ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ir galvenais zobu un kaulu minerālu komponents. Tas tiek plaši lietots medicīnā granulu un porainu pamatņu veidā kaulu aizstāšanā, jo ir līdzīgs dabiskai kaulu struktūrai, nav toksisks, ir osteokonduktīvs, biosaderīgs, bioaktīvs un neizsauc imūno atbildes reakciju. Šīs īpašības ir atkarīgas no HAp tīrības pakāpes, dimensijas un poru morfoloģijas. HAp piemīt daudzas priekšrocības attiecībā pret citiem biomateriāliem, piemēram, tas samazina baktēriju un sēnīšu adhēzijas spējas, tāpēc bieži vien HAp tiek izmantots pārklājumiem, piemēram, metāliskiem biomateriāliem (Belcarz et al., 2008).

HAp/TiO₂ ir viens no pārklājumu veidiem, ko var izmantot biomateriālu, visbiežāk Ti, pārklājumam. Šāds pārklājums vajadzīgs, lai uzlabotu Ti biosaderību ar apkārtējiem audiem (Lee et al., 2006).

Biomateriāla izvēle un pielietojums bieži ir pamatots ar tā saderību ar šūnām (citosaderība) un saderību ar audiem, organismu kopumā (biosaderību). Piemēram, nazālās septas operācijām biežāk izvēlas BCP vai HAp, jo šie biomateriāli parāda labāku biosaderību ar nazālo elpceļu epitēliju un citiem audiem (Gabory et al., 2010).

Ti implantu pārklāšanai var izmantot ne tikai HAp, bet, lai uzlabotu to implantu saderību ar audiem, šos biomateriālus bieži pārklāj ar kalcija fosfāta pārklājumu.

TCP ķīmiskā formula ir $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, un to raksturo ar Ca/P attiecību 1,5. TCP pastāv divos veidos: β -TCP zemās temperatūrās ir polimorfa viela, kas savukārt augstā temperatūrā, 11258 °C, pārveidojas α -TCP formā, jo tā ir nestabila ūdenī, kur β -TCP nevar iegūt. Tomēr to var iegūt, termiski apstrādājot bez kalcija HAp virs 700 °C. HAp sauc par bezkalcija HAp, kad Ca/P molārā attiecība ir zemāka par 1,67 (Narayanan et al., 2007).

2.4. Titāna oksīdu (TiO₂) saturošo biomateriālu veidi un to izmantojums

Lai arī titāns un titāna sakausējumi ir galvenie un noteicošie biomateriāli, kurus izmanto medicīnā, jo tiem ir labas biosaderības un mehāniskās īpašības, tomēr pastāv samērā augsts infekcijas risks audos ap šiem implantētajiem biomateriāliem. Šīs infekcijas vienmēr ir grūti ārstējamas, un nereti nepieciešama implanta nomainīšana. Tāpēc ir svarīgi atrast un sintezēt tādus pārklājumus, kas var novērst vai samazināt biomateriālu izraisītu infekciju risku (Zhao L et al., 2009).

Titāna implantu un to sakausējumu tiek plaši lietoti kā ķirurģiskie implantu ortopēdijā un zobārstniecībā, jo tiem raksturīga mehāniskā izturība un bioafinitāte. Lai uzlabotu Ti implantu osteointegrāciju, implantu virsma tiek pārklāta ar bioaktīviem pārklājumiem.

Titāna oksīds (TiO_2) ir izraisījis lielu interesi kā pārklājums Ti implantiem. Ti biosaderība ir saistāma ar to, ka mitros apstākļos viegli veidojas vairākus nanometrus plāna TiO_2 kārtā. Lai TiO_2 slānis efektīvi kalpotu cilvēka ķermeņa šķidrums klātbūtnē, TiO_2 slānim jābūt pietiekami biežam, lai novērstu koroziju uz Ti virsmas. Tāpēc tiek izmantotas vairākas atšķirīgas metodes, lai izveidotu TiO_2 slāni uz Ti biomateriāla virsmas (*Lee et al., 2006*).

Viens no veidiem, kā ietekmēt metāla biomateriālu implantu vadītspēju, ir pārklāt implanta virsmu ar pārklājumu. Pārklājumi no titāna, skābekļa un slāpekļa var mainīt biomateriālu īpašības tā, ka tie iegūst nepieciešamās īpašības, kas ļauj tiem pildīt paredzētās funkcijas. Šādi pārklājumi ir izplatīti saules apkures sistēmās, jo tie efektīvi absorbē saules enerģiju. Piemēram, TiNOX pārklājums samazina arī baktēriju adhēzijas spējas uz biomateriāla virsmas, līdz ar to samazina biomateriāla infekcijas attīstības risku (*Koerner et al., 2002*).

Titāna nitrīta (TiN) pārklājumu bieži izmanto titāna biomateriāla modifikācijai. Šim pārklājumam nepiemīt alergiskas īpašības, un tas palielina metālisko biomateriālu implantu bioloģisko saderību un nodilumizturību, bet neuzlabo vājās antibakteriālas īpašības. Šo trūkumu var mazināt, pār TiN uzklājot keramikas nanopārklājumu (*Belcarz et al., 2010*). Viens no veidiem, kā Ti virsma tiek pārveidota, lai vienlaikus uzlabotu kaulu šūnu saderību ar biomateriālu un antibakteriālo aktivitāti, ir anodizēšana nātrija fluorīda un sērskābes šķīdumā, lai uzlabotu biomateriāla virsmas biosaderību. Lai iegūtu biomateriālam nepieciešamās antibakteriālas īpašības, vēlāk tika elektroizgulsnētas sudraba daļiņas uz virsmas. Šādi apstrādātam Ti biomateriālam piemīt lielākas antibakteriālās īpašības salīdzinājumā ar parastiem Ti biomateriāliem (*Das et al., 2008*).

Ortopēdisko protēžu infekcija ir nevēlama un samazina implanta kalpošanas laiku. Samazinot plaša spektra baktēriju adhēziju uz biomateriāliem, ir iespējams samazināt biomateriālu izraisītās infekcijas, tādējādi sekmējot biomateriāla integrāciju cilvēka audos. Ti daļiņu nanometriskie topogrāfiskie izmēri uz biomateriāla virsmas uzlabo selektīvu olbaltumvielu adsorbciju un vēlāk osteoblastu funkcijas, kā arī samazina baktēriju adhēzijas spējas (*Puckett et al., 2010*).

2.5. Dažādu baktēriju adhēzijas un kolonizācijas mehānismi uz biomateriālu virsmas *in vitro* un *in vivo* modeļos

2.5.1. *S. epidermidis* adhēzijas un kolonizācijas mehānismi

Staphylococcus epidermidis ir koagulāzes negatīvi stafilokoki, kuri ir vieni no biežākajiem nozokomiālo infekciju izraisītājiem, un īpaši to infekciju, kuras ir saistītas ar implantētām medicīnas ierīcēm. No koagulāzes negatīvajiem stafilokokiem *S. epidermidis* ir viens no biežāk izolētajiem mikroorganismiem, kas izraisa nozokomiālo infekciju un ar biomateriāliem saistīto infekciju attīstību. Pirms daudziem gadiem koagulāzes negatīvie stafilokoki tika uzskatīti par nepatogēnām baktērijām, un, ja baktērijas tika izolētas laboratoriskos apstākļos pacienta izmeklējamā materiālā, tad šo materiālu uzskatīja par kontaminētu ar baktērijām no mikrofloras vai apkārtējās vides nepareizi savākta un transportēta materiāla dēļ. *S. epidermidis* mikroorganismi bieži vien kontaminē dažādus klīniskos pacienta materiālus un paraugus, līdz ar to apgrūtina laboratorisko diagnostiku; īpaši tas rada grūtības atšķirt īsto infekcijas ierosinātāju no viltus ierosinātāja, kas radies biomateriāla parauga kontaminācijas dēļ ar ādas mikrofloras pārstāvjiem, piemēram, *S. epidermidis*. *S. epidermidis* ir ādas un gļotādas normālās mikrofloras pārstāvji, kuriem piemīt unikāla un specifiska īpašība izdalīt gļotas, lai izveidotu biofilmu uz implantētajiem biomateriāliem.

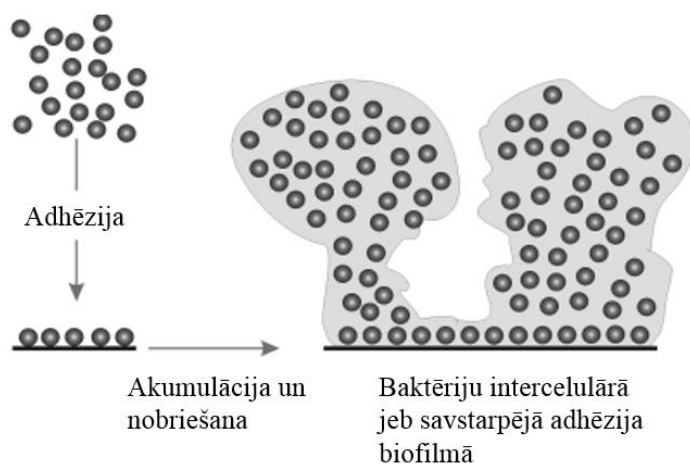
S. epidermidis spēja kolonizēt un veidot biofilmu uz biomateriālu implantiem ir atkarīga no biomateriāla sastāva un virsmas īpašībām, kā arī no mikroorganisma spējas producēt adhezīnus. Lai novērotu baktēriju veidotās biofilmas, var izmantot skenējošo elektronmikroskopijas metodi. Šī metode parāda, ka *S. epidermidis* biofilmā uz biomateriāla virsmas novietojas daudzās kārtās, un šīs daudzslāņainās baktēriju kārtas ir pārklātas ar amorfu gļotu slāni (Gara, Humphries, 2001).

Biofilmas attīstība sākas, kad baktērijas ar adhēzijas faktoriem piesaistās pie biomateriāla virsmas un sāk producēt gļotainu un līmei līdzīgu substanci, kas kalpo kā baktēriju enkurs uz biomateriāla virsmas.

Daudzi pētījumi liecina, ka *S. epidermidis* biofilmas veidošanās process sastāv no divām fāzēm, kuras nodrošina bioķīmiskie un molekulāri celulārie mehānismi. Bioķīmiskā līmenī baktēriju ekstracelulārie polisaharīdu adhezīni ieņem primāro lomu baktēriju sākotnējā adhēzijā un intercelulārajā adhēzijā jeb baktēriju savstarpējā adhēzijā. Divi nozīmīgākie polisaharīdi, kurus producē *S. epidermidis*, ir kapsulārie polisaharīdu adhezīni (PSA) un polisaharīdu intercelulārie adhezīni (PIA). Par sākotnējo jeb primāro adhēziju ir atbildīgs PSA un viens vai vairāki baktēriju proteīni, savukārt šūnu akumulāciju ietekmē PIA (Voung *et al.*,

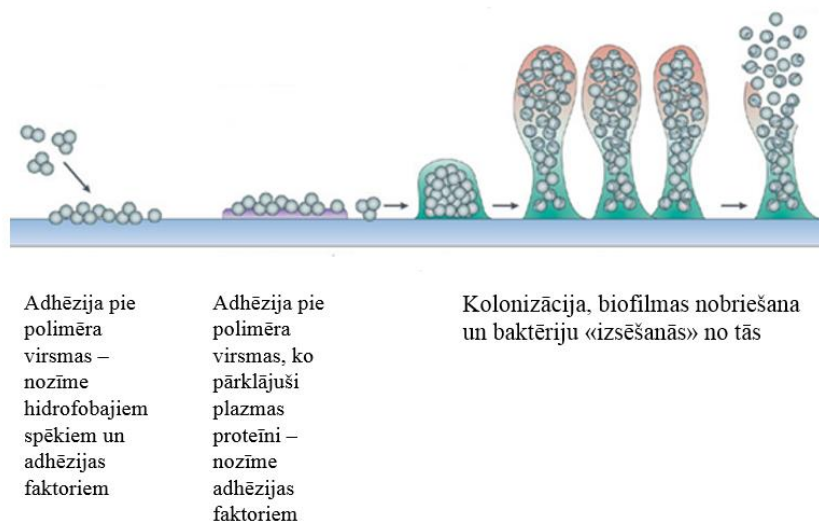
2004). *S. epidermidis* gan sintezē PIA, gan tam ir fibrinogēnu saistošie adhezīni un piemīt kolagēnu saistoša aktivitāte. Līdz ar to tas spēj piesaistīties pie biomateriāla un izveidot biofilmu (Aricola et al., 2004).

PIA produkciju baktērijā kodē *ica* operons. Tomēr nesenos pētījumos ir pierādīts, ka šis *ica* operons kodē gan PIA, gan PSA veidošanos, un PIA un PSA ir ķīmiski līdzīgi. *S. epidermidis* producētie PIA un PSA sastāv no N-acetilglikozamīna ar β -1,6 saitēm. *Ica* gēnu klasteros ietilpst visi gēni, kuri nepieciešami 22 oligosaharīdu adhezīnu producēšanai un biofilmas veidošanai, un tie ir *icaADBC*. *IcaA* gēna produkts ir transmembranāls proteīns, kas ir homologs N-acetilglukozamīnīltransferāzei. Tiek uzskatīts, ka normālai N-acetilglukozamīltransferāzes darbībai pietiek ar mazu *icaD* gēna ekspresiju. *IcaB* un *IcaD* gēnu funkcijas ir mazāk definētas un nav atbildīgas par biofilmas veidošanos (Mack et al., 2004; 2.4. un 2.5. attēls).



2.4. attēls. **Stafilokoku biofilmas veidošanās stadijas**

(Avots: http://www.uke.de/institute/infektionsmedizin/index_34896.php)



2.5. attēls. **Stafilokoku biofilmas veidošanās stadijas un iespējamais rezultāts**

(Avots: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v7/n8/fig_tab/nrmicro2182_F1.html)

2.5.2. *P. aeruginosa* adhēzijas un kolonizācijas mehānismi

Viena no svarīgākajām biofilmas sastāvdaļām ir ekstracelulāra polimēra substance, kas darbojas kā matrice un satur kopā baktēriju šūnas. *P. aeruginosa* biofilmas ir ļoti izplatītas gan arējā vidē, gan klīnikās, kas padara tieši šīs biofilmas par lielu un nozīmīgu pētījumu objektu. Biofilmu baktērijas ir mazāk jutīgas pret antibakteriālajiem līdzekļiem un ir pasargātas no saimniekorganisma imūnās sistēmas (fagocitozes, antivielām u. c.), kas rada labvēlīgus apstākļus hronisku un grūti ārstējamu infekciju attīstībai (Tolker-Nelsen, 2000).

Viena no svarīgākajām biofilmas sastāvdaļām ir ekstracelulāra polimēra substance (EPS), kas darbojas kā matrice, kas saista kopā baktēriju šūnas. *P. aeruginosa* var veidot biofilmas uz dažādām virsmām, piemēram, plaušu gļotādās pacientiem ar cistisko fibrozi, uz kontaminētiem katetriem un acu kontaktlēcām. *P. aeruginosa* biofilmas izveidojas piecpakāpju multicelulāros ciklos, kas sākas ar brīvas planktonu šūnas piesaistīšanos pie virsmas / adhēziju, kam seko mikrokoloniju veidošanās, un beidzas ar “izsēšanos” jeb izplatīšanos ārpus kolonijas, kuras laikā no mikrokolonijām iznākušās šūnas piesaistās pie jaunas un neaizņemtas virsmas. *P. aeruginosa* biofilmas sastāvā ir komplekss, kas sastāv no polisaharīdiem, nukleīnskābēm un olbaltumvielām. Augu un dzīvnieku audu ekstracelulārās matricēs galvenais komponents ir eksopolisaharīdi, kas arī ir svarīga sastāvdaļa baktēriju biofilmas attīstībai. Ir nepieciešami vismaz trīs eksopolisaharīdi – Psl, Pel, un algināts –, kas sekmē *P. aeruginosa* biofilmas attīstību (Ma et al., 2009; Ryder C et al., 2007).

Psl eksopolisaharīds ir nepieciešams, lai baktērija varētu piesaistīties pie virsmas pamata un uzturētu biofilmas struktūru. Psl kodē polisaharīdu sintēzes lokuss (PA2231-2245). Papildus Psl eksopolisaharīdam nozīmīgs *P. aeruginosa* biofilmas matricēs komponents ir arī ekstracelulārais DNS (eDNS). Tas ir hromosomālās DNS derivāts, kura funkcija ir savstarpējo šūnu kontakta “šūna-šūna” nodrošināšana biofilmā, turklāt tas biofilmas matricē veicina katjonu gradientu, genoma DNS izdalīšanu no mirušajām baktērijām un inducē baktēriju un biofilmas rezistenci pret antibiotikām (Barken et al., 2008; Yang et al., 2007).

P. aeruginosa veidotās biofilmas ir kļuvušas par populāru biofilmu izpēti modeli. *P. aeruginosa* izveidotām biofilmām ir sēnei līdzīga forma ar kājiņu (kātiņu) un cepuri, starp kurām ir šķidrums kanāli. Zināšanas par biofilmas struktūru, veidošanos un attīstību var būt noderīgas, lai izstrādātu pasākumu kopumu un vadlīnijas biofilmu veidošanās kontrolei (Harmsen et al., 2010).

P. aeruginosa producētajam biosurfaktantam (kodēts ar RhlA gēnu) ir liela nozīme šķidrums kanālu uzturēšanā starp multicelulārajām struktūrām biofilmā, tas arī veicina virsmas asociēto baktēriju migrāciju, veidojot sēnei līdzīgu struktūru. Pētījumos pierādīts, ka

biosurfaktanta sintēze notiek mikrokolonijās agrīnā biofilmas veidošanās fāzē (*Balasubramanian et al., 2013*), savukārt citos pētījumos uzsvērts, ka biosurfaktantam ir nozīme bakteriālo šūnu izplatīšanai ārā no biofilmas (*Pamp, Tolker-Nielsen, 2007*).

Sēnei līdzīgā biofilmas forma un galvenokārt tikai tās cepure ir iespējama, pateicoties IV tipa piliem, viciņu mediētai kustībai un hemotakses sistēmai, kā arī ekstracelulārajai DNS, kas tiek sintezēta no sēnes kājiņas (*Klausen et al., 2003*).

P. aeruginosa biofilmas attīstībā un veidošanā nozīme ir arī tās lektīniem – LecA un LecB –, it īpaši LecB, kurš galvenokārt atrodams planktonisko šūnu citoplazmā. Izmantojot divas *P. aeruginosa* kultūras, no kurām viena bija ar LecB deficītu un otra – savvaļas tipa ar LecB, autori pierādīja lektīna LecB nozīmi biofilmas attīstībā, jo rezultāti liecināja, ka savvaļas tipa kultūras veido biezākas biofilmas nekā LecB deficītās kultūras (*Tielker D et al., 2005*).

Var izšķirt 5 biofilmas attīstības fāzes ar katrai piemītošām specifiskām un unikālām īpašībām:

1. fāze – atgriezeniskā piesaiste;
2. fāze – neatgriezeniskā piesaiste;
3. fāze – 1. nobriešana;
4. fāze – 2. nobriešana;
5. fāze – dispersija.

Pirmajā attīstības (atgriezeniskās piesaistes) fāzē planktoniskās baktēriju šūnas piesaistās stikla (biomateriāla) virsmai ar šūnas polu, bet sākotnēji šī adhēzija ir atgriezeniska, jo ir novērots, ka dažas no baktēriju šūnām šajā biofilmas attīstības fāzē arī atdalās no biomateriāla virsmas. Šajā fāzē iesaistās arī baktēriju viciņas, ar kuru palīdzību baktērijas piesaistās biomateriāla virsmai. Baktēriju viciņu piesaistīšanās efektivitāte ir pierādīta pētījumos ar kustīgiem un nekustīgiem *P. aeruginosa* celmiem (ir flgK gēna mutācija), kur kustīgie baktēriju celmi uzrāda daudz lielākas piesaistīšanās spējas nekā nekustīgie baktēriju celmi (*Klausen et al., 2003; Toole, Kolter, 1998*).

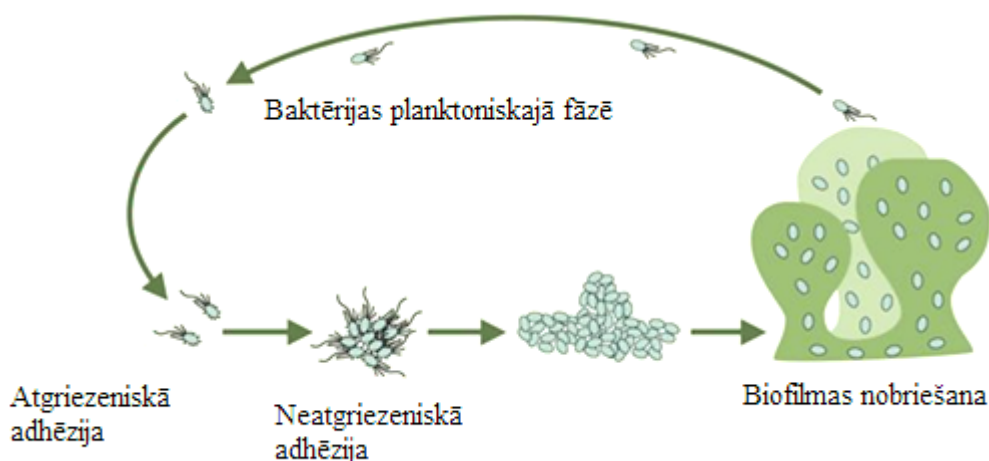
Otrā biofilmas attīstības (neatgriezeniskās piesaistes) fāze sākas tad, kad notiek multipla baktēriju šūnu savstarpējā adhēzija, kā arī adhēzija pie biomateriāla virsmas. Mikroskopiski var novērot, ka pie biomateriāla piesaistījušās baktērijas pārtrauc savu viciņu nodrošināto kustību. Visi baktēriju šūnu sakopojumi, kas veidojas šajā biofilmas attīstības fāzē, neatgriezeniski piesaistās pie biomateriāla un paliek tur līdz pat pēdējai biofilmas attīstības fāzei (*Sauer et al., 2002*).

Progresējoša baktēriju noslāņošanās kārtiņās tiek uzskatīta par biofilmas attīstības trešās fāzes (1. nobriešana) sākumu, kas tiek noteikts kā brīdis, kad šūnu grupas ir biezākas par 10

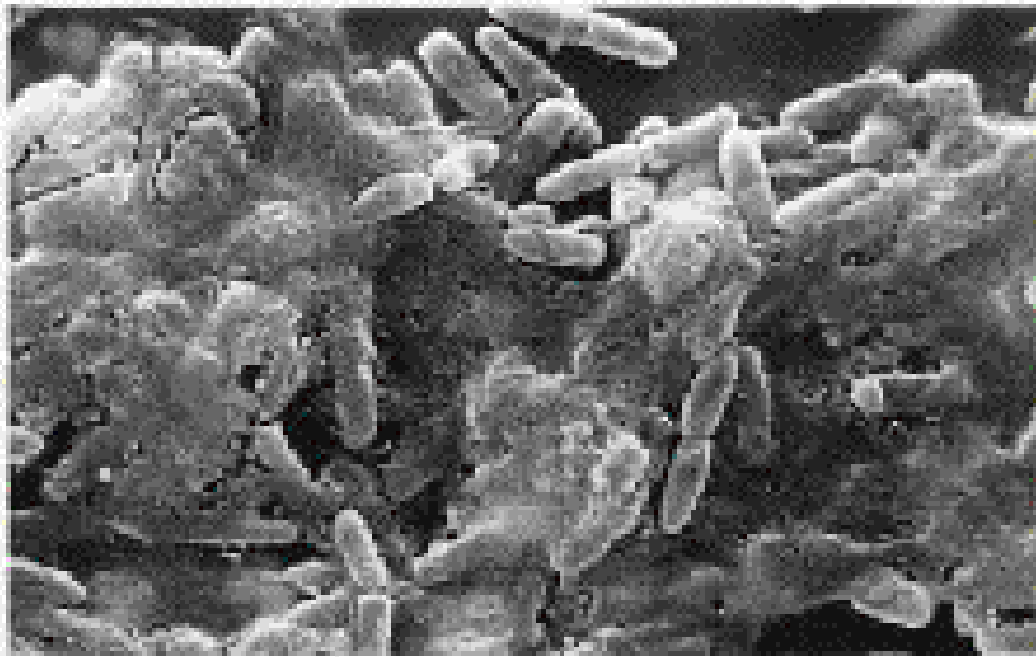
µm. Šajā attīstības fāzē, pateicoties RhlA gēna aktivitātei, tiek aktivēta arī Rhl *quorum-sensing* sistēma. Sistēmas nozīme ir saistāma ar baktēriju šūnu kopu struktūru un savstarpējo baktēriju adhēzijas pastiprināšanos (*Patriquin et al., 2008; Kim et al., 2005*).

Biofilma savu maksimālo biezumu sasniedz biofilmas ceturtajā attīstības (2. nobriešana) fāzē, kad biofilma ir apmēram 100 µm bieza. Izmantojot mikroskopijas metodes, tika novērots un secināts, ka baktēriju šūnas biofilmā ir nekustīgas un šūnu grupas sasniegušas savu maksimālo izmēru.

Apmēram devītajā biofilmas attīstības dienā sākas 5. biofilmas attīstības (dispersijas) fāze, kad novēro šūnu grupu struktūras izmaiņas – baktēriju dispersiju no iekšējām biofilmas daļām uz āru. Veidojas gliemežvākam līdzīga struktūra ar dobu centru un nekustīgu baktēriju apvalku. Šis process nodrošina labāku barības vielu piekļuvi baktēriju šūnām, kas dispersijas rezultātā izklūst no biofilmas, kā arī tām baktērijām, kas paliek biofilmā (*Sauer et al., 2002; 2.6. un 2.7. attēls*).



2.6. attēls. **Pseudomonu biofilmas veidošanās**
(Avots: <http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/fichiers/24237/ch01.html>)



2.7. attēls. *P. aeruginosa* biofilma SEM attēlā
(Avots: <http://carambola.usc.edu/research/biophysics/Biofilms4Web.html>)

2.6. Iekaisuma citokīni un antimikrobie peptīdi

2.6.1. Tumora nekrozes faktora α (TNF- α) raksturojums

Tumora nekrozes faktors α (TNF- α) ir iekaisuma citokīns, kuru 1975. gadā pirmo reizi izolēja *Carswell et al.* Minētajam citokīnam ir atklātas vairākas funkcijas, lai arī tās līdz galam vēl nav izprastas. Citokīnam ir gan stimulējošas, gan nomācošas īpašības, piemēram, TNF- α izraisa gan neitrofilo leukocītu proliferāciju iekaisuma laikā, gan arī to apoptozi, citokīnam saistoties ar receptoru TNF-R55 (*Murray et al., 1997*). Citokīnu producē dažādas šūnas, īpaši – makrofāgi (*Perala et al., 1992*). Ļoti liela TNF- α nozīme ir saistīta ar imūno atbildi pret baktērijām, sēnītēm, vīrusiem, kā arī dažu parazītu invāzijas un audzēju gadījumos. TNF- α piedalās lokāli iekaisuma procesā, jo pieder pie akūtās fāzes proteīniem, kuri iniciē pārējo iekaisuma citokīnu produkciju, kā arī palielina asinsvadu caurlaidību, tādējādi nodrošinot makrofāgu un neitrofilo leukocītu migrāciju uz iekaisuma vietu. TNF- α veicina kaulaudu sabrukšanu, stimulē prostaglandīna E2 (PGE2) atbrīvošanos no monocītu un fibroblastu šūnām, izraisa matricas metaloproteināžu (MMP) izdalīšanos, ierosinot ekstracelulārā matricas degradāciju. Kombinējoties minētās iekaisuma citokīnu molekulas var būt iemesls ievērojamiem audu sabrukšanas procesiem (*Janeway et al., 1999*). Makrofāgu

sekretētais TNF- α izraisa arī asins sarecēšanu iekaisuma perēklī, tādējādi apturot infekcijas izplatīšanos.

TNF- α produkciju stimulē baktēriju, vīrusu un parazītu eksogēnie un endogēnie faktori. Gramnegatīvo baktēriju, piemēram, pseidomonu, šūnas sienas lipopolisaharīdi it īpaši aktīvi stimulē TNF- α izdali mikroorganismu izraisītā iekaisuma procesa gadījumā (*Tracey, Cerami, 1993*). Iekaisuma procesam turpinoties, TNF- α produkcija kļūst sistēmiska, kas var novest līdz septiskajam šokam, hipotensijai, hipoproteinēmijai, neitropēnijai un pat neitrofilijai (*Janeway et al., 1999*). Līdz ar to aktuāli kļūst pētījumi, kuros, izmantojot TNF- α inhibitorus, pētnieki mēģina samazināt monocītu šūnu apoptozi (*Shive et al., 2002*). Pētījumos ar dzīvniekiem pierādīts, ka arī antibakteriālā terapija var samazināt citokīnu produkciju un tādējādi pildīt iekaisumu ietekmējošu faktoru funkcijas. (*Lozano et al., 2002*).

Tā kā biomateriālu implantēšana ir traumatisks process, īpaši, ja implantēto objektu ir kontaminējušas baktērijas, tas var izraisīt ievērojamu iekaisuma citokīnu produkciju, vai arī – tieši pretēji – nomākt to. Iekaisuma citokīni (TNF- α , Il-6 un prokalcitonīns) var būt perspektīvi kā laboratorie marķieri iekaisuma intensitātes noteikšanai (*Bottner, Wegner et al., 2007*). Daži autori asinsvadu endoprotēžu gadījumā iesaka izmantot iekaisuma citokīnu TNF- α , Il-1, Il-8 noteikšanu, lai spriestu par iekaisuma veidošanās dinamiku pēc implantācijas. Ja 7 dienas pēc operācijas iekaisuma citokīnu daudzumam joprojām nav tendence samazināties, tas varētu liecināt par implanta infekciju (*Shindo et al., 2003*).

Gul ar līdzautoriem (*Gul et al., 2010*) savos pētījumos apgalvo, ka no visiem iekaisuma citokīniem TNF- α ir visprecīzākais citokīns, pēc kura var spriest par iekaisuma intensitāti un dinamiku. *Gollwitzer* un kolēģi (*Gollwitzer et al., 2013*) norāda, ka TNF- α atrade sinoviālajā šķidrumā var liecināt par implanta infekciju.

McGee ar līdzautoriem (*McGee et al., 2007*) stāsta par TNF- α hiperprodukciju eksperimenta dzīvniekiem agrīnā pēcoperācijas periodā un vēlāku tā līmeņa samazināšanos, kas liecina par sistēmisku šī citokīna supresiju, kuras mehānisms vēl nav īsti skaidrs.

2.6.2. Beta defensīns-2, -3 un to raksturojums

Beta defensīni ir mazas katjonu proteīnu molekulas, kurām piemīt plaša spektra aktivitāte pret daudzām grampozitīvām un gramnegatīvām baktērijām, sēnītēm un dažiem vīrusiem (*Lehrer et al., 1993; Ganz et al., 1990*). Zīdītājiem izšķir α un β defensīnu apakšgrupas. Cilvēkam papildus izšķir četrus β defensīna veidus. Beta defensīns-2 ir atrasts uz ādas, un to arī producē gļotādu epitēlija šūnas, kā arī granulocīti, NK šūnas un T citotoksiskie limfocīti (*Garcia et al., 2001; Harder et al., 2001; Bensch et al., 1995*).

Beta defensīna-2 izdali stimulē iekaisuma citokīni TNF- α un Il-1, kā arī *P. aeruginosa* baktērijas (Harder et al., 2000).

Beta defensīns-2 pārsvarā darbojas pret gramnegatīvām baktērijām, bet β defensīns-3 – gan pret grampozitīvām (*Streptococcus pyogenes*, *S. aureus*, *Enterococcus faecium*), gan pret gramnegatīvām baktērijām (*P. aeruginosa*) (Sawamura et al., 2005). Īpaši svarīgi to ir zināt tāpēc, ka ādas floras pārstāvji var kontaminēt implantus, izraisot ar tiem saistītās infekcijas. Tiek uzsvērts arī, ka antimikrobie peptīdi (β defensīni) ir nozīmīgi iedzimtās imunitātes jeb nespecifiskās rezistences faktori, kas darbojas pret stafilokokiem (Zanger et al., 2010). Sakarā ar to, ka ādas mikrofloras pārstāvis *S. epidermidis* var ierosināt ar biomateriāliem saistītās infekcijas, būtiska tā īpašība ir ierosināt β defensīna produkciju, jo minētās baktērijas sabrukšanas produkti spēj saistīties ar *toll* receptoru-2 (TLR-2) (Lai et al., 2010). Atsevišķos pētījumos (Song et al., 2009) uzsvērts, ka rekombinantais β defensīns-3 varētu būt perspektīvs antimikrobais līdzeklis dažādu baktēriju un sēnīšu izraisītu mutes dobuma iekaisumu novēršanai, jo uzrāda līdz 98% efektivitāti pret *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogenica*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*, *Enterococcus faecalis* un *Candida albicans*.

Beta defensīnus kā dabīgos antimikrobus peptīdus sāka izmantot pārklājuma veidā uz TiO₂ saturošiem biomateriāliem, lai samazinātu bakteriālās kolonizācijas izraisītās infekcijas un to sekas; tika novērota 60–100% antibakteriālā efektivitāte (Pfeuffer, 2011). Beta defensīns-3 kopā ar antibakteriālām vielām tiek izmantots biomateriālos, lai samazinātu stafilokoku biofilmu veidošanos uz implantiem. Turklāt β defensīns-3 uzrāda lielāku efektivitāti nekā klindamicīns un vankomicīns (Huang et al., 2012). Daži autori savos pētījumos norāda, ka β defensīna-2 atrade sinoviālajā šķidrumā var liecināt par implanta infekciju (Gollwitzer et al., 2013).

2.6.3. Interleikīna-10 (Il-10) raksturojums

Interleikīns-10 pieder pie aktivēto makrofāgu un dendrītisko šūnu inhibitoriem un tādējādi ir iesaistīts celulārās imunitātes kontroles mehānismos. Il-10 tiek uzskatīts par tiešo γ -IFN inhibitoru. Il-10 producē gan makrofāgi, gan Th2 efektoršūnas, gan T regulatorie limfocīti, kā arī dažas nelimfoīdās izcelsmes šūnas, piemēram, keratinocīti. Līdz galam vēl nav izpētīts, kādēļ vienā gadījumā makrofāgi producē regulatoro citokīnu Il-10, bet citos – stimulējošos iekaisuma citokīnus, piemēram, TNF- α un Il-12 (Charo, Ransohoff, 2006).

Galvenie Il-10 bioloģiskie efekti ir saistīti ar celulārās imunitātes kavēšanu, jo tiek nomākta Il-12 produkcija, kā rezultātā ir kavēta Th1 populācijas veidošanās un γ -IFN sintēze.

Tāpat Il-10 kavē arī kostimulējošo molekulu un MHC II klases molekulu ekspresiju makrofāgu un dendrītisko šūnu virsmā, tādējādi kavējot arī T līdzētājšūnu aktivācijas uzsākšanos (*Alexander, Hilton, 2004*).

Augsta Il-10 līmeņa ekspresija ir audos ap implantēto biomateriālu un saglabājas pat 21 dienu pēc implantācijas (*Gretzer et al., 2006*). Turklāt nav pierādīta atšķirība starp Il-10 produkciju audos ap implantu gadījumos, kad tiek lietots maztoksisks materiāls, piemēram, TiO₂ saturošs biomateriāls, vai toksisks, piemēram, varu saturošs, biomateriāls. Abos gadījumos Il-10 produkcijas dinamika ir līdzīga (*Suska et al., 2005*). Atšķirība gan tiek novērota starp biomateriālu paraugiem ar un bez infekcijas – ap paraugu, kurā infekcijas nav, Il-10 ekspresija ir mazāka (*Duarte et al., 2009*).

3. MATERIĀLS UN METODEDES

3.1. Pētījumā izmantotie biomateriāli

3.1.1. Stikla keramikas biomateriāli

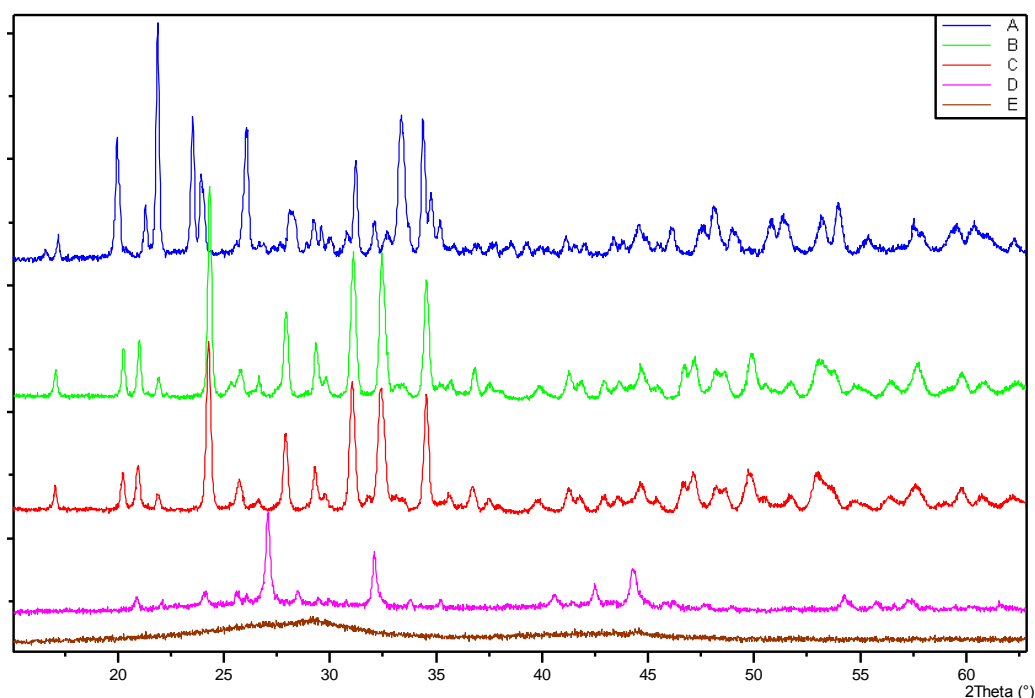
Šajā pētījumā izmantoti Rīgas Tehniskajā universitātē oriģināli sintezēti biomateriāli – kalcija fosfāta bāzei tika pievienots niobija oksīds mehāniskās izturības paaugstināšanai un nātrija oksīds – šķīdības un bioaktivitātes uzlabošanai. Jau iepriekšējos pētījumos ir konstatēta līdzīga sastāva keramikas biosaderība. Stikla keramika tika izgatavota klasiskā divpakāpju procesā: vispirms iegūstot stikla pulveri, tad to presējot formā, un, veicot termisko apstrādi, tas tika salipināts un kristalizēts. Kristalizācijas temperatūra tika noteikta ar diferencāltermisko analizatoru BHR-DTA 703.

Lai arī niobija oksīds ir plaši zināms stiklu kristalizācijas veicinātājs, tomēr šajā pētījumā izmantotais stikls sāka kristalizēties no virsmas vai no mikroplaisām. Tādēļ, lai iegūtu daudzveidīgāku stikla keramikas mikrostruktūru, par izejvielu tika izmantots polidisperss stikla pulveris. Kristālisko fāžu un mikrostruktūras analīzei tika izmantots skenējošais elektronmikroskops *Tescan (Mira/LMU, High Resolution Schottky FE SEM)* un rentgendifraktometrs *PANalytical X'Pert Pro* ar 2005. gada ICDD datubāzi.

Visi stikla pulveri bija iegūti no analoga sastāva šīhtām minimāli atšķirīgos iegūšanas apstākļos. Tā kā niobijs kā pārejas elements ir samērā nestabils un fosfātu stikli ir gaistoši, tad dažādas nianšes kausējuma laikā var iespaidot iegūto stikla pulveri. No vairāku stikla pulveru sērijām tika izvēlēti 3 pulveri, kas veidoja pēc sastāva un mikrostruktūras dažādas kristāliskās fāzes. Paraugi tika apzīmēti ar burtiem no A līdz E. Paraugs A bija no izejvielas, kas jau pirms saķepināšanas bija kristalizēta. Paraugs B un C bija no izejvielas, kas sākotnēji bija amorfa, bet salipināšanas laikā tika kristalizēta. Ar DTA tika noteikts, ka kristalizēšanās temperatūra bija 712–720 °C, tāpēc B tika iegūts 760 °C temperatūrā, lai produkts būtu izteikti kristālisks, bet C tika iegūts 700 °C temperatūrā, lai būtu vairāk amorfās fāzes, taču, tā kā sastāvs bija ar lielu kristalizācijas tendenci, tad iegūtais produkts pēc XRD spektriem bija ļoti līdzīgs B parauga spektram (3.1. att.). Paraugi D un E tika iegūti no izejvielas, kas bija līdzīga kā B un C paraugiem, un arī šie paraugi atšķīrās ar kristāliskuma pakāpēm. Paraugs D tika iegūts, izejvielu saķepinot augstākā temperatūrā (760 °C), kas veicina kristalizāciju, bet paraugs E tika salipināts e 700 °C temperatūrā un bija izteikti amorfs.

XRD analīzē tika konstatēts, ka paraugs, kas apzīmēts ar burtu A, saturēja $\text{Na}_4\text{Nb}_8\text{P}_4\text{O}_{32}$, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ un NaNbO_3 , paraugi B un C saturēja $\text{Na}_4\text{Nb}_8\text{P}_4\text{O}_{32}$, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, NaNbO_3

un $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, bet D un E paraugiem tomēr kristāliskās fāzes neizdevās identificēt, kaut gan XRD spektrā maksimumi bija pietiekami labi izteikti (3.1. attēls.).



3.1. attēls. **Paraugu A, B, C, D, E XRD spektri**

Daži no iegūtajiem stikla keramikas variantiem tika modificēti, kodinot (paraugi B+, D+ un E+) ar mērķi, lai samazinātu amorfās fāzes daudzumu uz virsmas un palielinātu virsmas raupjumu. Kodināšana tika veikta ar H_2O_2 , HF un HNO_3 maisījumu.

Pētījumā iekļāvām un analīzei izmantojām 8 oriģināli sintezētus biomateriālus ar dažādu kristalizācijas pakāpi un virsmas modifikāciju, kas tika iegūti pēc iepriekš aprakstītās metodes:

A – izejviela un produkts ir kristāliski, maksimālā apdedzināšanas temperatūra – $1005\text{ }^\circ\text{C}$ 30 min.

B – izejviela amorfa, produkts kristālisks, $760\text{ }^\circ\text{C}$ 60 min.

B+ – B kodināts (30 h, H_2O_2 , HF, HNO_3), uz virsmas mazāk viegli šķīstošās amorfās fāzes.

C – izejviela amorfa, produkts kristālisks, apstrādāts $700\text{ }^\circ\text{C}$ 30 min.

D – izejviela amorfa, produkts daļēji kristālisks, apstrādāts $760\text{ }^\circ\text{C}$ 60 min.

D+ – D kodināts (30 h, H_2O_2 , HF, HNO_3), apstrādāts $760\text{ }^\circ\text{C}$ 60 min., uz virsmas mazāk šķīstošās amorfās fāzes.

E – izejviela amorfa, produkts amorf, apstrādāts $700\text{ }^\circ\text{C}$ 30 min.

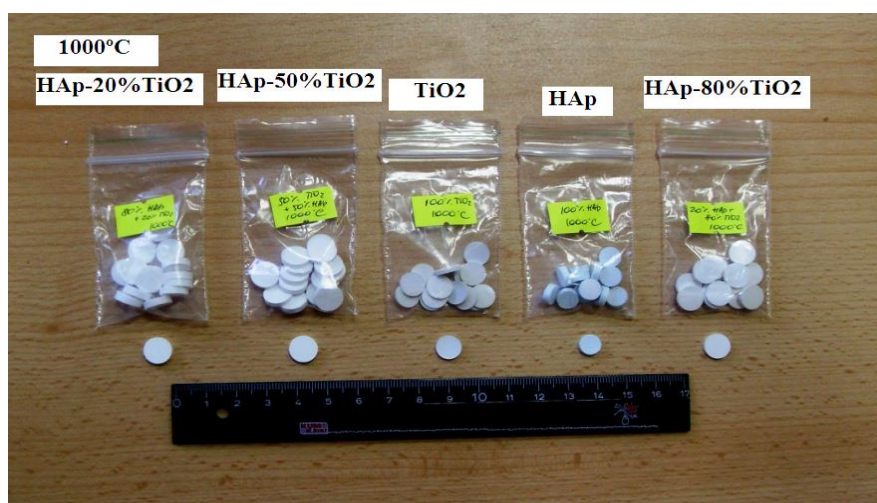
E+ – E kodināts (30 h, H_2O_2 , HF, HNO_3), vieglāk šķīstošās amorfās fāzes uz virsmas bija mazāk.

3.1.2. Kompozītmateriāli HAp/TiO₂

Pēdējo desmit gadu laikā plaši tiek izmantota metālisko implantu pārklāšana ar bioaktīvo HAp/TiO₂ slāni, lai uzlabotu fiksāciju starp dzīvo kaulu un implantu un jaunu kaulu šūnu veidošanos, kā arī lai novērstu metālu koroziju. Visbiežāk pārklāti tiek titāna (Ti) un titāna sakausējuma implanti, kas ir bioinerti materiāli. HAp/TiO₂ kompozītceramikas pārklājumam ir lielāka sasaistes stiprība ar metālu, salīdzinot ar tīru HAp. Palielinot TiO₂ daudzumu kompozītā, palielinās arī stiprība, turklāt TiO₂ piedeva var samazināt baktēriju piesaistīšanos pie biomateriāla, tādējādi samazinot iespējamo implanta infekcijas risku, tomēr infekcijas risks ap TiO₂ saturošu implantu joprojām ir aktuāla problēma medicīnā.

Pētījumā izmantotos kompozītmateriālus apzīmējām, izmantojot numerāciju no 1 līdz 10; galvenās to atšķirības ir saistītas ar HAp un TiO₂ proporciju un saņemšanas temperatūru – 1000 °C un 1200 °C (3.2. un 3.2. attēls):

1. 100% HAp – apdedzināts 1000 °C
2. 50% HAp un 50% TiO₂ – apdedzināts 1000 °C
3. 80% HAp un 20% TiO₂ – apdedzināts 1000 °C
4. 100% TiO₂ – apdedzināts 1000 °C
5. 20% HAp un 80% TiO₂ – apdedzināts 1000 °C
6. 100% TiO₂ – apdedzināts 1200 °C
7. 20% HAp un 80% TiO₂ – apdedzināts 1200 °C
8. 80% HAp un 20% TiO₂ – apdedzināts 1200 °C
9. 50% HAp un 50% TiO₂ – apdedzināts 1200 °C
10. 100% HAp – apdedzināts 1200 °C



3.2. attēls. Paraugi pēc termiskās apstrādes 1000 °C



3.3. attēls. Paraugi pēc termiskās apstrādes 1200 °C

RTU Rīgas Biomateriālu inovāciju un attīstības centrā sintezētais HAp pēc termiskās apstrādes augstākās temperatūrās kļūst zilgans, bet maisījumā ar TiO_2 – gaišāks. Šādu nokrāsu paraugam dod Mg^{2+} joni, kuri var aizvietot Ca^{2+} jonus HAp struktūrā. Zināms, ka TiO_2 var izmantot arī kā baltu pigmentu, tādēļ maisījumā tas samazina zilgano nokrāsu.

3.1.3. Sintētiskie kalcija fosfātu saturošie biomateriāli

Sintētiskie kalcija fosfāta (CaP) biomateriāli ir ķīmiski līdzīgi cilvēka kaula minerāliem, tāpēc tos labi var izmantot kā kaula aizvietošanas materiālu. Osteokonduktivitāte un biosaderība ir galvenās priekšrocības CaP biomateriāliem. Pārsvārā CaP biokeramika tiek lietota hidroksilapatīta (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), β -trikalcijsfosfāta (TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) vai bifāziskā kalcija fosfāta (BCP) veidā, kuras sastāvā ir HAp un TCP maisījums. BCP lietošanas pamatā ir tajā esošais optimālais balanss starp vairāk stabilo fāzi (HAp) un vairāk šķīstošo fāzi (TCP). Mainot HAp un TCP attiecību, tiek kontrolēta BCP biomateriāla bioaktivitāte un reabsorbcijas spējas. BCP var pagatavot, vai nu mehāniski samaisot HAp un TCP (A metode, A paraugi), vai arī mākslīgi sintezējot apatītu bez kalcija (B metode, B paraugi). Apatīta un apatīta ar kalcija deficītu, kurā ir atšķirīga Ca/P attiecība ar koeficientu no 1,5 līdz 1,67, paraugi tika sintezēti ar slapjo precipitācijas metodi. Sausais precipitāts tika noslīpēts, lai iegūtu smalku pulveri.

Bifāziskās keramikas kompozīts tika iegūts, izmantojot divas metodes:

- 1) A metode – kalcija deficīta apatītu kalcinēšana un saķepināšana (*sintering*);
- 2) B metode – kalcinēšana un saķepināšana no mehāniski samaisītiem apatītiem ar Ca/P attiecību koeficientu no 1,5 līdz 1,67.

Pirms saķepināšanas pulvera paraugi tika uniaksiāli saspiesti. Paraugu apdedzināšana notika 2 h ilgi 1150 °C temperatūrā. Iegūtie paraugi bija ar šādām HAp/TCP attiecībām: 100/0, 90/10, 60/40, 50/50 un 0/100.

3.1.4. HAp/Ag saturošie biomateriāli

HAp un HAp/Ag paraugi tika sintezēti, izmantojot slapjo ķīmisko metodi. Prekursori, kuri tika izmantoti HAp sintēzei, bija kalcija oksīds ($\geq 97\%$, FLUKA), fosforskābe (85,5%, *Sigma Aldrich*), sudraba nitrāts ($\geq 99\%$, *Sigma Aldrich*) un dejonizēts ūdens, kas tika izmantots visiem eksperimentiem. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ tika pagatavots, slīpējot CaO 200 ml ūdens. Nepieciešamo AgNO_3 daudzumu izšķīdināja ūdenī, pievienoja kalcija hidroksīda suspensijai un uzkarēja līdz 90 °C, nepārtraukti maisot. Fosforskābe tika pievienota pa pilnienam. Visa sintēze tika veikta $[\text{Ca}+\text{Ag}] = 0,25$ mol apjomā un ar noteiktu atomu attiecību $(\text{Ca}+\text{Ag})/\text{P} = 1,67$. Sudraba nitrāts tika pievienots attiecīgā apmērā un ar attiecīgu atomu attiecību $-\text{Ag}/(\text{Ag}+\text{Ca}) = 0$ (HAp); 0,002 (HAp/Ag1) un 0,012 (HAp/Ag2). Materiāla suspensija tika noturēta 15 h, tad filtrēta un žāvēta 100 °C temperatūrā. Paraugi tika sakausēti kā pulveri un skafoldi, lai noteiktu fāzu sastāva izmaiņas pēc apdedzināšanas. Pirms apdedzināšanas pulveri tika uniaksiāli saspiesti 2 mm biezā skafoldā ar diametru 10 mm. Paraugu saķepināšana notika 2 h laikā 1000 °C un 1150 °C temperatūrā.

3.2. Pētījumā izmantotie mikroorganismi

Pētījumā tika izmantoti no Amerikas Mikroorganismu kultūru kolekcijas iegūtie mikroorganismi – *P. aeruginosa* ATCC 27853 un *S. epidermidis* ATCC 12228.

Šie mikroorganismu celmi ir vieni no nozīmīgākajiem etioloģiskajiem aģentiem ar biomateriāliem saistīto infekciju izcelsmē, jo tiem ir raksturīga ģlotu veidošanās un glikokaliksa izdala baktēriju kolonijas virsmā, kā rezultātā veidojas biofilmas.

3.3. Mikroorganismu adhēzijas noteikšana *in vitro*

No baktēriju tīrkultūrām tika gatavotas baktēriju suspensijas 1 ml TSB (*Triptycase soy broth, Oxoid, UK*) tilpumā ar koncentrāciju 10^8 , 10^7 un 10^6 KVV/ml. Paraugus kultivēja 37 °C temperatūrā 2 h adhēzijas intensitātes noteikšanai. Pēc inkubēšanas tika noskaloti nepiesaistītie mikroorganismi. Lai atdalītu pie biomateriālu virsmas piesaistījušās baktērijas, diskus 1 min. apstrādāja ultraskaņas vannā (45 kHz frekvencē) un 1 min. maksimālos

apgriezīenos *Vortex* centrifūgā. No katra parauga gatavoja vismaz 5 uzsējumus uz TSA barotnes, kultivēja 24 stundas 37 °C temperatūrā, lai noteiktu kopējo mikroorganismu daudzumu (*Schafer et al., 2008; Trampuz, Piper, 2007*).

3.4. Mikroorganismu kolonizācijas noteikšana *in vitro*

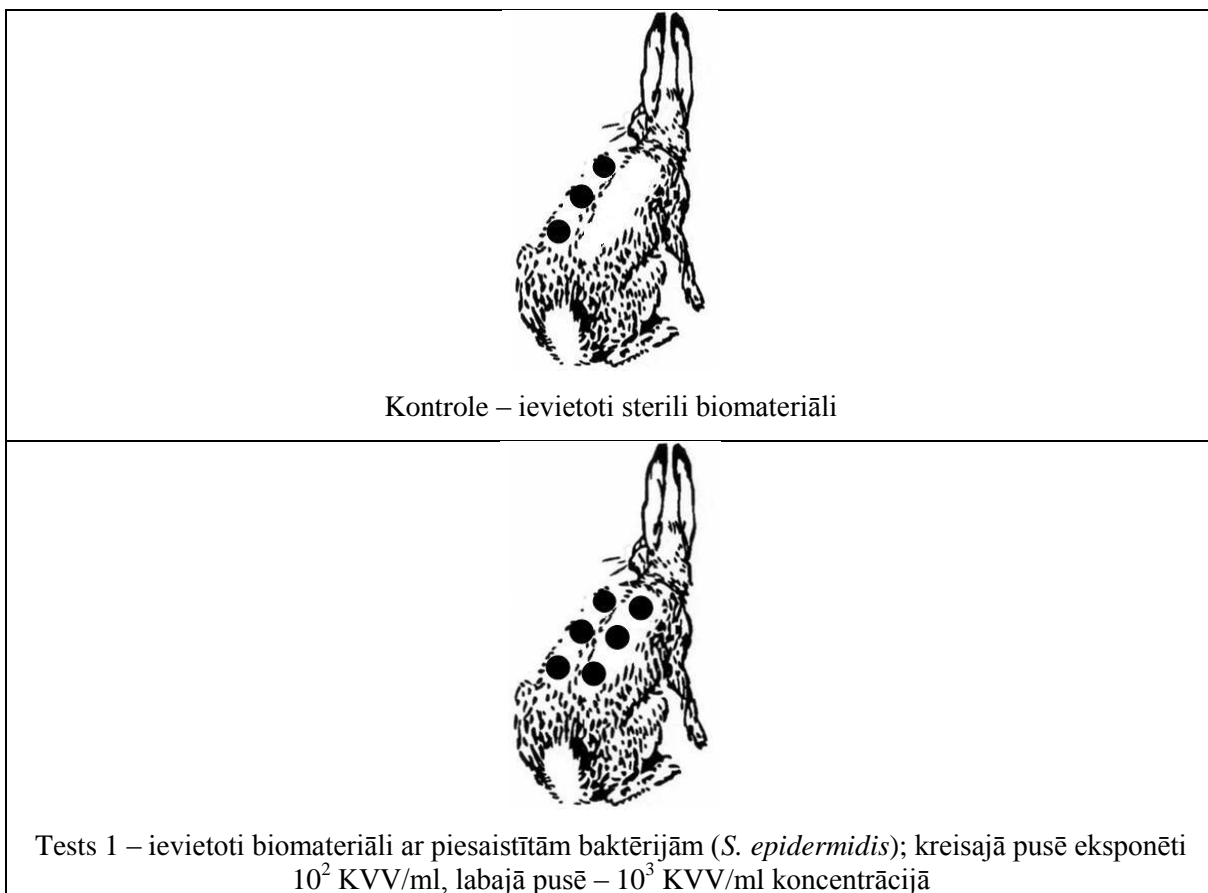
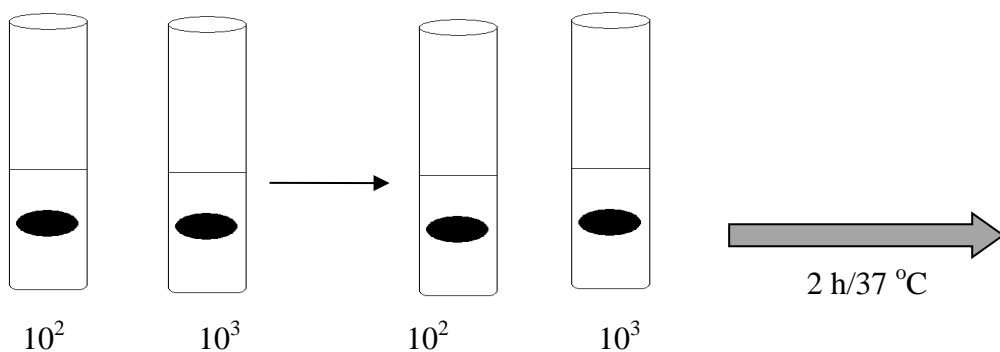
No baktēriju tīrkultūrām tika gatavotas baktēriju suspensijas 1 ml TSB tilpumā ar koncentrāciju 10, 10² un 10³ KVV/ml. Paraugus kultivēja 37 °C temperatūrā 24–48–72 h kolonizācijas intensitātes noteikšanai. Pēc inkubēšanas tika noskaloti nepiesaistītie mikroorganismi. Lai atdalītu pie biomateriālu virsmas piesaistījušās baktērijas, diskus 1 min. apstrādāja ultraskaņas vannā (45 kHz frekvencē) un 1 min. maksimālos apgriezīenos *Vortex* centrifūgā. No katra parauga gatavoja vismaz 5 uzsējumus uz TSA barotnes, kultivēja 24 stundas 37 °C temperatūrā, lai noteiktu kopējo mikroorganismu daudzumu (*Schafer et al., 2008; Trampuz, Piper, 2007*).

3.5. Mikroorganismu kolonizācijas noteikšana *in vivo*

No pētījumā izmantotajām baktēriju tīrkultūrām gatavoja baktēriju suspensijas 1 ml TSB tilpumā ar koncentrāciju 10² un 10³ KVV/ml, paraugus kultivēja 37 °C temperatūrā 2 h, noskaloja nepiesaistītās baktērijas un implantēja eksperimenta dzīvniekiem. Eksperimentā izmantoja šinšilas trušus, kuriem kombinētā vispārējā un lokālā anestēzijā tika veikts 2 cm garš ādas iegriezums uz muguras starp lāpstiņām, atslāņoti zemādas audi un zemādā tika implantēts biomateriāls – bez bakteriālās kontaminācijas kontroles grupai un ar baktērijām kontaminēts pētījuma grupai, veikta hemostāze un brūce slēgta ar atsevišķām šuvēm (3.4. attēls). Pēc 2 un 4 nedēļu ekspozīcijas laika trušiem veica eitanāziju, izņēma biomateriālu paraugus, kurus 1 min. apstrādāja sonikatorā un arī vorteksēja 1 min., lai atdalītu paraugu kolonizējušās baktērijas. No iegūtā materiāla veica vismaz 5 uzsējumus uz TSA barotnes, kultivēja 24–48 h 37 °C temperatūrā, saskaitīja izaugušās kolonijas un pārrēķināja baktēriju daudzumā uz 1 mm² biomateriāla parauga virsmas atbilstīgi literatūrā plaši aprakstītai metodikai (*Renz et al., 2015; Gregory et al., 2014; Schafer et al., 2008; Trampuz, Piper, 2007*).

3.6. Iekaisuma citokīnu ekspresijas noteikšana *in vivo*

Ap biomateriāla paraugu esošos audos ar imūnhistoķīmijas metodēm tika noteikta Il-10, β defensīna-2 un TNF- α ekspresija, izmantojot *EnVision* metodi: paraugu 30 min. apstrādāja ar primāro antivielu pret meklējamo citokīnu, tad 5 min. skaloja, tad sekoja 30 min. *EnVision* saistošais posms, 10 min. mazgāšana, sekundārās antivielas pievienošana, 5 min. skalošana, 2 min. kontrastkrāsošana.





Tests 2 – ievietoti biomateriāli ar piesaistītām baktērijām (*P. aeruginosa*); kreisajā pusē eksponēti 10^2 KVV/ml, labajā pusē – 10^3 KVV/ml koncentrācijā

3.4. attēls. ***In vivo* pētījuma shēma**
(Ekspozīcija trušos: 2 nedēļas; 4 nedēļas; 3 mēnešus)

3.7. Statistikas metodes

Statistisko rezultātu apstrādei un rezultātu iegūšanai tikai izmantotas *Excel* un *SPSS 21* programmas. Lai salīdzinātu savā starpā divas neatkarīgas vidējās vērtības, izmantoja divu neatkarīgu izlašu t testu (Levena tests). Par statistiski ticamu tika izvēlēts, ja $p < 0,05$.

4. REZULTĀTI

4.1. Stikla keramikas biomateriāli – *in vitro* un *in vivo* izpēte

Pētījumā izvērtējam 8 stikla keramikas oriģināli sintezētus biomateriālus ar dažādu kristalizācijas pakāpi un virsmas modifikāciju, kuri tika apzīmēti ar latīņu alfabēta burtiem no A līdz E, no kuriem B, D un E paraugi papildus tika kodināti, lai samazinātu amorfās fāzes daudzumu uz virsmas un palielinātu virsmas raupjumu. Kodinātie paraugi tika apzīmēti ar B+, D+ un E+. Visi minētie paraugi tika pētīti *in vitro* apstākļos, bet A, B, B+ – arī *in vivo*. Adhēzija tika noteikta, inkubējot paraugus 2 h / 37 °C 10^3 KVV/ml baktēriju koncentrācijā, bet kolonizācija – 48–72 h / 37 °C 10^3 KVV/ml baktēriju koncentrācijā.

4.1.1. Baktēriju adhēzija *in vitro* uz stikla keramikas biomateriālu paraugiem

Baktēriju adhēzija *in vitro* uz stikla keramikas biomateriālu A parauga

Izmantojot sonifikācijas un uzsējumu metodi, atradām, ka abiem pētījumā izmantotajiem mikroorganismiem – *P. aeruginosa* un *S. epidermidis* – adhēzija visintensīvāk notika uz A biomateriāla virsmas, kas bija izteikti kristāliska.

Uz A biomateriāla *S. epidermidis* vidējā adhēzijas intensitāte bija $0,05 \pm SD 0,003$ KVV/mm², maksimālā – $0,055$ KVV/mm², minimālā – $0,046$ KVV/mm², *P. aeruginosa* vidējā adhēzijas intensitāte bija $0,048 \pm SD 0,0029$ KVV/mm², maksimālā – $0,052$ KVV/mm² un minimālā – $0,044$ KVV/mm² (4.1. tabula un 4.1. attēls).

Baktēriju adhēzija *in vitro* uz stikla keramikas biomateriālu B parauga

B biomateriāls uzrādīja ļoti zemu spēju piesaistīt abas pētāmās baktērijas.

Uz B biomateriāla abu pētījumā izmantoto mikroorganismu – gan *S. epidermidis*, gan *P. aeruginosa* – vidējā adhēzijas intensitāte bija $0,005 \pm SD 0,0003$ KVV/mm². *S. epidermidis* maksimālā adhēzijas intensitāte bija $0,0055$ KVV/mm², minimālā – $0,0045$ KVV/mm². *P. aeruginosa* maksimālā adhēzijas intensitāte bija $0,0055$ KVV/mm² un minimālā – $0,0047$ KVV/mm² (4.1. tabula un 4.1. attēls).

Baktēriju adhēzija *in vitro* uz stikla keramikas biomateriālu B+ parauga

Uz kodinātā B+ biomateriāla pētījuma rezultātā atradām, ka *S. epidermidis* piesaistās gandrīz tikpat mazā daudzumā kā uz nekodinātā parauga – *S. epidermidis* vidējā adhēzijas intensitāte bija $0,004 \pm \text{SD } 0,0003 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā – $0,0055 \text{ KVV /mm}^2$ un minimālā – $0,0045 \text{ KVV/mm}^2$.

Rezultāti arī parādīja, ka kodināšana var padarīt biomateriāla virsmu “draudzīgāku” pseidomonām, jo uz B+ biomateriāla *P. aeruginosa* vidējā adhēzijas intensitāte bija $0,016 \pm \text{SD } 0,004 \text{ KVV /mm}^2$, kas ir par pusi vairāk, nekā salīdzinot ar nekodināto biomateriāla versiju. Maksimālā adhēzijas intensitāte bija $0,02 \text{ KVV /mm}^2$ un minimālā – $0,01 \text{ KVV /mm}^2$ (4.1. tabula un 4.1. attēls).

Baktēriju adhēzija *in vitro* uz stikla keramikas biomateriālu C parauga

Pētījumā konstatējām, ka *S. epidermidis* uzrāda vidēju adhēzijas intensitāti uz C biomateriāla virsmas, kas bija $0,026 \pm \text{SD } 0,0007 \text{ KVV /mm}^2$, un tā ir par pusi mazāka nekā *P. aeruginosa* vidējā adhēzijas intensitāte – $0,05 \pm \text{SD } 0,0021 \text{ KVV /mm}^2$. Maksimālā *S. epidermidis* adhēzijas intensitāte uz C biomateriāla bija $0,027 \text{ KVV /mm}^2$, minimālā – $0,025 \text{ KVV /mm}^2$. Maksimālā *P. aeruginosa* adhēzijas intensitāte uz C biomateriāla bija $0,053 \text{ KVV /mm}^2$ un minimālā – $0,047 \text{ KVV /mm}^2$.

Iegūtie rezultāti varētu liecināt, ka C biomateriāla pagatavošanas tehnoloģija nesamazina baktēriju adhēzijas intensitāti uz biomateriālu virsmas (4.1. tabula un 4.1. attēls).

Baktēriju adhēzija *in vitro* uz stikla keramikas biomateriālu D parauga

Arī biomateriāla D paraugi uzrādīja zemu spēju piesaistīt abas pētāmās baktērijas.

S. epidermidis vidējā adhēzijas intensitāte uz D biomateriāla virsmas bija $0,01 \pm \text{SD } 0,0022 \text{ KVV /mm}^2$, maksimālā – $0,014 \text{ KVV /mm}^2$ un minimālā – $0,008 \text{ KVV /mm}^2$.

P. aeruginosa vidējā adhēzijas intensitāte uz D biomateriāla virsmas bija $0,026 \pm \text{SD } 0,0037 \text{ KVV /mm}^2$, maksimālā – $0,03 \text{ KVV /mm}^2$ un minimālā – $0,02 \text{ KVV /mm}^2$ (4.1. tabula un 4.1. attēls).

Baktēriju adhēzija *in vitro* uz stikla keramikas biomateriālu D+ parauga

Pētot D+ parauga spēju piesaistīt baktērijas, tika konstatēts, ka arī šajā gadījumā kodinātajiem paraugiem virsma labāk piesaista pētījumā izmantotos mikroorganismus nekā nekodinātajiem. Salīdzinot ar D biomateriālu, augstāka spēja piesaistīties abiem mikroorganismiem bija novērojama uz D+ biomateriāla: vidējā adhēzijas intensitāte *S. epidermidis* bija $0,048 \pm \text{SD } 0,0021 \text{ KVV/mm}^2$, *P. aeruginosa* – $0,05 \pm \text{SD } 0,001 \text{ KVV/mm}^2$. Maksimālā *S. epidermidis* adhēzijas intensitāte uz D+ biomateriāla bija $0,052 \text{ KVV/mm}^2$, minimālā – $0,045 \text{ KVV/mm}^2$. Maksimālā *P. aeruginosa* adhēzijas intensitāte uz D+ biomateriāla bija $0,051 \text{ KVV/mm}^2$, minimālā – $0,048 \text{ KVV/mm}^2$ (4.1. tabula un 4.1. attēls).

Baktēriju adhēzija *in vitro* uz stikla keramikas biomateriālu E un E+ paraugiem

Biomateriāli E un E+ uzrādīja zemu spēju piesaistīt abas pētāmās baktērijas.

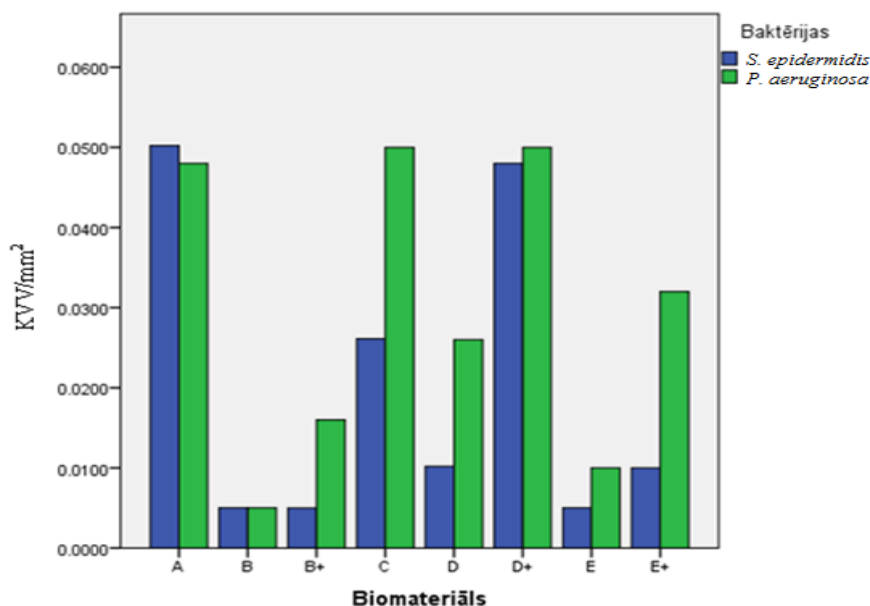
S. epidermidis vidējā adhēzijas intensitāte uz E biomateriāla bija $0,005 \pm \text{SD } 0,0004 \text{ KVV/mm}^2$, bet uz E+ biomateriāla – $0,01 \pm \text{SD } 0,001 \text{ KVV/mm}^2$. Maksimālā *S. epidermidis* adhēzijas intensitāte uz E biomateriāla bija $0,0056 \text{ KVV/mm}^2$ un uz E+ biomateriāla – $0,012 \text{ KVV/mm}^2$, minimālā uz E biomateriāla – $0,0044 \text{ KVV/mm}^2$ un uz E+ biomateriāla – $0,009 \text{ KVV/mm}^2$.

P. aeruginosa vidējā adhēzijas intensitāte uz E biomateriāla virsmas bija $0,01 \pm \text{SD } 0,001 \text{ KVV/mm}^2$ un uz E+ biomateriāla – $0,032 \pm \text{SD } 0,002 \text{ KVV/mm}^2$. Maksimālā *P. aeruginosa* adhēzijas intensitāte uz E biomateriāla bija $0,013 \text{ KVV/mm}^2$ un uz E+ biomateriāla – $0,035 \text{ KVV/mm}^2$. Minimālā adhēzijas intensitāte uz E biomateriāla bija $0,008 \text{ KVV/mm}^2$ un uz E+ biomateriāla – $0,030$ (4.1. tabula un 4.1. attēls).

4.1. tabula

S. epidermidis un *P. aeruginosa* adhēzijas intensitāte (KVV/mm^2) uz biomateriālu paraugu virsmas pēc 2 h kultivēšanas ($p < 0,05$)

Baktērijas	A	B	B+	C	D	D+	E	E+
<i>S. epidermidis</i>	0,05 $\pm 0,003$	0,005 $\pm 0,0003$	0,004 $\pm 0,0003$	0,026 $\pm 0,0007$	0,01 $\pm 0,0022$	0,048 $\pm 0,0021$	0,005 $\pm 0,0004$	0,01 $\pm 0,001$
<i>P. aeruginosa</i>	0,048 $\pm 0,0029$	0,005 $\pm 0,0003$	0,016 $\pm 0,004$	0,05 $\pm 0,0021$	0,026 $\pm 0,0037$	0,05 $\pm 0,001$	0,01 $\pm 0,001$	0,032 $\pm 0,002$



4.1. attēls. *S. epidermidis* un *P. aeruginosa* adhēzijas intensitāte (KVV/mm²) uz biomateriālu paraugu virsmas pēc 2 h kultivēšanas (p < 0,05)

4.1.2. Baktēriju kolonizācija *in vitro* uz stikla keramikas biomateriālu paraugiem

Baktēriju kolonizācija *in vitro* uz stikla keramikas biomateriālu A parauga

S. epidermidis un *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte pēc 48 un 72 stundu kultivēšanas uz pētāmo biomateriālu virsmas tika pētīta ar uzsējumu metodi un izvērtēšana veikta ar skenējošo elektronmikroskopu.

S. epidermidis vidējā kolonizācijas intensitāte uz A biomateriāla pēc 48 h kultivēšanas bija $186 \pm \text{SD } 3,67$ KVV/mm², maksimālā – 190 KVV/mm² un minimālā 180 KVV/mm². Savukārt pēc 72 h kultivēšanas *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte bija $1255 \pm \text{SD } 22,9$ KVV/mm², maksimālā – 1290 KVV/mm² un minimālā – 1230 KVV/mm².

P. aeruginosa vidējā kolonizācijas intensitāte uz A biomateriāla pēc 48 h kultivēšanas sasniedza $394 \pm \text{SD } 3,67$ KVV/mm², maksimālā kolonizācijas intensitāte bija 400 KVV/mm² un minimālā – 390 KVV/mm². Pēc 72 h kultivēšanas *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte pieauga līdz $2926 \pm \text{SD } 9,9$ KVV/mm², maksimālā kolonizācijas intensitāte bija 2936 KVV/mm² un minimālā – 2916 KVV/mm² (4.2. un 4.3. tabula, 4.2. un 4.3. attēls).

No iegūtajiem rezultātiem var secināt, ka A biomateriāla virsmas īpašības nav īpaši labvēlīgas pētījumā izmantoto baktēriju augšanai un to baktērijas kolonizē samērā neizteikti, kas varētu būt labs rezultāts, ja šāda veida biomateriālu izmantotu implantu gatavošanai.

Baktēriju kolonizācija *in vitro* uz stikla keramikas biomateriālu B un B+ paraugiem

B un B+ biomateriāliem virsma tika kolonizēta vidēji intensīvi.

Uz **B biomateriāla** pēc 48 h kultivēšanas *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte bija $132 \pm \text{SD } 2,73 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā – 400 KVV /mm^2 un minimālā 390 KVV/mm^2 . Pēc 72 h kultivēšanas *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte bija $835 \pm \text{SD } 7,9 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā – 845 KVV/mm^2 un minimālā 825 KVV/mm^2 .

P. aeruginosa vidējā kolonizācijas intensitāte uz B biomateriāla pēc 48 h kultivēšanas bija vēl izteiktāka – $239 \pm \text{SD } 3,3 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā kolonizācijas intensitāte bija 244 KVV/mm^2 un minimālā – 236 KVV/mm^2 . Pēc 72 h kultivēšanas *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte sasniedza $2505 \pm \text{SD } 6 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā intensitāte bija 2512 KVV/mm^2 un minimālā – 2498 KVV/mm^2 .

Uz **B+ biomateriāla** pēc 48 h kultivēšanas *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte bija $106 \pm \text{SD } 1,8 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā intensitāte – 109 KVV/mm^2 un minimālā – 104 KVV/mm^2 . Pēc 72 h kultivēšanas *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte pieauga līdz $1042 \pm \text{SD } 8,6 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā intensitāte bija 1056 KVV/mm^2 un minimālā – 1034 KVV/mm^2 .

B+ biomateriāls pēc 48 h kultivēšanas piesaistīja *P. aeruginosa* ar vidējo kolonizācijas intensitāti $186 \pm \text{SD } 2,2 \text{ KVV/mm}^2$. Maksimālā kolonizācijas intensitāte bija 189 KVV /mm^2 un minimālā – 183 KVV/mm^2 . Pēc 72 h kultivēšanas *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte izteikti pieauga – līdz $2090 \pm \text{SD } 8,6 \text{ KVV/mm}^2$. Maksimālā kolonizācijas intensitāte bija 2099 KVV/mm^2 un minimālā – 2081 KVV/mm^2 (4.2. un 4.3. tabula, 4.2. un 4.3. attēls).

Baktēriju kolonizācija *in vitro* uz stikla keramikas biomateriālu C parauga

Uz C biomateriālu virsmas abu baktēriju kolonizācija notika intensīvi.

S. epidermidis vidējā kolonizācijas intensitāte uz C biomateriāla pēc 48 h kultivēšanas bija $196 \pm \text{SD } 2,5 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā – 199 KVV/mm^2 un minimālā – 192 KVV/mm^2 . Pēc 72 h kultivēšanas *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte palielinājās līdz $1245 \pm \text{SD } 4,6 \text{ KVV/mm}^2$. Maksimālā kolonizācijas intensitāte bija 1252 KVV /mm^2 un minimālā – 1240 KVV/mm^2 .

P. aeruginosa vidējā kolonizācijas intensitāte uz C biomateriāla pēc 48 h kultivēšanas bija lielāka nekā stafilokoka gadījumā – $399 \pm \text{SD } 3,3 \text{ KVV/mm}^2$. Maksimālā kolonizācijas

intensitāte bija 404 KVV /mm² un minimālā – 395 KVV/mm². Pēc 72 h kultivēšanas *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte sasniedza pat 3340 ± SD7,9 KVV/mm². Maksimālā kolonizācijas intensitāte bija 3350 KVV/mm² un minimālā – 3330 KVV/mm² (4.2. un 4.3. tabula, 4.2. un 4.3. attēls).

Baktēriju kolonizācija *in vitro* uz stikla keramikas biomateriālu D un D+ paraugiem

Uz D un D+ biomateriāliem tika novērota zema kolonizācijas intensitāte.

S. epidermidis vidējā kolonizācijas intensitāte pēc 48 h kultivēšanas bija tikai 79 ± SD 2,9 KVV/mm² (D biomateriāls) un 96 ± SD 2,5 KVV/mm² (D+ biomateriāls), bet pēc 72 h kultivēšanas *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte palielinājās līdz 835 ± SD 3,9 KVV/mm² (D biomateriāls) un 607 ± SD 2,5 KVV /mm² (D+ biomateriāls).

P. aeruginosa vidējā kolonizācijas intensitāte pēc 48 h kultivēšanas bija nedaudz lielāka – 106 ± SD 1,7 KVV/mm² (D biomateriāls) un 122 ± SD 1,8 KVV/mm² (D+ biomateriāls), bet pēc 72 h kultivēšanas *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte uz D un D+ biomateriāla pieauga stipri vairāk par stafilokokiem – attiecīgi 1670 ± SD7,9 KVV/mm² un 1255 ± SD7,0 KVV/mm² (4.2. un 4.3. tabula, 4.2. un 4.3. attēls).

Baktēriju kolonizācija *in vitro* uz stikla keramikas biomateriālu E un E+ paraugiem

Uz E un E+ biomateriāliem pēc 48 h kultivēšanas *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte bija samērā zema, salīdzinot ar citiem biomateriāliem – 53 ± SD 3,6 KVV/mm² (E biomateriāls) un 117 ± SD 2,5 KVV/mm² (E+ biomateriāls), bet pēc 72 h kultivēšanas *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte uz E un E+ biomateriāla bija attiecīgi 422 ± SD4 KVV/mm² un 1265 ± SD7,6 KVV/mm².

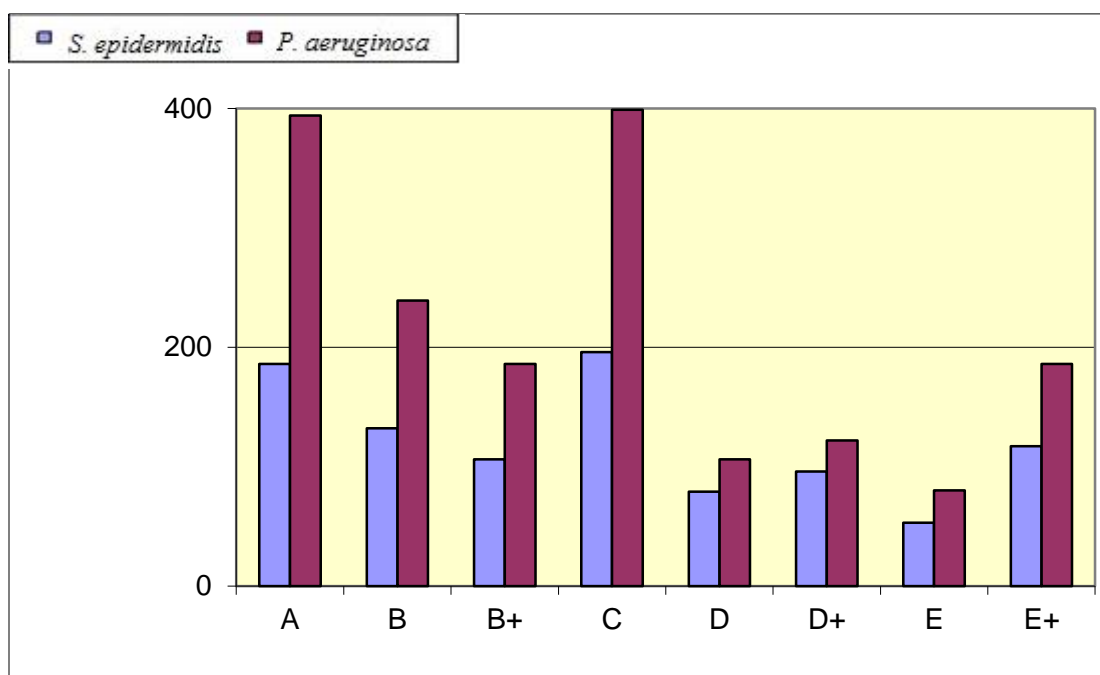
Uz E un E+ biomateriāliem pēc 48 h kultivēšanas *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte nebija augsta – tikai 80 ± SD 1,6 KVV/mm² (E biomateriāls) un 186 ± SD 2,7 KVV/mm² (E+ biomateriāls), bet pēc 72 h kultivēšanas *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte uz E un E+ biomateriāla bija attiecīgi 835 ± SD14 KVV/mm² un 2505 ± SD7,9 KVV/mm² (4.2. un 4.3. tabula, 4.2. un 4.3. attēls).

S. epidermidis un *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte pēc 48 h kultivēšanas, KVV/mm²
(p < 0,05)

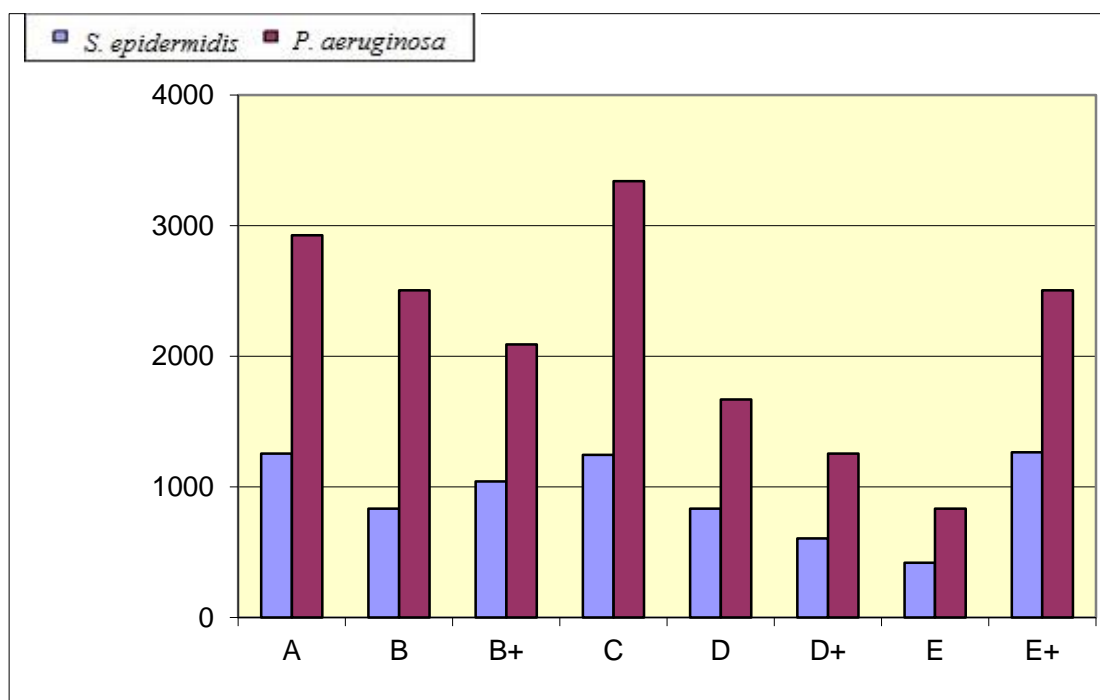
Baktērija	A	B	B+	C	D	D+	E	E+
<i>S. epidermidis</i>	186 ± 3,67	132 ± 2,73	106 ± 1,8	196 ± 2,5	79 ± 2,9	96 ± 2,5	53 ± 3,6	117 ± 2,5
<i>P. aeruginosa</i>	394 ± 3,67	239 ± 3,3	186 ± 2,2	399 ± 3,3	106 ± 1,7	122 ± 1,8	80 ± 1,6	186 ± 2,7

S. epidermidis un *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte pēc
72 h kultivēšanas, KVV/mm² (p < 0,05)

Baktērija	A	B	B+	C	D	D+	E	E+
<i>S. epidermidis</i>	1255 ± 22,9	835 ± 7,9	1042 ± 8,6	1245 ± 4,6	835 ± 3,9	607 ± 2,5	422 ± 4	1265 ± 7,6
<i>P. aeruginosa</i>	2926 ± 9,9	2505 ± 6	2090 ± 8,6	3340 ± 7,9	1670 ± 7,9	1255 ± 7,0	835 ± 14	2505 ± 7,9



4.2. attēls. *S. epidermidis* un *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte (KVV/mm²)
uz biomateriālu paraugu virsmas pēc 48 h kultivēšanas (p < 0,05)



4.3. attēls. *S. epidermidis* un *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte (KVV/mm²) uz biomateriālu paraugu virsmas pēc 72 h kultivēšanas ($p < 0,05$)

4.1.3. Stikla keramikas biomateriālu izmeklēšanas rezultāti ar skenējošo elektronmikroskopiju

Analizējot attēlus, kas iegūti, izmantojot skenējošo elektronmikroskopu, ļoti labi varēja novērot atšķirīgo *P. aeruginosa* un *S. epidermidis* kolonizācijas raksturu uz pētāmajiem biomateriāliem. Tika novērots, ka *P. aeruginosa* bija tendence kolonizēt visu biomateriāla virsmu, veidojot vairāk vai mazāk biezu biofilmu ar to caurvijošiem kanāliem. Pēc 72 h kolonizācijas varēja novērot glikokaliksu, kas pilnīgi pārklāja koloniju, nosedzot arī kanālus. *P. aeruginosa* uzrādīja labāku kolonizācijas tendenci arī uz kristāliskiem un kodinātiem biomateriāliem, ja salīdzina ar biomateriāliem ar amorfāku virsmu. Līdzīgi kā *P. aeruginosa* arī *S. epidermidis* uzrādīja tendenci labāk kolonizēt kristāliskos un kodinātos biomateriālus. Savukārt *P. aeruginosa* kolonizācija atšķirībā no *S. epidermidis* kolonizācijas notika, veidojot retas un kompakts kolonijas.

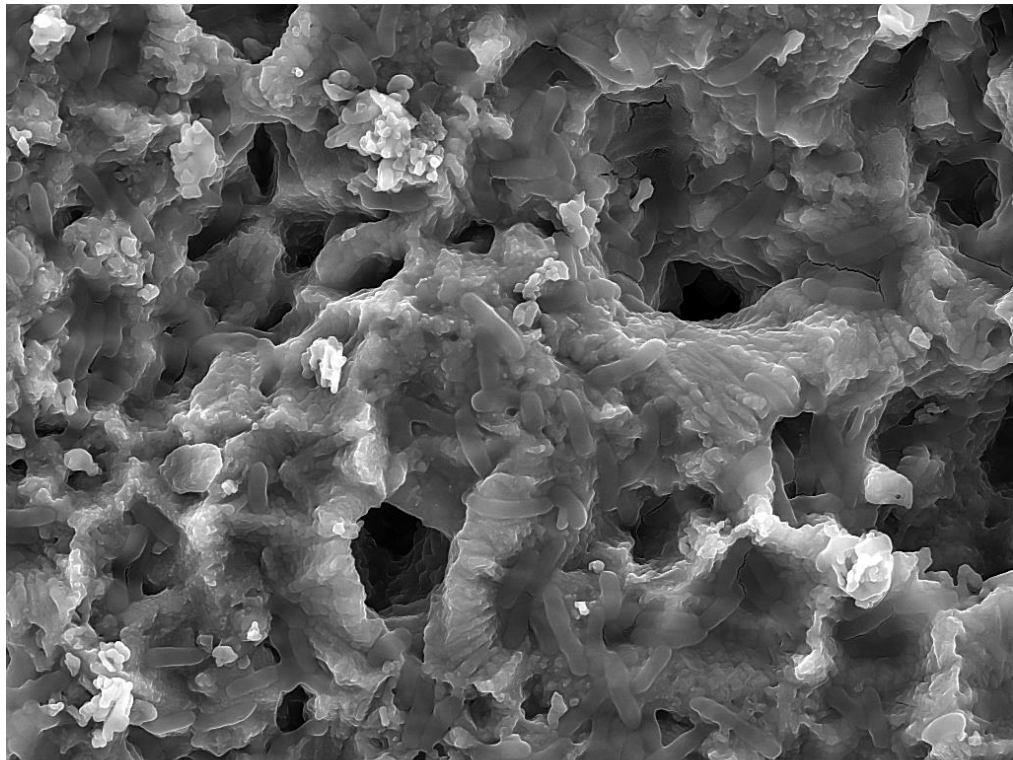
Novērojām, ka uz amorfās virsmas biomateriāliem (D biomateriāls) *P. aeruginosa* neveido tik biezu biofilmu kā uz kristāliskajiem (B biomateriāls), un uz tiem, lai arī tiek kolonizēta visa virsma, biofilma ir plānāka un nav tik izteikti klāta ar glikokaliksu (4.4., 4.5., 4.6. un 4.7. attēls) kā kristāliskā B biomateriāla gadījumā (4.8. un 4.9. attēls). Tas liek domāt, ka biomateriāli ar amorfāku virsmu nav tik labvēlīgi baktēriju kolonizācijai kā biomateriāli ar kristālisko virsmu. Piemēram, *S. epidermidis* kolonizācija 48 un 72 stundu laikā uz kristāliskā

B biomateriāla ir attēlota 4.8. un 4.9. attēlā, kur ir redzama biomateriāla virsma, respektīvi, stafilokoks to kolonizē atsevišķos punktos, neveidojot vienmērīgu pārklājumu un izklaidus novietotas kolonijas kā *P. aeruginosa*. Šo atšķirīgo *P. aeruginosa* un *S. epidermidis* kolonizācijas raksturu uz pētāmajiem biomateriāliem var novērot 4.4., 4.5., 4.8. un 4.9. attēlā, kur kā piemērs parādīts kristāliskais B biomateriāls un var redzēt *P. aeruginosa* biofilmas veidošanās dinamiku uz B biomateriāla virsmas. Pēc 48 stundām bija novērojama ar glikokaliksu pārklāta biofilma, ko caurvij kanāli, caur kuriem vēl redzama biomateriāla kristāliskā virsma (4.4. attēls), bet pēc 72 stundām biomateriāla virsmu jau sedza pilnīgi kompakta, ar glikokaliksu noklāta biofilma (4.5. attēls).

Raksturīga amorfa virsma ir D biomateriālam (4.10. attēls), uz kura stafilokoks izteiktākas kolonijas veido tikai vēlākās kolonizācijas stadijās – pēc 72 stundām (4.11. attēls), kad *S. epidermidis* koloniju pārklāj glikokaliksa slānis. Savukārt uz šī paša D biomateriāla novērojām gandrīz pilnīgu virsmas kolonizāciju ar *P. aeruginosa* (4.6. un 4.7. attēls).

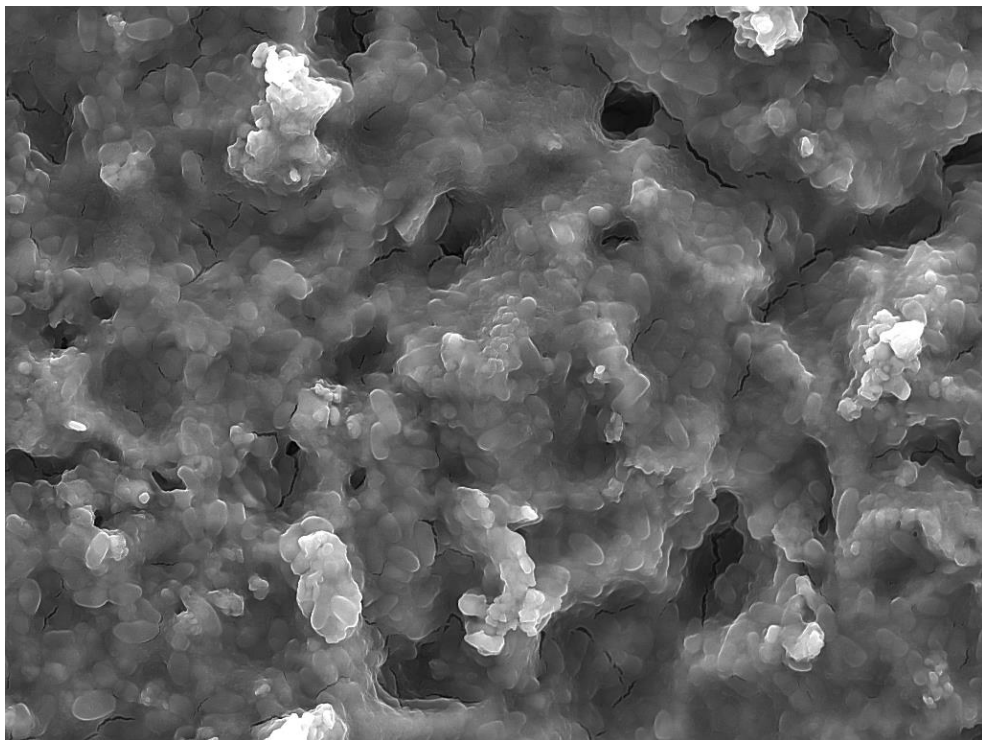
Runājot par kodinātajiem biomateriāliem, jāakcentē, ka kodināšanu veica ar mērķi uz virsmas samazināt vieglāk šķīstošo amorfo fāzi, un ir labi redzamas B+ kodinātā biomateriāla (4.12. attēls) virsmas atšķirības, salīdzinot ar nekodināto B biomateriālu (4.4. attēls). Tāpat labi saskatāmas arī biomateriāla D+ kodinātā biomateriāla virsmas (4.13. attēls) atšķirības, salīdzinot ar D biomateriāla virsmu (4.10. attēls).

Tātad ir jādomā, ka biomateriāliem ar izteiktu amorfo fāzi piemīt lielāka spēja piesaistīt pie savas virsmas mikroorganismus, līdz ar to, kodināšanas procesā samazinot amorfo fāzi uz biomateriāla virsmas, varētu panākt, ka biomateriāls kļūst mikrobioloģiski “nedrošāks” – tas vairāk spēj piesaistīt baktērijas.



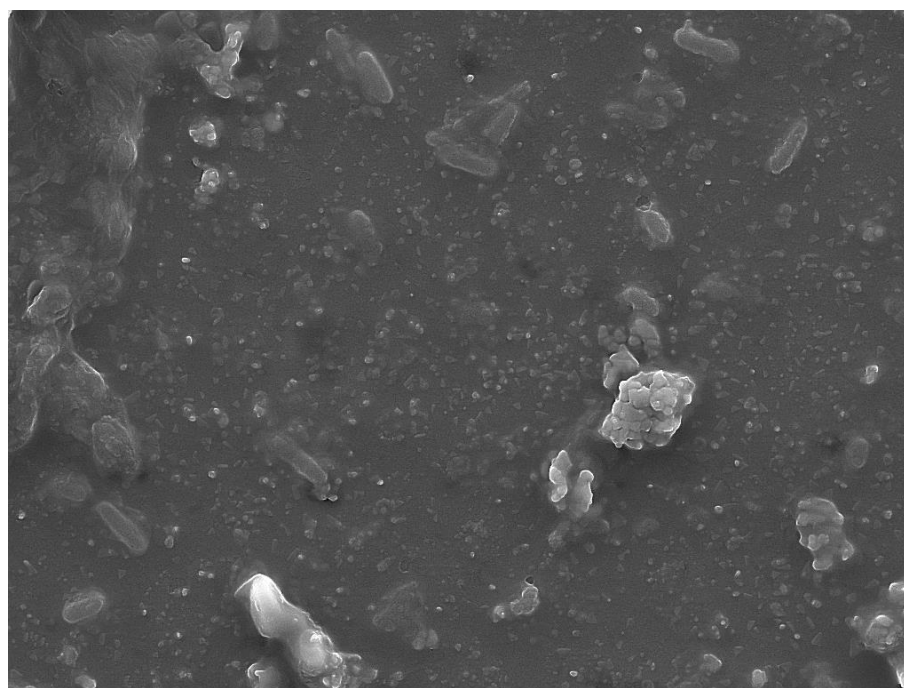
SEM MAG: 10.00 kx Vac: HiVac
SEM HV: 15.00 kV WD: 8.1373 mm 10 µm MIRA\ TESCAN
Date(m/d/y): 12/06/08 Det: SE Detector Riga Technical University

4.4. attēls. *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte uz **B** biomateriāla virsmas pēc 48 stundām



SEM MAG: 10.00 kx Vac: HiVac
SEM HV: 15.00 kV WD: 7.8815 mm 10 µm MIRA\ TESCAN
Date(m/d/y): 12/06/08 Det: SE Detector Riga Technical University

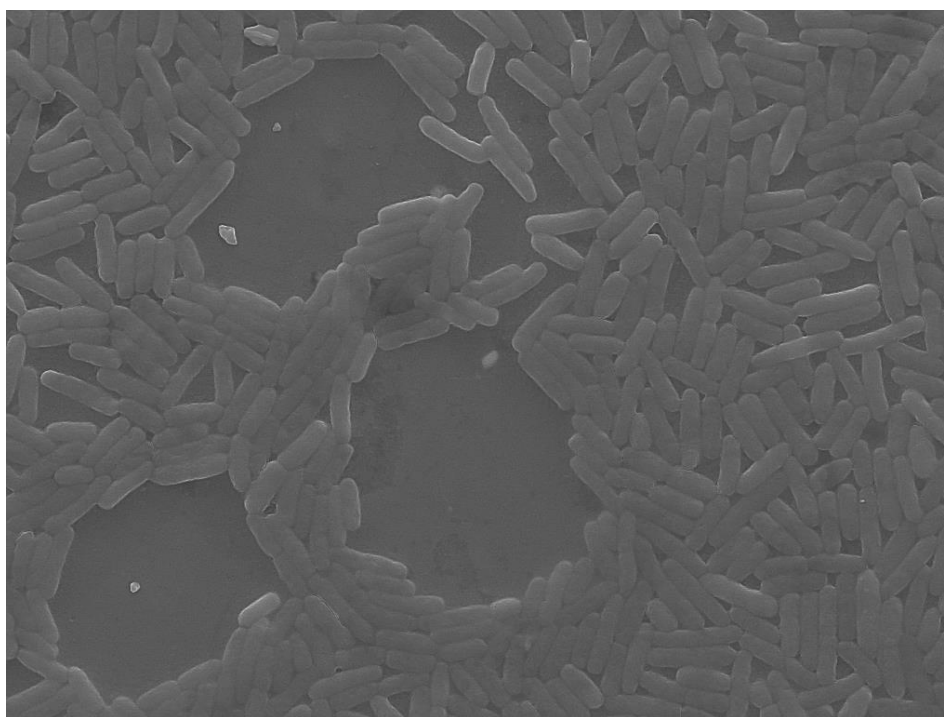
4.5. attēls. *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte uz **B** biomateriāla virsmas pēc 72 stundām



SEM MAG: 10.00 kx Vac: HiVac
SEM HV: 15.00 kV WD: 8.1432 mm
Date(m/d/y): 12/11/08 Det: SE Detector

10 μ m MIRA\ TESCAN
Riga Technical University

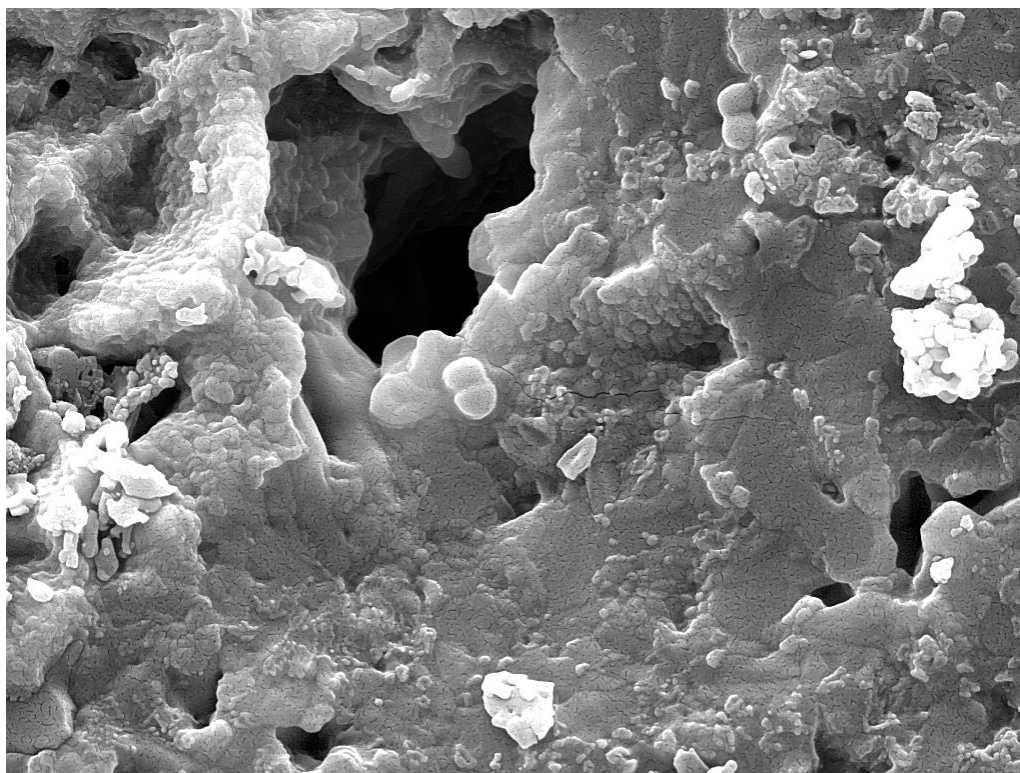
4.6. attēls. *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte uz D biomateriāla ar amorfu virsmu pēc 48 stundām



SEM MAG: 10.00 kx Vac: HiVac
SEM HV: 15.00 kV WD: 8.0043 mm
Date(m/d/y): 12/06/08 Det: SE Detector

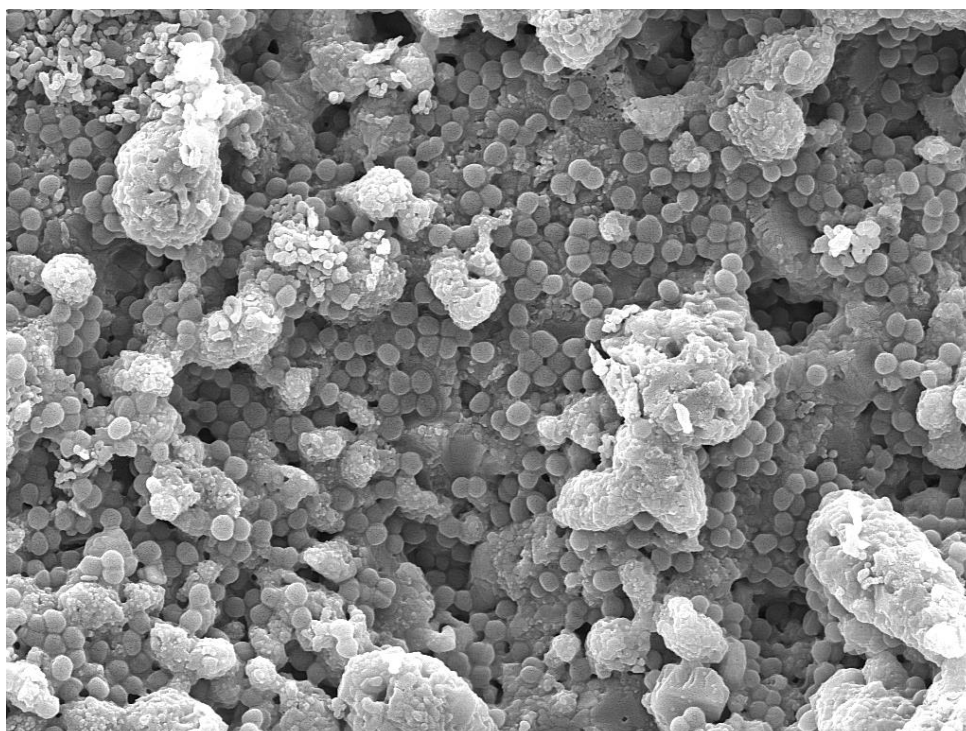
10 μ m MIRA\ TESCAN
Riga Technical University

4.7. attēls. *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte uz D biomateriāla ar amorfu virsmu pēc 72 stundām



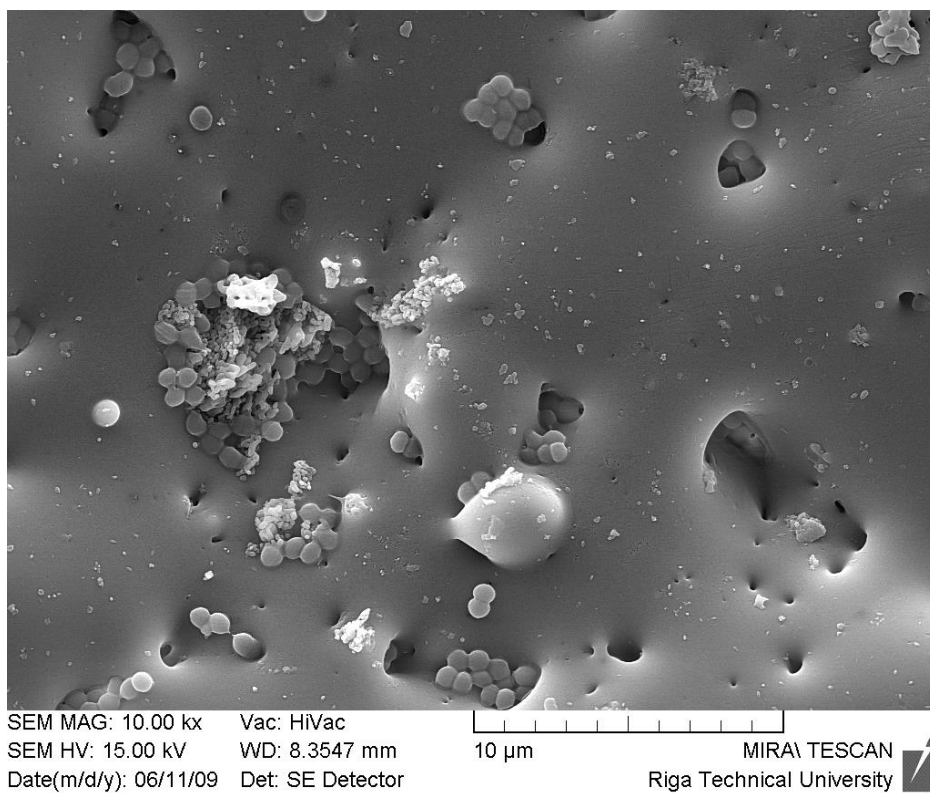
SEM MAG: 20.00 kx Vac: HiVac
SEM HV: 15.00 kV WD: 8.4484 mm 5 µm MIRA\ TESCAN
Date(m/d/y): 06/12/09 Det: SE Detector Riga Technical University

4.8. attēls. *S. epidermidis* kolonizācijas intensitāte uz B biomateriāla virsmas pēc 48 stundām

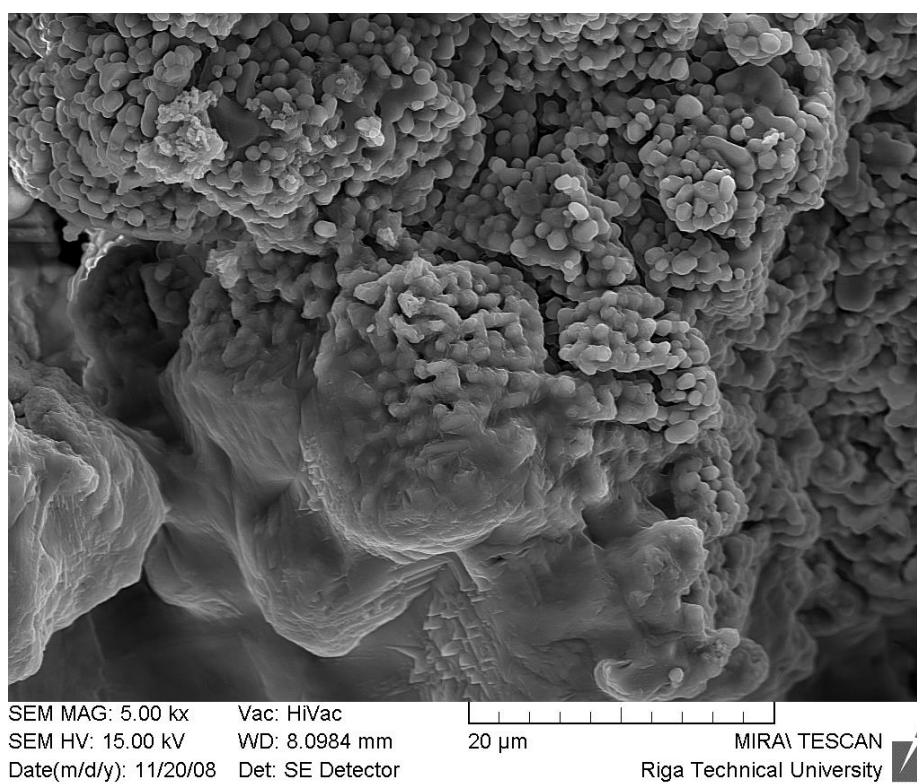


SEM MAG: 10.00 kx Vac: HiVac
SEM HV: 15.00 kV WD: 8.3413 mm 10 µm MIRA\ TESCAN
Date(m/d/y): 06/12/09 Det: SE Detector Riga Technical University

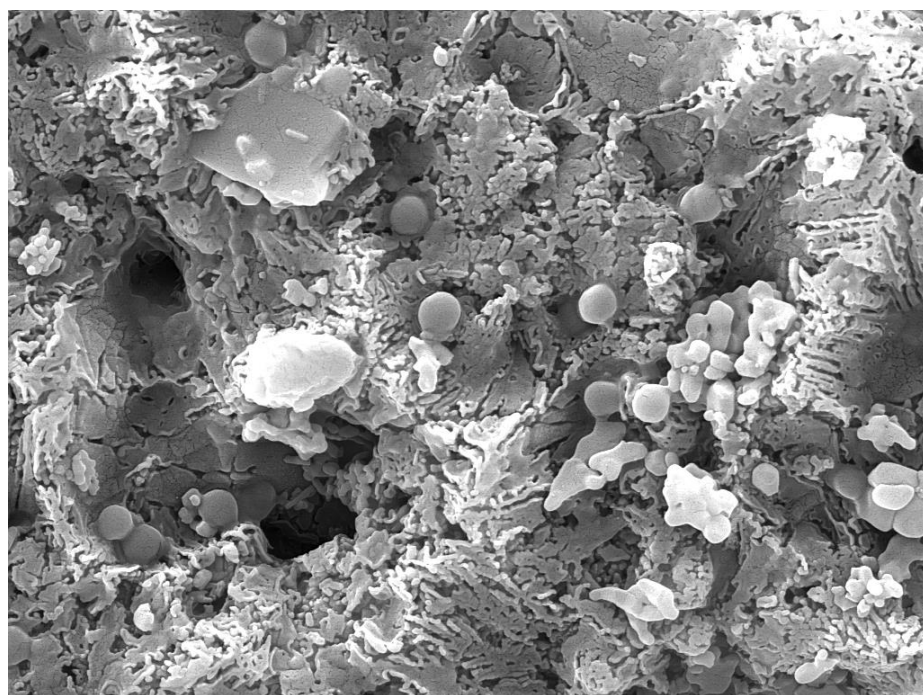
4.9. attēls. *S. epidermidis* kolonizācijas intensitāte uz B biomateriāla virsmas pēc 72 stundām



4.10. attēls. *S. epidermidis* kolonizācijas intensitāte uz D biomateriāla ar amorfu virsmu pēc 48 stundām

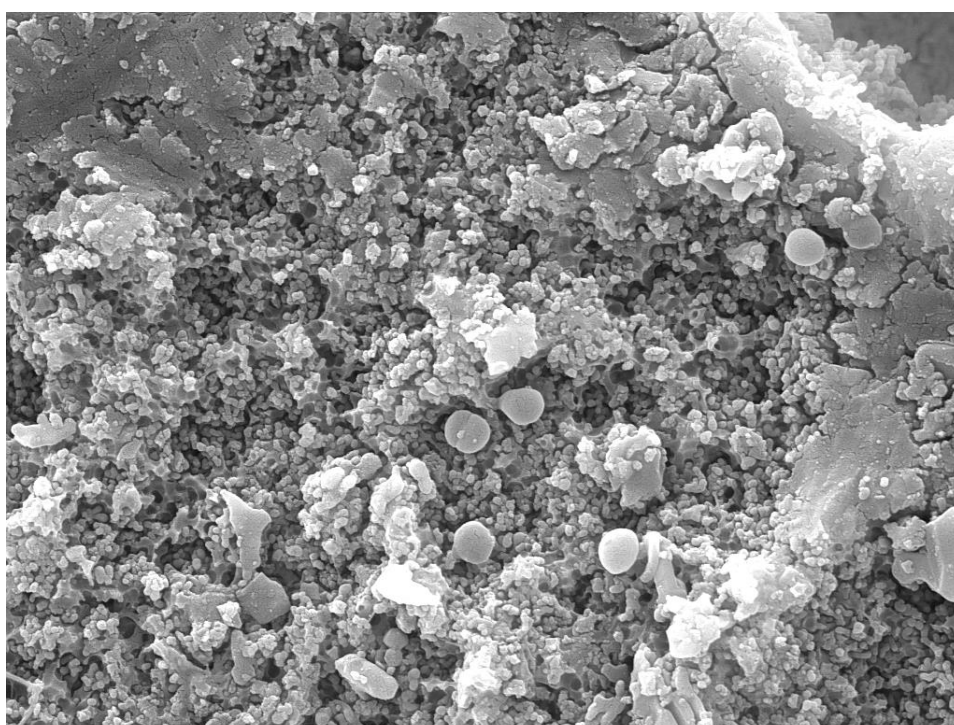


4.11. attēls. *S. epidermidis* kolonizācijas intensitāte uz D biomateriāla ar amorfu virsmu pēc 72 stundām



SEM MAG: 20.00 kx Vac: HiVac
SEM HV: 15.00 kV WD: 10.4240 mm 5 µm MIRA\TESCAN
Date(m/d/y): 06/08/09 Det: SE Detector Riga Technical University

4.12. attēls. Kodināts B+ biomateriāls ar *S. epidermidis* kolonizāciju pēc 48 stundām



SEM MAG: 20.00 kx Vac: HiVac
SEM HV: 15.00 kV WD: 8.4328 mm 5 µm MIRA\TESCAN
Date(m/d/y): 06/08/09 Det: SE Detector Riga Technical University

4.13. attēls. Kodināts D+ biomateriāls ar *S. epidermidis* kolonizāciju pēc 48 stundām

4.1.4. Stikla keramikas biomateriālu kolonizācija *in vivo*

Stikla keramikas biomateriālu mikrobiālā kolonizācija *in vivo* pētījumā tika izvērtēta pēc 2 un 4 nedēļu, kā arī 3 mēnešu ekspozīcijas truša organismā.

Tika novērots, ka *S. epidermidis* ļoti minimāli kolonizē biomateriālu *in vivo* vidē (4.4. tabula). Truša audu paraugu uzsējumi pēc 2 nedēļu *in vivo* ekspozīcijas gan abu biomateriālu (A un B), gan abu bakteriālo koncentrāciju gadījumos (10^2 un 10^3 KVV/ml) bija negatīvi.

Savukārt uz biomateriālu paraugiem B+ pēc 2 nedēļu ekspozīcijas no 10^2 un 10^3 KVV/ml novēroja vienādi nelielu kolonizācijas intensitāti – $0,01 \pm SD 0,0001$ KVV/mm² ($p < 0,001$).

Pēc 4 nedēļu ekspozīcijas 10^2 KVV/ml *S. epidermidis* kolonizācijas intensitāte uz biomateriāla A bija negatīva, taču uz visiem atlikušajiem biomateriālu paraugiem, kas tika eksponēti 10^2 un 10^3 KVV/ml, kolonizācijas intensitāte bija gandrīz vienāda.

Atšķirība bija vērojama uzsējumos no paraugiem, kuri bija kontaminēti ar *P. aeruginosa* (4.5. tabula). Pēc 2 nedēļu ekspozīcijas vismazāko kolonizācijas intensitāti novēroja uz biomateriāla B, kurš bija kontaminēts 10^2 KVV/ml koncentrācijā. Kolonizācijas intensitāte šim paraugam bija $0,21 \pm SD 0,01$ KVV/mm² ($p < 0,001$), bet augstākā intensitāte bija B+ biomateriālam – $8,01 \pm SD 0,008$ KVV/mm² ($p < 0,001$). Biomateriālam A, kurš tika kontaminēts 10^3 KVV/ml koncentrācijā, pēc 2 nedēļu ekspozīcijas bija vismazākā kolonizācijas intensitāte – $1,65 \pm SD 0,01$ KVV/mm² ($p < 0,001$), bet augstāka intensitāte bija B+ biomateriālam – $8,7 \pm SD 0,11$ KVV/mm² ($p < 0,001$).

Pēc 4 nedēļu ekspozīcijas vismazākā kolonizācijas intensitāte 10^2 KVV/ml koncentrācijā tika konstatēta B+ biomateriālam, kas bija $0,42 \pm SD 0,01$ KVV/mm² ($p < 0,001$), bet augstāku intensitāti atradām A biomateriālam – $2,23 \pm SD 0,02$ KVV/mm² ($p < 0,001$). Pēc 4 nedēļu ekspozīcijas vismazāko kolonizācijas intensitāti 10^3 KVV/ml koncentrācijā uzrādīja B+ biomateriāls ar kolonizācijas intensitāti $2,18 \pm SD 0,008$ KVV/mm² ($p < 0,001$), bet augstāko intensitāti uzrādīja B biomateriāls – $3,13 \pm SD 0,01$ KVV/mm² ($p < 0,001$).

Analizējot *in vivo* paraugu mikrobioloģisko uzsējumu rezultātus pēc 3 mēnešu *in vivo* ekspozīcijas truša organismā (4.4. tabula), redzams, ka *S. epidermidis* kolonizē A, B un B+ biomateriālu paraugus *in vivo* vidē tikai 10^3 KVV/ml koncentrācijā. Visos trijos gadījumos kolonizācijas intensitāte bija līdzīga. Uz A biomateriāla vidējā kolonizācijas intensitāte bija $0,015 \pm SD 0,001$ KVV/mm² ($p < 0,001$), maksimālā – $0,017$ KVV/mm² un minimālā – $0,013$ KVV/mm². Uz B biomateriāla kolonizācijas intensitāte bija $0,015 \pm SD 0,002$ KVV/mm² ($p < 0,001$), maksimālā – $0,017$ KVV/mm² un minimālā – $0,012$ KVV/mm². Tieši tāpat bija

uz B+ biomateriāla – kolonizācijas intensitāte bija $0,015 \pm \text{SD } 0,002 \text{ KVV/mm}^2$ ($p < 0,001$), maksimālā intensitāte – $0,017 \text{ KVV/mm}^2$ un minimālā – $0,013 \text{ KVV/mm}^2$.

Pēc 3 mēnešu *P. aeruginosa* uzsējuma tikai uz 10^3 KVV/ml koncentrācijā eksponētā A biomateriāla tika novērota kolonizācija (4.5. tabula); kolonizācijas intensitāte bija $0,11 \pm \text{SD } 0,02 \text{ KVV/mm}^2$ ($p = 0,02$), maksimālā kolonizācijas intensitāte – $0,13 \text{ KVV/mm}^2$ un minimālā kolonizācijas intensitāte – $0,08 \text{ KVV/mm}^2$.

Iegūtie rezultāti varētu liecināt par to, ka, izmantojot A, B, B+ biomateriālus praksē, ar implantiem saistīto infekciju riska attīstība ilgstošā periodā pēc ķirurģiskās manipulācijas veikšanas ir samērā zema.

4.4. tabula

***S. epidermidis* kolonizācijas intensitāte (KVV/mm^2) uz biomateriālu virsmas pēc 2 un 4 nedēļu un 3 mēnešu ekspozīcijas ($p < 0,05$)**

Biomateriāls, kontaminēts ar	2 nedēļas	4 nedēļas	3 mēneši
A – 10^2 KVV/ml	negatīvs*	negatīvs	negatīvs
A – 10^3 KVV/ml	negatīvs	$0,005 \pm 0,0004$	$0,015 \pm 0,001$
B – 10^2 KVV/ml	negatīvs	$0,005 \pm 0,0003$	negatīvs
B – 10^3 KVV/ml	negatīvs	$0,005 \pm 0,00029$	$0,015 \pm 0,002$
B+ – 10^2 KVV/ml	$0,01 \pm 0,0001$	$0,005 \pm 0,0003$	negatīvs
B+ – 10^3 KVV/ml	$0,01 \pm 0,0001$	$0,005 \pm 0,0004$	$0,005 \pm 0,0003$

* Uzsējums negatīvs.

4.5. tabula

***P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte (KVV/mm^2) uz biomateriālu virsmas pēc 2 un 4 nedēļu un 3 mēnešu ekspozīcijas ($p < 0,05$)**

Biomateriāls, kontaminēts ar	2 nedēļas	4 nedēļas	3 mēneši
A – 10^2 KVV/ml	$1,17 \pm 0,008$	$2,23 \pm 0,02$	negatīvs
A – 10^3 KVV/ml	$1,65 \pm 0,01$	$2,34 \pm 0,008$	$0,11 \pm 0,02$
B – 10^2 KVV/ml	$0,21 \pm 0,01$	$0,9 \pm 0,14$	negatīvs*
B – 10^3 KVV/ml	$1,8 \pm 0,05$	$3,13 \pm 0,014$	negatīvs
B+ – 10^2 KVV/ml	$8,01 \pm 0,008$	$0,42 \pm 0,01$	negatīvs
B+ – 10^3 KVV/ml	$8,7 \pm 0,11$	$2,18 \pm 0,008$	negatīvs

* Uzsējums negatīvs.

4.1.5. Stikla keramikas biomateriālu imūnhistoķīmisko pētījumu atrade

4.1.5.1. Citokīnu ekspresija audos ap kontroles grupas paraugiem

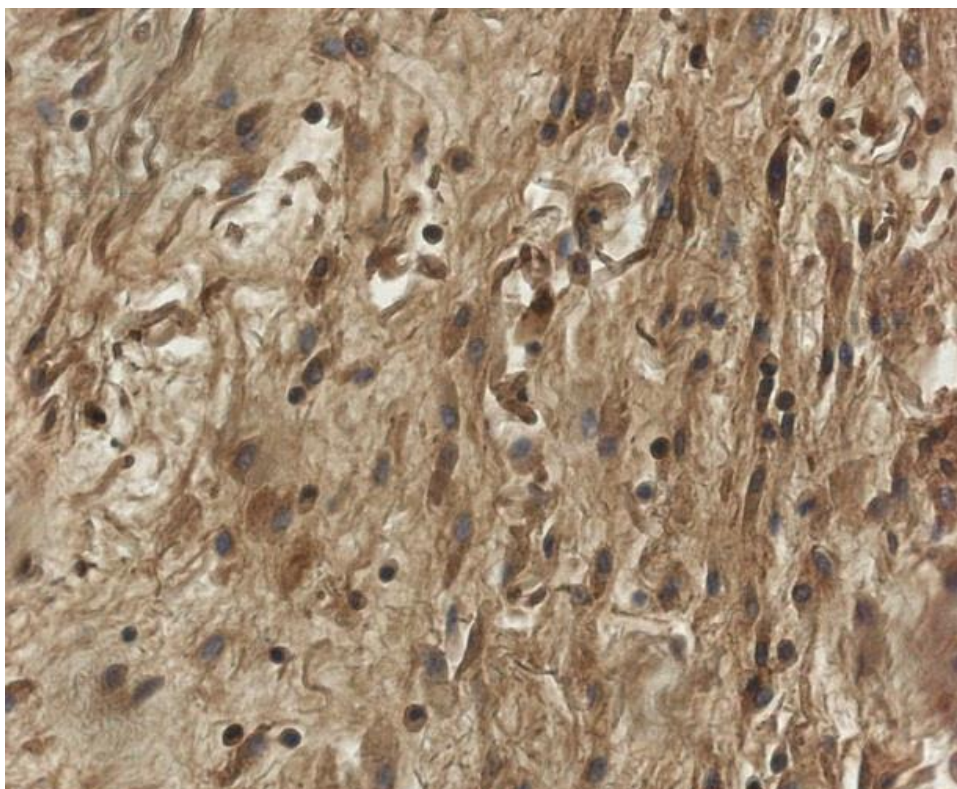
In vivo pētījumā trīs kontroles stikla keramikas paraugi A, B un B+ tika implantēti bez iepriekšējas bakteriālas kontaminācijas. Ar imūnhistoķīmisko metožu palīdzību apkārtējos audos noteica citokīnu ekspresiju (4.14., 4.15., 4.16. attēls un 4.6. tabula).

Pēc 2 nedēļu ekspozīcijas audos ap A biomateriāla paraugu, kas kalpoja kā kontroles paraugs un nebija pirms implantācijas procedūras kontaminēts ar kādu no pētījumā izmantotajiem mikroorganismiem, novēroja vidējas intensitātes TNF- α un mazas intensitātes β -defensīna-2 ekspresiju makrofāgos un fibroblastos. Pētījumā noteikto citokīnu ekspresija paraugos pēc 4 nedēļu ekspozīcijas truša organismā bija nedaudz samazinājusies. Gandrīz nevarēja novērot atšķirību TNF- α ekspresijā audu paraugos ap B un B+ biomateriāliem – novēroja vidēju TNF- α ekspresiju makrofāgos un fibroblastos. Turklāt B+ biomateriāla gadījumā novēroja ļoti intensīvu TNF- α ekspresiju fibroblastos saistaudu kapsulā ap pašu biomateriālu. Audu paraugos pēc 4 nedēļām minētā citokīna ekspresija nedaudz samazinājās.

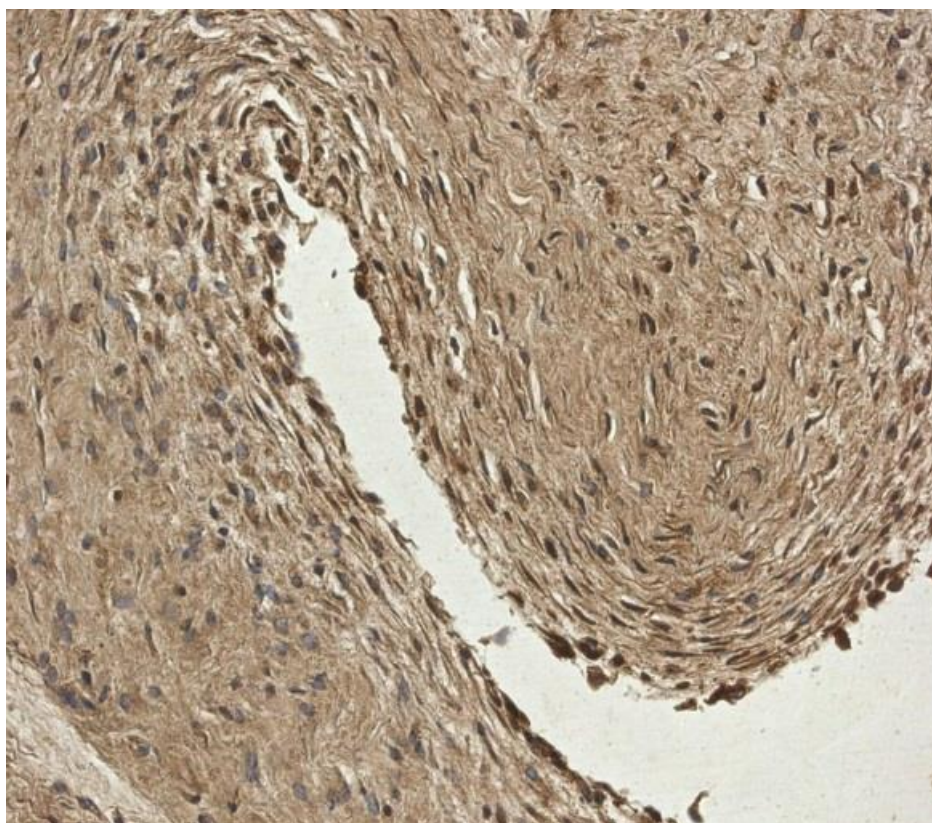
B defensīna-2 ekspresija makrofāgos un fibroblastos ap B biomateriālu bija vāja gan pēc 2 nedēļu, gan pēc 4 nedēļu un 3 mēnešu ekspozīcijas truša audos. Izteiktākas izmaiņas β defensīna-2 ekspresijas atšķirībā starp 2 un 4 nedēļu paraugiem varēja novērot ap B+ paraugu – paraugos pēc 2 nedēļu ekspozīcijas šo citokīnu novēro vidējas ekspresijas intensitātē, bet pēc 4 nedēļām un 3 mēnešiem – novēroja tikai retas pozitīvas struktūras.

Il-10 ekspresija ap visiem trim paraugiem bija augsta gan pēc 2 nedēļu, gan pēc 4 nedēļu ekspozīcijas, bet pēc 4 nedēļu ekspozīcijas novēroja nelielu tendenci minētajam citokīnam paraugos samazināties. Pēc 3 mēnešu ekspozīcijas Il-10 ekspresija bija samazinājusies un kļuvusi maz izteikta audos ap B un B+ biomateriāliem. Ap A biomateriālu Il-10 ekspresija saglabāja vidēju intensitāti.

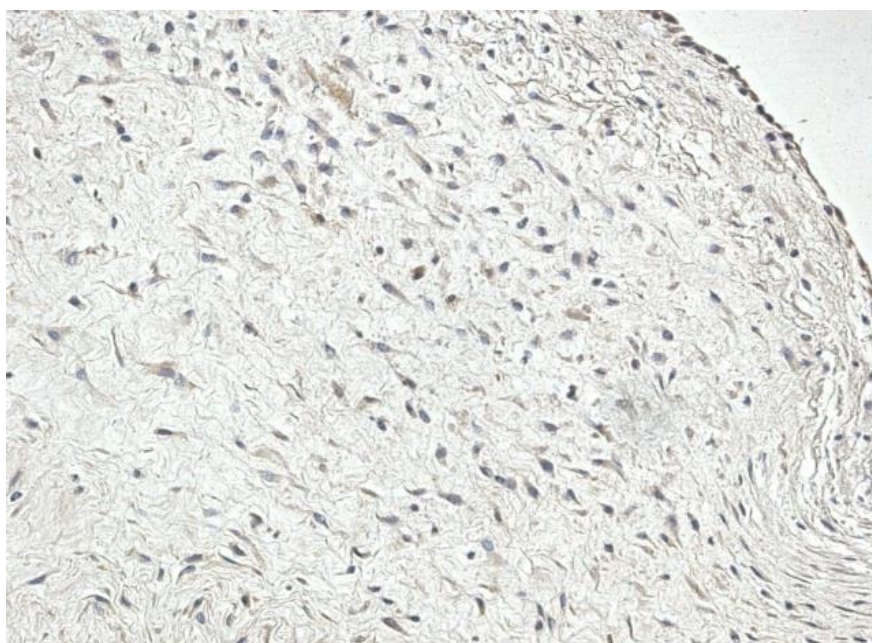
Iegūtie iekaisuma citokīnu un antimikrobo peptīdu ekspresijas rezultāti varētu liecināt par *in vivo* pētījumā izmantoto stikla keramikas biomateriālu spēju pašiem ierosināt izteiktu iekaisuma reakciju – t. sk. augstu reaktogenitātes spēju.



4.14. attēls. TNF- α ekspresija audos 2 nedēļas pēc sterila stikla keramikas biomateriāla parauga A implantācijas, palielinājums 400×



4.15. attēls. IL-10 ekspresija audos 2 nedēļas pēc sterila stikla keramikas biomateriāla parauga A implantācijas, palielinājums 250×



4.16. attēls. B defensīna-2 ekspresija audos 2 nedēļas pēc sterila stikla keramikas biomateriāla parauga A implantācijas, palielinājums 250×

4.6. tabula

Puskvantitatīvie iekaisuma citokīnu un antimikrobo peptīdu ekspresijas rezultāti* audos ap steriliem kontroles A, B, B+ biomateriālu paraugiem

Kontroles paraugu implantācijas laiks	Paraugs	TNF- α	Il-10	B defensīns-2
2 nedēļas	A	++	+++	+
	B	++	++++	+
	B+	++	+++	+
4 nedēļas	A	+	++	+
	B	++	++	+
	B+	+++	++++	±
3 mēneši	A	+	++	+
	B	±	+	+
	B+	±	+	+

* Citokīnu ekspresija izteikta “četrus krustu” sistēmā, kur atrade apzīmēta šādi: “-” – negatīva, “±” – ļoti vāji pozitīva “+” – vāji pozitīva, “++” – vidēji pozitīva, “+++” – izteikti pozitīva, “++++” – ļoti izteikti pozitīva.

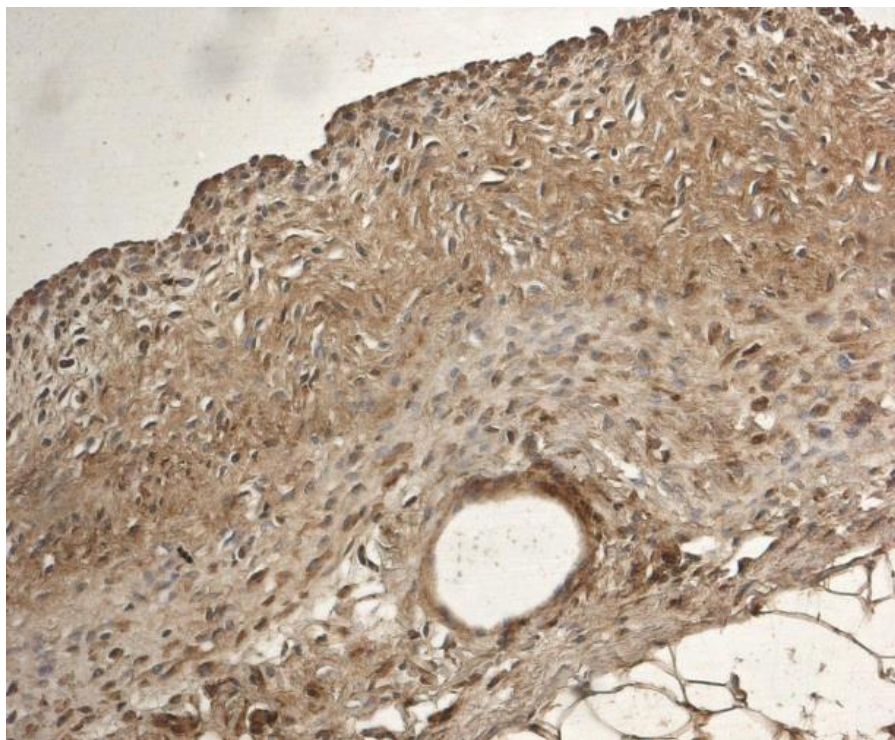
4.1.5.2. Citokīnu ekspresija audos ap ar *S. epidermidis* kontaminētiem stikla keramikas paraugiem

Audu paraugos ap A biomateriālu (4.17., 4.18., 4.19. attēls un 4.7. tabula), kuri bija kontaminēti ar *S. epidermidis* suspensiju 10^2 KVV/ml koncentrācijā, pēc 2 nedēļām novēroja vidēji izteiktu TNF- α , ļoti izteiktu Il-10 un vāji izteiktu β defensīna-2 ekspresiju makrofāgos un fibroblastos, bet audos ap B un B+ biomateriāliem minēto TNF- α un β defensīna-2 ekspresija bija vēl augstāka. Ar *S. epidermidis* kontaminētos paraugos 10^3 KVV/ml

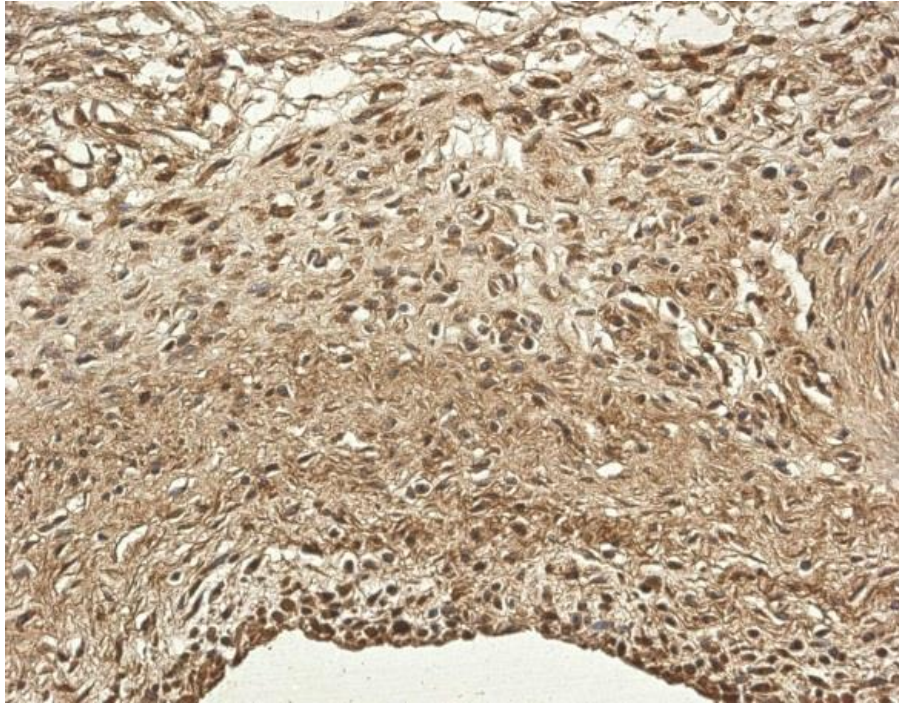
koncentrācijā visu pētījumā izmantoto biomateriālu gadījumos ļoti augstu TNF- α un Il-10 ekspresiju pārsvarā novēroja saistaudu kapsulā ap biomateriālu, savukārt β defensīna-2 ekspresija bija salīdzinoši zemā līmenī.

Paraugos pēc 4 nedēļu ekspozīcijas, izmantojot abas baktēriju koncentrācijas (10^2 KVV/ml un 10^3 KVV/ml), novēroja vidēju TNF- α ekspresiju audos ap visiem pētījumā izmantotajiem biomateriālu paraugiem. Il-10 ekspresija visos paraugos abās koncentrācijās bija ļoti augsta gan makrofāgos, gan fibroblastos. B defensīna-2 ekspresija makrofāgos un fibroblastos bija maz izteikta – novēroja retas pozitīvas šūnas.

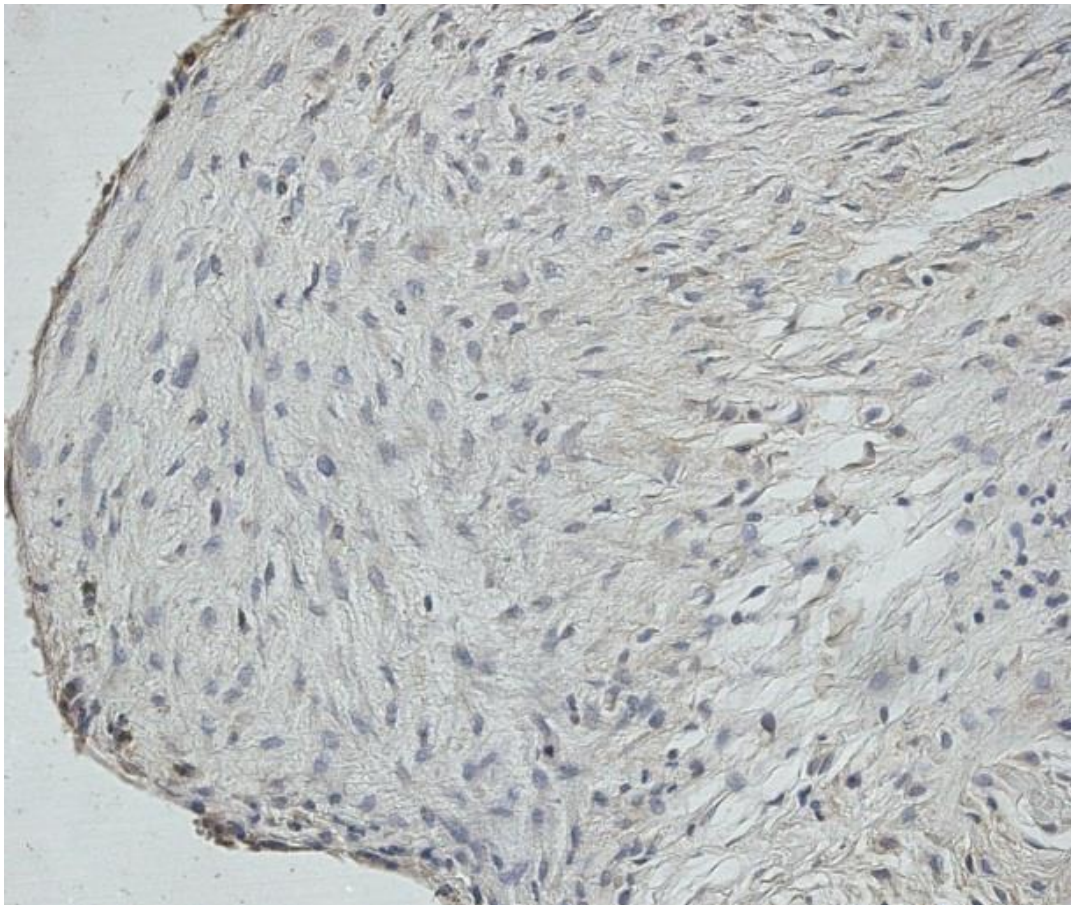
Gan TNF- α , gan Il-10 ekspresija pēc 3 mēnešu ekspozīcijas truša organismā ievērojami samazinājās, kas liecina par iekaisuma procesa samazināšanos un to, ka šajā gadījumā nenotika hroniska iekaisuma procesa veidošanās. B defensīna-2 ekspresija makrofāgos un fibroblastos bija ļoti maz izteikta – novēroja retas pozitīvas šūnas.



4.17. attēls. TNF- α ekspresija audos 2 nedēļas pēc ar *S. epidermidis* (10^2 KVV/ml) kontaminēta stikla keramikas parauga A implantācijas, palielinājums 200 \times



4.18. attēls. **IL-10** ekspresija audos 2 nedēļas pēc ar *S. epidermidis* (10^2 KVV/ml) kontaminēta stikla keramikas parauga A implantācijas, palielinājums 200×



4.19. attēls. **B defensīna-2** ekspresija audos 2 nedēļas pēc ar *S. epidermidis* (10^2 KVV/ml) kontaminēta stikla keramikas parauga A implantācijas, palielinājums 250×

Puskvantitatīvie iekaisuma citokīnu un antimikrobo peptīdu ekspresijas rezultāti* audos ap ar *S. epidermidis* kontaminētiem stikla keramikas biomateriālu paraugiem A, B, B+

Implantācijas laiks	Paraugs	10 ² KVV/ml	10 ³ KVV/ml
TNF-α			
2 nedēļas	A	++	+ (kapsulā + + + +)
	B	+++ (izteikta ekspresija kapsulā)	+ (kapsulā + + + +)
	B+	++++ (izteikta ekspresija kapsulā)	+ (kapsulā + + +)
4 nedēļas	A	++	++
	B	++	+ (kapsulā + + +)
	B+	++ (kapsulā + + + +)	++
3 mēneši	A	+	+
	B	+	+
	B+	±	+
IL-10			
2 nedēļas	A	++++	++
	B	++++	++++
	B+	++++	++++
4 nedēļas	A	+++	++++
	B	+++	++++
	B+	+++	++++
3 mēneši	A	+	+
	B	+	+
	B+	+	++
B defensīns-2			
2 nedēļas	A	+	++
	B	++	±
	B+	++	±
4 nedēļas	A	±	±
	B	+	±
	B+	+	+
3 mēneši	A	±	+
	B	+	+
	B+	+	+

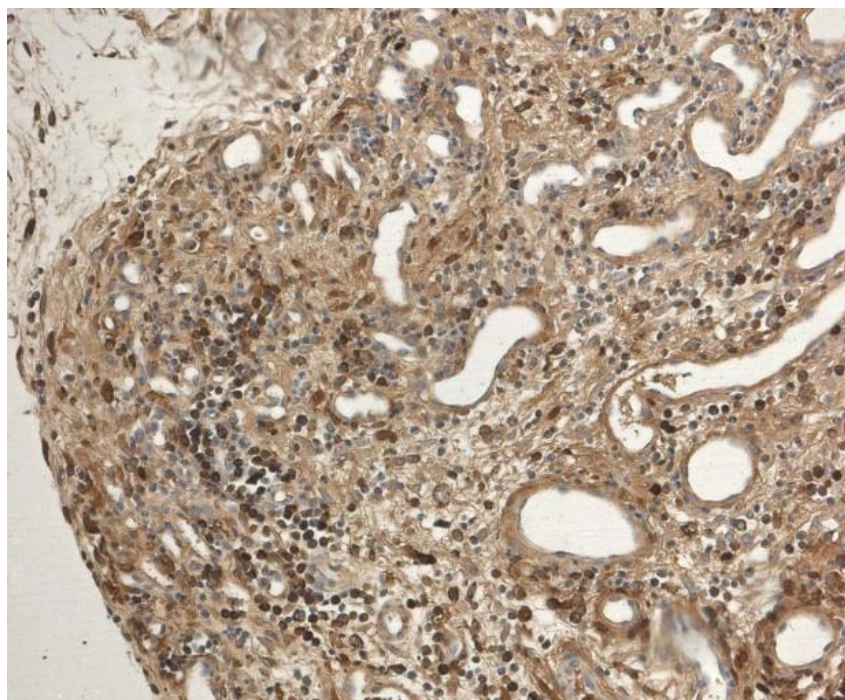
* Citokīnu ekspresija izteikta "četrkrustu" sistēmā, kur atrade apzīmēta šādi: "--" – negatīva, "±" – ļoti vāji pozitīva "+" – vāji pozitīva, "+ +" – vidēji pozitīva, "+ + +" – izteikti pozitīva, "+ + + +" – ļoti izteikti pozitīva.

4.1.5.3. Citokīnu ekspresija audos ap ar *P. aeruginosa* kontaminētiem stikla keramikas paraugiem

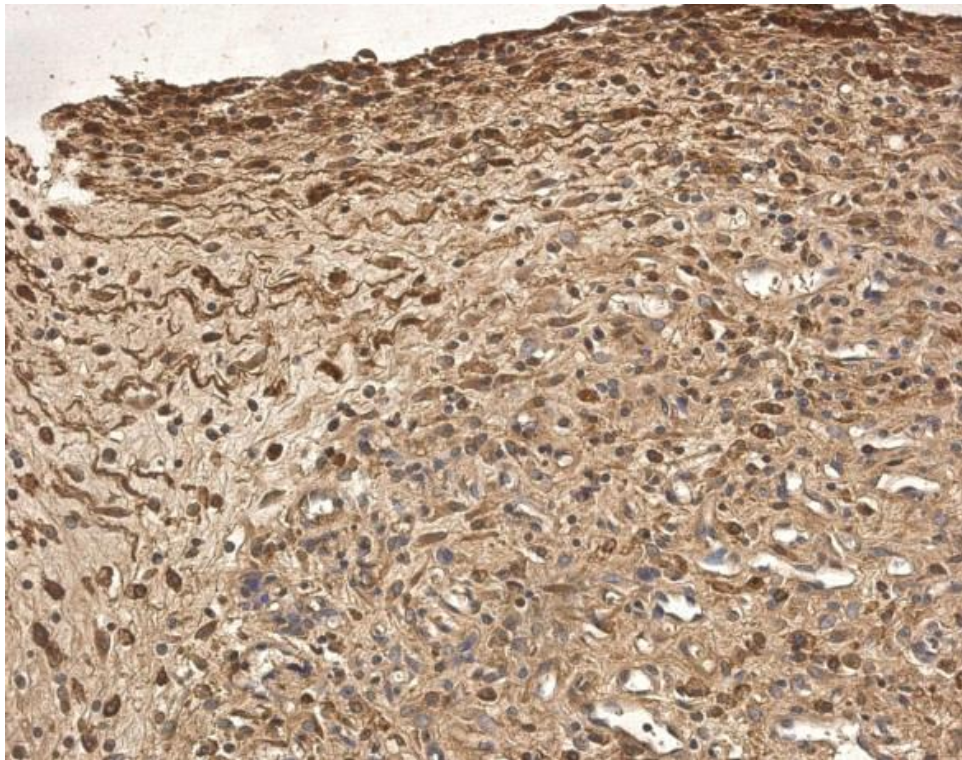
Audu paraugos ap A biomateriālu (4.20., 4.21., 4.22. attēls un 4.8. tabula), kontaminētu baktēriju 10^2 KVV/ml koncentrācijā, pēc 2 nedēļām novēroja vidēji izteiktu TNF- α , augstu Il-10 un vāji izteiktu β defensīna-2 ekspresiju makrofāgos un fibroblastos, bet audos ap B un B+ biomateriāliem novēroja augstu TNF- α un Il-10 ekspresiju, savukārt β defensīna-2 ekspresija bija vāji izteikta. Audos ap visiem biomateriālu paraugiem, kuri bija kontaminēti 10^3 KVV/ml koncentrācijā, novēroja augstu TNF- α , ļoti izteiktu Il-10 un zemu β defensīna-2 ekspresiju.

Audos pēc 4 nedēļu ekspozīcijas visos paraugos novēroja ļoti augstu TNF- α , kas novērojams kapsulā ap biomateriālu, ļoti augstu Il-10 un zemu β defensīna-2 ekspresiju.

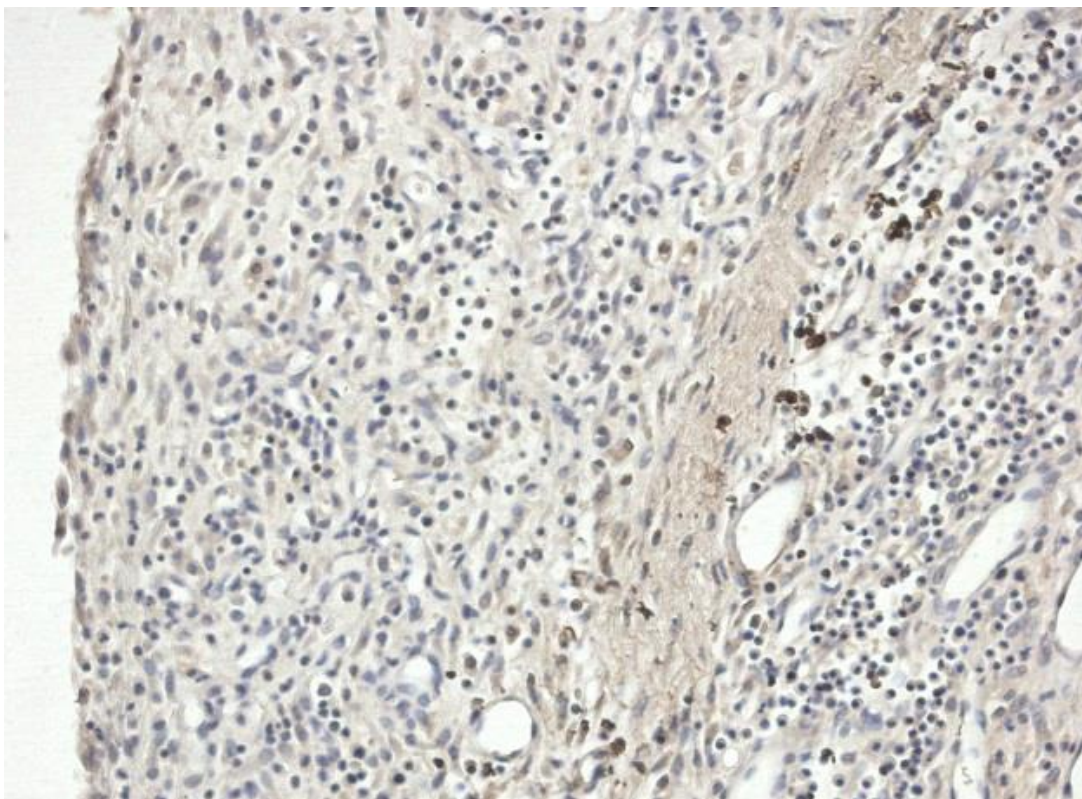
Savukārt pēc 3 mēnešu ekspozīcijas tika noteikts, ka TNF- α ekspresija bija ievērojami kritusies, un novēroja tikai atsevišķas pozitīvas struktūras. β defensīna-2 ekspresija joprojām bija zema. Citokīna Il-10 gadījumā ekspresija bija samazinājusies tikai audos ap B veida biomateriālu, bet ap A un B+ novēroja vidējas intensitātes ekspresiju.



4.20. attēls. TNF- α ekspresija audos 2 nedēļas pēc ar *P. aeruginosa* (10^2 KVV/ml) kontaminēta stikla keramikas parauga A implantācijas, palielinājums $200\times$



4.21. attēls. II-10 ekspresija audos 2 nedēļas pēc ar *P. aeruginosa* (10^2 KVV/ml) kontaminēta stikla keramikas parauga A implantācijas, palielinājums $250\times$



4.22. attēls. B defensīns-2 ekspresija audos 2 nedēļas pēc ar *P. aeruginosa* (10^2 KVV/ml) kontaminēta stikla keramikas parauga A implantācijas, palielinājums $200\times$

Puskvantitatīvie iekaisuma citokīnu un antimikrobo peptīdu ekspresijas rezultāti* audos ap ar *P. aeruginosa* kontaminētiem stikla keramikas biomateriālu paraugiem A, B, B+

Implantācijas laiks	Paraugs	10 ² KVV/ml	10 ³ KVV/ml
TNF-α			
2 nedēļas	A	++	+++
	B	+++	+++
	B+	+++	+++
4 nedēļas	A	++++	++++
	B	++++	++++
	B+	++++	++++
3 mēneši	A	+	+
	B	+	+
	B+	+	+
IL-10			
2 nedēļas	A	++++	++++
	B	++++	++++
	B+	++++	++++
4 nedēļas	A	++++	++++
	B	++++	++++
	B+	++++	++++
3 mēneši	A	++	++
	B	+	+
	B+	++	++
B defensīns-2			
2 nedēļas	A	±	+
	B	+	+
	B+	+	+
4 nedēļas	A	±	±
	B	±	±
	B+	+	±
3 mēneši	A	+	+
	B	+	+
	B+	+	+

* Citokīnu ekspresija izteikta “četrus krustu” sistēmā, kur atrade apzīmēta šādi: “-“ – negatīva, “±” – ļoti vāji pozitīva “+” – vāji pozitīva, “++” – vidēji pozitīva, “+++” – izteikti pozitīva, “++++” – ļoti izteikti pozitīva.

4.2. Baktēriju adhēzijas un kolonizācijas izvērtēšana uz TiO₂/HAp kompozītmateriāliem

Lai varētu izvērtēt gan ķīmiskā sastāva, gan pagatavošanas tehnoloģijas (apdedzināšanas temperatūras) ietekmi uz baktēriju spēju piesaistīties un kolonizēt šos biomateriālus, veicām *in vitro* *S. epidermidis* un *P. aeruginosa* adhēzijas un kolonizācijas noteikšanu uz titāna dioksīda un hidroksiapatīta kompozītmateriālu (TiO₂/HAp) virsmas.

4.2.1. Izmantotie paraugi

Pētījumā izmantotajā biomateriālu partijā kompozītmateriālus apzīmējām ar numerāciju no 1 līdz 10, galvenās to atšķirības balstījās uz HAp un TiO₂ proporciju un apdedzināšanas temperatūru (1000 °C vai 1200 °C).

Izmantotie paraugi:

1. 100% HAp – apdedzināts 1000 °C
2. 50% HAp un 50% TiO₂ – apdedzināts 1000 °C
3. 80% HAp un 20% TiO₂ – apdedzināts 1000 °C
4. 100% TiO₂ – apdedzināts 1000 °C
5. 20% HAp un 80% TiO₂ – apdedzināts 1000 °C
6. 100% TiO₂ – apdedzināts 1200 °C
7. 20% HAp un 80% TiO₂ – apdedzināts 1200 °C
8. 80% HAp un 20% TiO₂ – apdedzināts 1200 °C
9. 50% HAp un 50% TiO₂ – apdedzināts 1200 °C
10. 100% HAp – apdedzināts 1200 °C

4.2.2. *S. epidermidis in vitro* adhēzijas izvērtējums uz TiO₂/HAp kompozītmateriālu virsmas

Kopumā adhēzijas intensitāte uz HAp un TiO₂ kompozītmateriālu virsmas nav liela. No biomateriāliem, kuru apdedzināšanas temperatūra bija 1000 °C, *S. epidermidis* adhēzija sākas 10 KVV/ml / 2h / 37 °C ekspozīcijā tikai uz:

- 2. biomateriāla, kur HAp un TiO₂ bija vienādās proporcijās, adhēzijas intensitāte $0,0027 \pm SD 0,0008$ KVV/mm²;
- 3. biomateriāla, kas saturēja lielāku HAp daļu (80%), adhēzijas intensitāte $0,003 \pm SD 0,0008$ KVV/mm²;
- 4. biomateriāla, kas saturēja tīru TiO₂, adhēzijas intensitāte $0,003 \pm SD 0,001$ KVV/mm².

Uz biomateriāliem, kuri pagatavošanā tika apdedzināti 1200 °C, adhēzija 10 KVV/ml/ 2h / 37 °C ekspozīcijā nenotiek vispār.

10² KVV/ml / 2h / 37 °C ekspozīcijā lielāka adhēzija novērojama uz:

- 3. biomateriāla ar adhēzijas intensitāti $0,009 \pm SD 0,0008$ KVV/mm²;
- 4. biomateriāla ar adhēzijas intensitāti $0,009 \pm SD 0,0008$ KVV/mm².

Mazāka adhēzija bija uz biomateriāliem, kuri tika apdedzināti 1200 °C:

- 6. biomateriālam (100% TiO₂), adhēzijas intensitāte $0,018 \pm SD 0,0008$ KVV/mm²;

- 7. biomateriālam, kas saturēja mazāku Hap un lielāku TiO₂ daudzumu, adhēzijas intensitāte $0,07 \pm SD 0,008$ KVV/mm²;
- 8. biomateriālam (prevalēja HAp), adhēzijas intensitāte $0,13 \pm SD 0,008$ KVV/mm².
10³ KVV/ml / 2h / 37 °C ekspozīcijā vislielāko adhēzijas intensitāti novēro uz:
 - 3. biomateriāla (apdedzināšanas temperatūra 1000 °C) virsmas, adhēzijas intensitāte $0,093 \pm SD 0,01$ KVV/mm²;
 - 10. biomateriāla (apdedzināšanas temperatūra 1200 °C un sastāv no 100% Hap) virsmas, adhēzijas intensitāte $0,009 \pm SD 0,01$ KVV/mm² (4.9. tabula, 4.23. attēls).

4.2.3. *P. aeruginosa* in vitro adhēzijas izvērtējums uz TiO₂/HAp kompozītmateriālu virsmas

P. aeruginosa adhēzijas intensitāte uz TiO₂/HAp biomateriālu virsmas kopumā bija zemāka nekā *S. epidermidis* un 10 KVV/ml/2h/37°C ekspozīcijā notika tikai uz 1. biomateriāla, kas bija HAp biomateriāls, iegūts 1000 °C apdedzināšanas temperatūrā, virsmas ar adhēzijas intensitāti $0,003 \pm SD 0,007$ KVV/mm² un uz 4. biomateriāla (apdedzināšanas temperatūra 1000 °C, sastāv no TiO₂) virsmas ar adhēzijas intensitāti $0,001 \pm SD 0,00001$ KVV/mm². Adhēziju nenovēroja ne uz viena biomateriāla, kuram apdedzināšanas temperatūra bija 1200 °C.

Arī 10² KVV/ml/2h/37°C ekspozīcijā bija zems adhēzijas līmenis un no 1000 °C temperatūrā apdedzinātajiem biomateriāliem adhēzija tika novērota uz 1. biomateriāla virsmas ar adhēzijas intensitāti $0,08 \pm SD 0,0009$ KVV/mm², uz 2. biomateriāla virsmas ar adhēzijas intensitāti $0,009 \pm SD 0,008$ KVV/mm², uz 4. biomateriāla virsmas ar adhēzijas intensitāti $0,0013 \pm SD 0,0008$ KVV/mm². No biomateriāliem, kuri tika apdedzināti 1200 °C temperatūrā, adhēziju novēroja tikai uz 8. biomateriāla virsmas ar adhēzijas intensitāti $0,0016 \pm SD 0,0008$ KVV/mm².

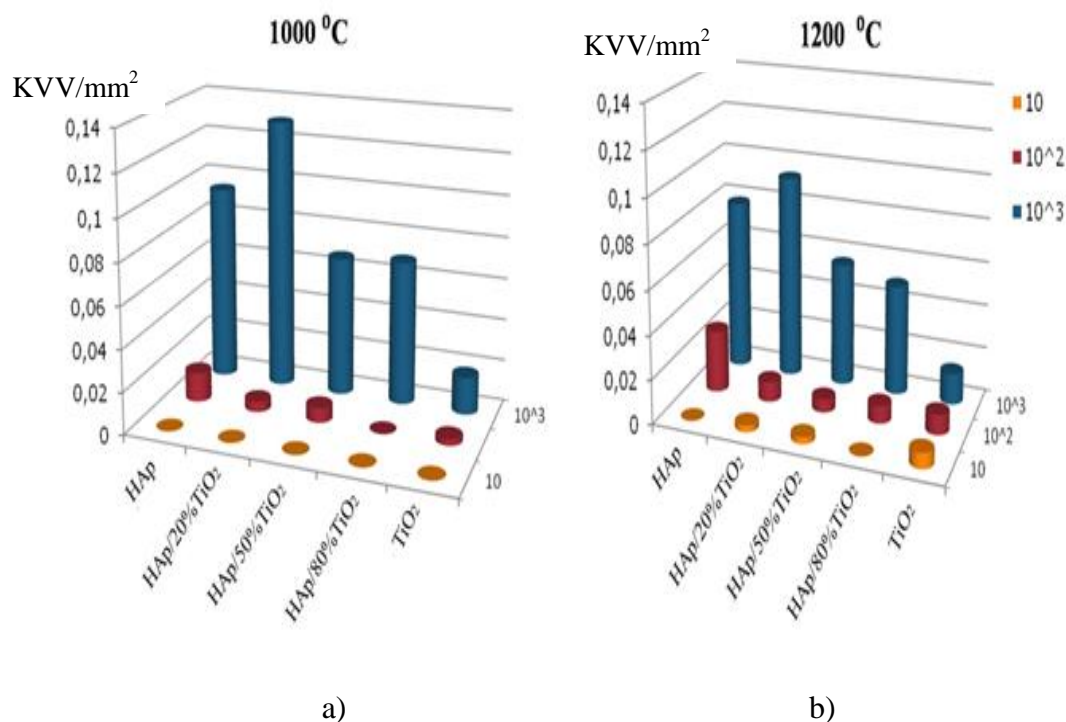
10³ KVV/ml/2h/37°C ekspozīcijā viszemāko adhēzijas intensitāti uzrādīja 3. biomateriāls ar adhēzijas intensitāti $0,0055 \pm SD 0,008$ KVV/mm², 6. biomateriāls ar adhēzijas intensitāti $0,05 \pm SD 0,008$ KVV/mm², 9. biomateriāls ar adhēzijas intensitāti $0,0042 \pm SD 0,0017$ KVV/mm² un 10. biomateriāls ar adhēzijas intensitāti $0,0056 \pm SD 0,001$ KVV/mm², bet vislielāko adhēziju uzrādīja 1. biomateriāla virsma ar adhēzijas intensitāti $0,34 \pm SD 0,09$ KVV/mm² (4.9. tabula, 4.24. attēls).

Kopumā var secināt, ka mūsu pētījumi parādīja TiO₂/HAp kompozītmateriālu zemo spēju piesaistīt eksperimentā izmantotās baktērijas, kā arī pagatavošanas tehnoloģijas nozīmi minēto biomateriālu gadījumā, proti, biomateriāli, kuri tika apdedzināti 1200 °C, mazāk piesaista *P. aeruginosa*.

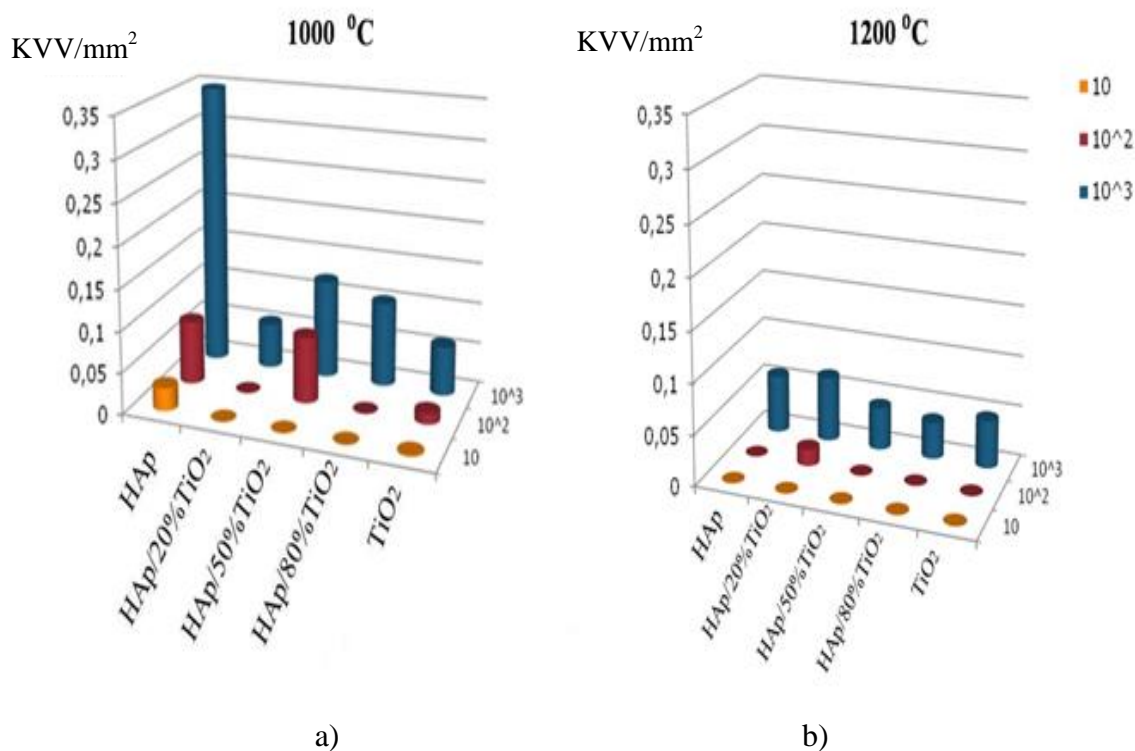
***S. epidermidis* un *P. aeruginosa* adhēzijas intensitāte uz TiO₂/HAp kompozītmateriālu virsmas KVV/mm² pēc 2 h ekspozīcijas 37 °C (p < 0,05)**

Parsugs	Adhēzijas intensitāte, KVV/mm ²					
	<i>S. epidermidis</i>			<i>P. aeruginosa</i>		
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ¹	10 ²	10 ³
1.	nenovēro*	0,03 ± 0,0008	0,08 ± 0,017	0,003 ± 0,007	0,08 ± 0,0009	0,34 ± 0,09
2.	0,0027 ± 0,0008	0,006 ± 0,0008	0,06 ± 0,011	nenovēro	0,009 ± 0,008	0,12 ± 0,014
3.	0,003 ± 0,0008	0,009 ± 0,0008	0,093 ± 0,01	nenovēro	nenovēro	0,0055 ± 0,008
4.	0,003 ± 0,001	0,009 ± 0,0008	0,14 ± 0,0008	0,001 ± 0,00001	0,0013 ± 0,0008	0,06 ± 0,016
5.	nenovēro	0,008 ± 0,0008	0,07 ± 0,008	nenovēro	nenovēro	0,103 ± 0,001
6.	nenovēro	0,002 ± 0,0008	0,018 ± 0,0008	nenovēro	nenovēro	0,05 ± 0,008
7.	nenovēro	0,003 ± 0,001	0,07 ± 0,008	nenovēro	nenovēro	0,036 ± 0,001
8.	nenovēro	0,005 ± 0,001	0,13 ± 0,008	nenovēro	0,0016 ± 0,0008	0,064 ± 0,0008
9.	nenovēro	0,004 ± 0,0008	0,07 ± 0,008	nenovēro	nenovēro	0,0042 ± 0,0017
10.	nenovēro	0,014 ± 0,0008	0,09 ± 0,01	nenovēro	nenovēro	0,0056 ± 0,001

* Adhēziju nenovēro.



4.23. attēls. *S. epidermidis* adhēzijas intensitāte uz paraugu virsmām, kas iegūti, termiski apstrādājot: a) 1000 °C un b) 1200 °C temperatūrā (p < 0,05)



4.24. attēls. *P. aeruginosa* adhēzijas intensitāte uz paraugu virsmām, kas iegūti, termiski apstrādājot:

a) 1000 °C un b) 1200 °C temperatūrā ($p < 0,05$)

4.2.4. *In vitro S. epidermidis* un *P. aeruginosa* kolonizācijas izvērtējums uz TiO₂/HAp kompozītmateriālu virsmas

Baktēriju kolonizācijas intensitāte uz pētījumā izmantotajiem kompozītmateriāliem ir ļoti dažāda. Ļoti maza kolonizācijas intensitāte tika novērota uz HAp materiāla, kas apdedzināts 1000 °C temperatūrā, bet ļoti liela – uz HAp materiāla, kas apdedzināts 1200 °C. Dažāda kolonizācijas intensitāte bija uz materiāliem ar dažādu HAp un TiO₂ sastāvu un pagatavošanas tehnoloģiju.

Uz 1. biomateriāla, kurš saturēja 100% HAp un bija apdedzināts 1000 °C, *S. epidermidis* un *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte būtiski atšķīrās. *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte bija $1,6 \pm \text{SD } 0,1$ KVV/mm², savukārt *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte bija $627 \pm 2,44$ KVV/mm². *S. epidermidis* maksimālā intensitāte sasniedza 1,7 KVV/mm² un minimālā intensitāte bija 1,4 KVV/mm². *P. aeruginosa* maksimālā intensitāte bija 630 KVV/mm² un minimālā kolonizācijas intensitāte bija 624 KVV/mm².

Līdz ar to mūsu pētījumā tika pierādīts, ka, lai gan uz TiO₂/HAp kompozītmateriālu virsmas stafilokoki piesaistās nedaudz labāk nekā *P. aeruginosa*, tomēr kopumā biomateriāla

virsmā nav labvēlīga ne stafilokoku, ne pseidomonu kolonizācijai, kas ļautu 1. biomateriālu uzskatīt par “mikrobioloģiski drošāku” praktiskam pielietojumam medicīnā.

Pētot 2. biomateriālu, kura sastāvā ietilpa 50% HAp un 50% TiO₂ un kurš bija apdedzināts 1000 °C, atklājām, ka *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte bija 2168 ± SD 21,1 KVV/mm², maksimālā – 2198 KVV/mm² un minimālā – 2148 KVV/mm². Savukārt uz 2. biomateriāla *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte bija mazāka nekā *S. epidermidis* – 487 ± SD 16,3 KVV/mm², maksimālā – 507 KVV/mm² un minimālā – 467 KVV/mm².

Zemākā *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte bija novērojama uz 3. biomateriāla, kas sastāvēja no 80% HAp un 20% TiO₂ un bija apdedzināts 1000 °C, tā bija 61 ± SD 2,94 KVV/mm². Maksimālā kolonizācijas intensitāte uz šī biomateriāla virsmas bija 65 KVV/mm², bet minimālā – 58 KVV/mm². Tikmēr *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte bija ievērojami augstāka – 10109 ± SD 14,14 KVV/mm², maksimālā – 10129 KVV/mm² un minimālā – 10099 KVV/mm².

Uz 4. biomateriāla, kas saturēja 100% TiO₂ un bija apdedzināts 1000 °C, *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte bija 13223 ± SD 23 KVV/mm², maksimālā – 13252 KVV/mm² un minimālā – 13196 KVV/mm². Savukārt uz 4. biomateriāla saglabājas zema *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte – 356 ± SD 2,7 KVV/mm², maksimālā bija 364 KVV/mm² un minimālā – 258 KVV/mm².

Vidējā kolonizācijas intensitāte uz 5. biomateriāla, kura sastāvā pārsvarā bija TiO₂ un kurš bija apdedzināts 1000 °C, ar *S. epidermidis* bija 13607 ± SD 6,4 KVV/mm², maksimālā – 13613 KVV/mm² un minimālā – 13598 KVV/mm². *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte uz 5. biomateriāla ir zema – 270 ± SD 4,96 KVV/mm², maksimālā bija 275 KVV/mm² un minimālā – 264 KVV/mm².

Uz 6. biomateriāla (100% TiO₂ – apdedzināts 1200 °C) *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte bija 3591 ± SD 18,2 KVV/mm², maksimālā – 3611 KVV/mm² un minimālā – 3571 KVV/mm², bet *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte bija 1044 ± SD 9,27 KVV/mm², maksimālā – 1052 KVV/mm² un minimālā – 1031 KVV/mm².

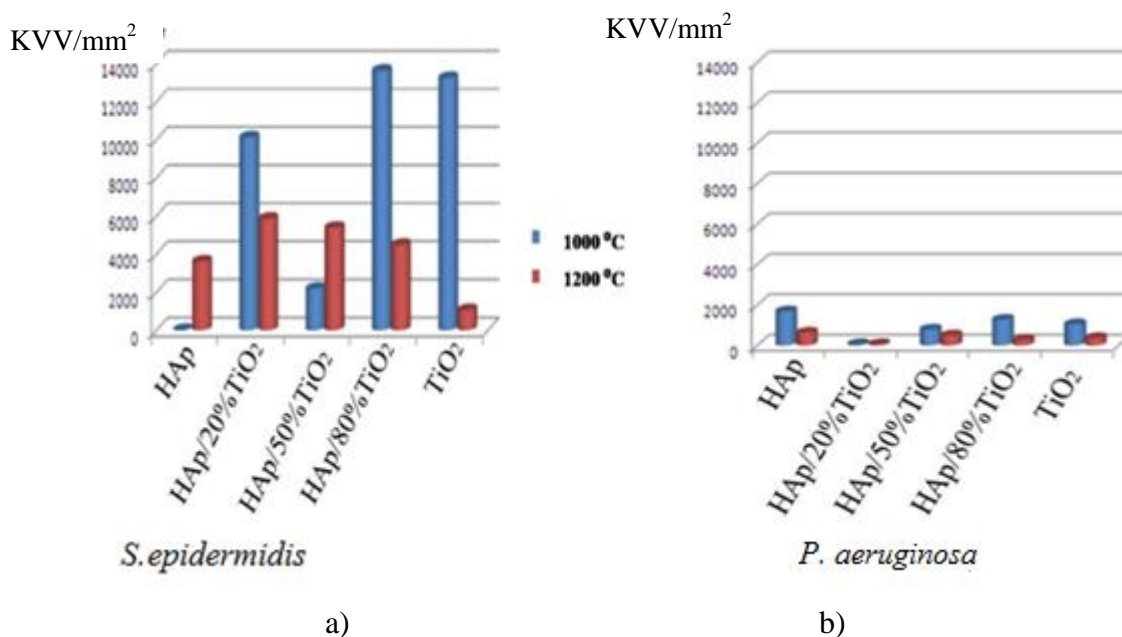
Augstākā *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte tiek novērota uz 7. biomateriāla (20% HAp un 80% TiO₂ – apdedzināts 1200 °C) – vidēji 1266 ± SD 7,4 KVV/mm², maksimālā kolonizācijas intensitāte bija 1276 KVV/mm² un minimālā – 1258 KVV/mm². Uz šī biomateriāla *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte bija 4459 ± SD 18,1 KVV/mm², maksimālā – 4480 KVV/mm² un minimālā – 4436 KVV/mm².

Uz 8. biomateriāla, kas pārsvarā sastāvēja no HAp un bija apdedzināts 1200 °C, *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte bija 5839 ± SD 9,7 KVV/mm², maksimālā

intensitāte bija 5847 KVV/mm² un minimālā – 5826 KVV/mm². *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte bija 476 ± SD 8,6 KVV/mm², maksimālā – 487 KVV/mm² un minimālā – 466 KVV/mm².

Uz 9. biomateriāla, kur HAp un TiO₂ bija vienādā daudzumā un kurš bija apdedzināts 1200 °C, *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte bija 5362 ± SD 19,4 KVV/mm², maksimālā – 5383 KVV/mm² un minimālā – 5345 KVV/mm². *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte bija 780 ± SD 11,9 KVV/mm², maksimālā – 794 KVV/mm² un minimālā – 465 KVV/mm².

Augstāka *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte tika novērota uz 10. biomateriāla (100% HAp – apdedzināts 1200 °C) – 18652 ± SD 42 KVV/mm², maksimālā kolonizācijas intensitāte bija 18701 KVV/mm² un minimālā – 18598 KVV/mm². Savukārt *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte uz 10. biomateriāla arī bija visaugstākā – 1677 ± SD 2,44 KVV/mm², maksimālā kolonizācijas intensitāte bija 1680 KVV/mm² un minimālā – 1675 KVV/mm² (4.25. attēls).



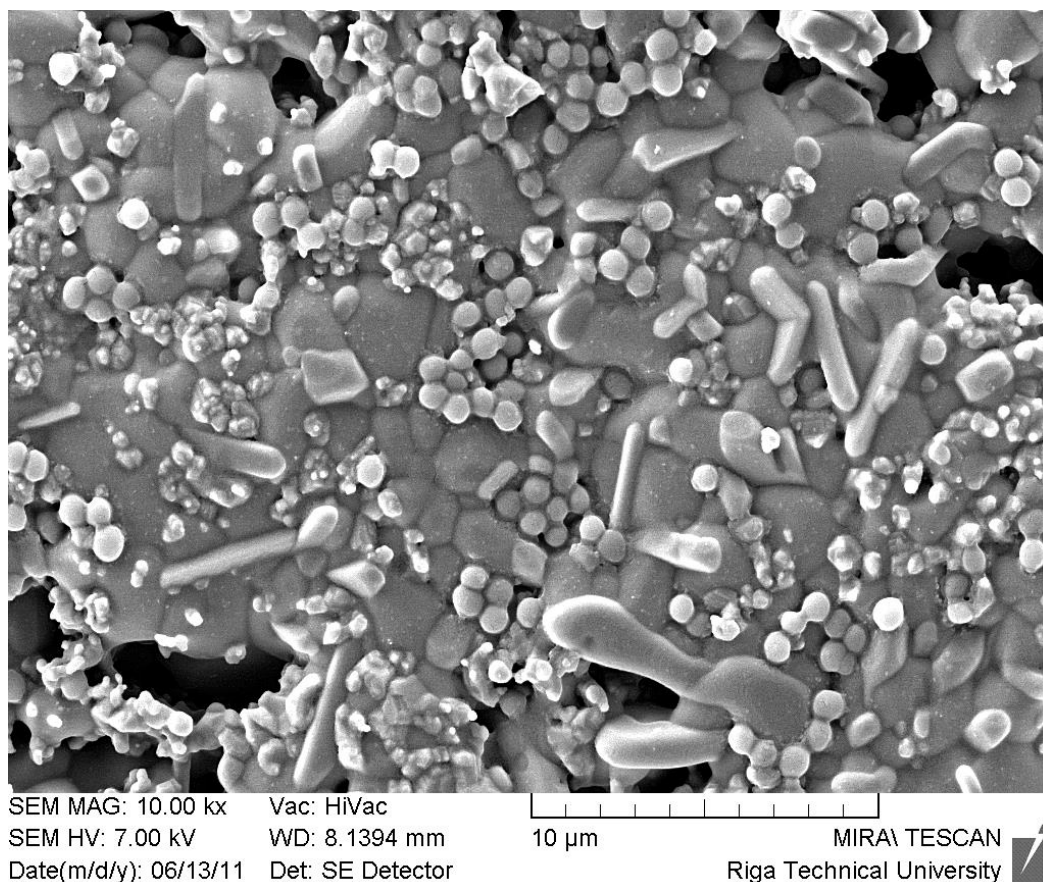
4.25. attēls. *S. epidermidis* un *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte uz TiO₂/HAp kompozītmateriālu paraugu virsmām, kuri iegūti, termiski apstrādājot: a) 1000 °C un b) 1200 °C temperatūrā (p < 0,05)

4.2.5. Hidroksiapatīta (TiO₂/HAp) kompozītmateriālu izmeklēšanas ar skenējošo elektronmikroskopiju rezultāti

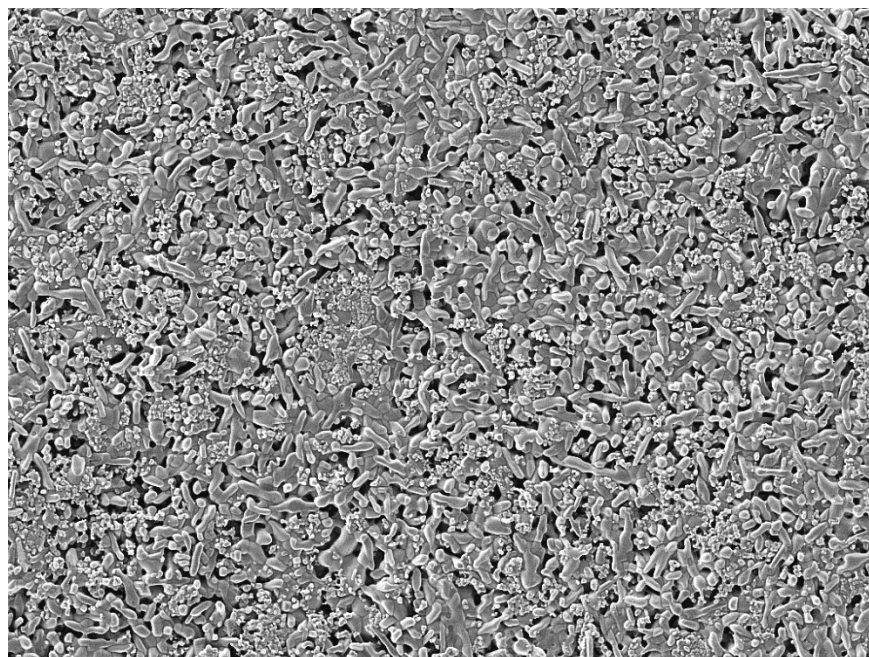
Analizējot skenējošās elektronmikroskopijas (SEM) attēlus, tika konstatēts, ka uz 1. biomateriāla virsmas gandrīz nenovēro *S. epidermidis*, bet uz pārējiem 1000 °C apdedzinātajiem kompozītmateriāliem *S. epidermidis* neveido raksturīgu biofilmu, kolonizējot

materiāla virsmu izklausus koloniju veidā (4.26., 4.28., 4.29. attēls). Novērojām minimālu glikokaliksa veidošanos, kas vairāk saturēja kopā baktēriju šūnas, nevis pārklāja koloniju, kā tas bija stikla keramikas materiālu gadījumā.

Retas *S. epidermidis* veidotās kolonijas tika novērotas uz 100% TiO₂ saturoša biomateriāla, kas bija apdedzināts 1200 °C temperatūrā (4.31. attēls). Nenovēroja tādu koloniju un biofilmu veidošanos, ko klātu glikokalikss. Līdzīgi kā *S. epidermidis*, arī *P. aeruginosa* pētījumā izmantoto kompozītmateriālu virsmā neveidoja biofilmu, bet kolonizēja to izklausus baktēriju slānīša veidā (4.27. attēls). Atsevišķos gadījumos varēja novērtēt glikokaliksu, kas veido matriksu un sasaista baktērijas kolonijā (4.30. attēls). Jāatzīmē, ka tieši kolonijas veidošanās un tās pārklāšanās ar glikokaliksu, kas padara koloniju rezistentu pret antibakteriālām vielām un arī saimniekorganisma nespecifiskās rezistences vai imūnās atbildes mehānismiem, ir nozīmīgs ar implantātiem saistīto infekciju patogēneses mehānisms.

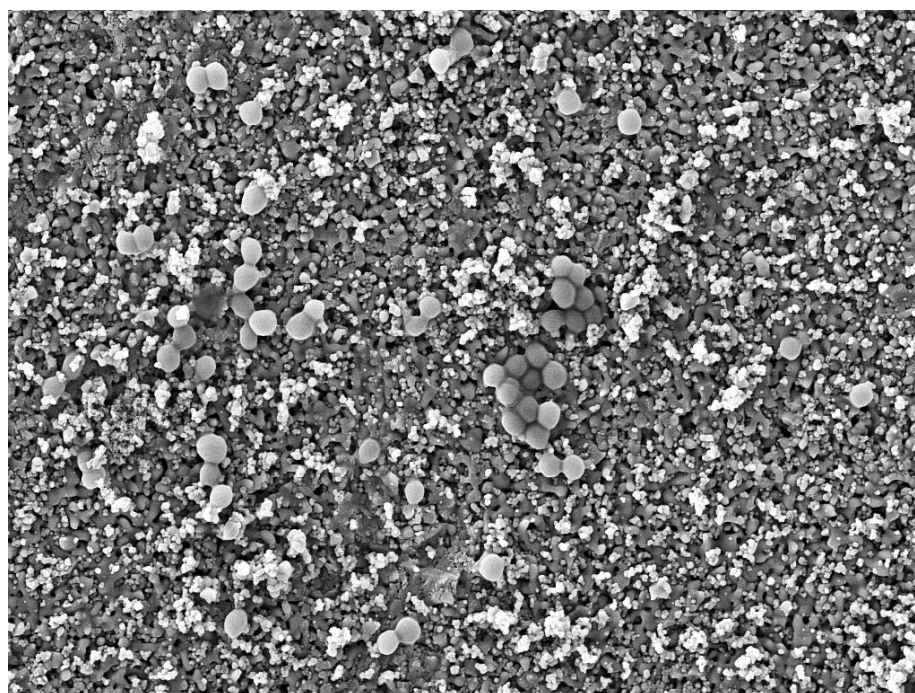


4.26. attēls. *S. epidermidis* uz 80% HAp un 20% TiO₂, apdedzināta 1200 °C, virsmas



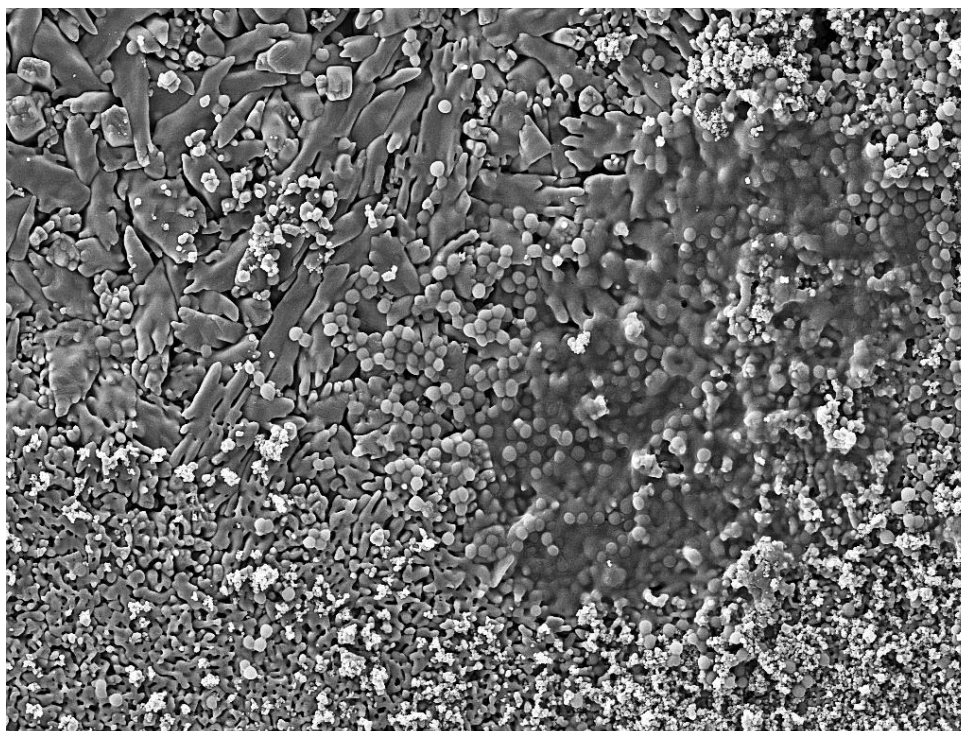
SEM MAG: 2.00 kx Vac: HiVac
SEM HV: 7.00 kV WD: 8.6177 mm 50 μ m MIRA\ TESCAN
Date(m/d/y): 06/10/11 Det: SE Detector Riga Technical University

4.27. attēls. *P. aeruginosa* uz 50% HAp un 50% TiO₂,
apdedzināta 1200 °C, virsmas



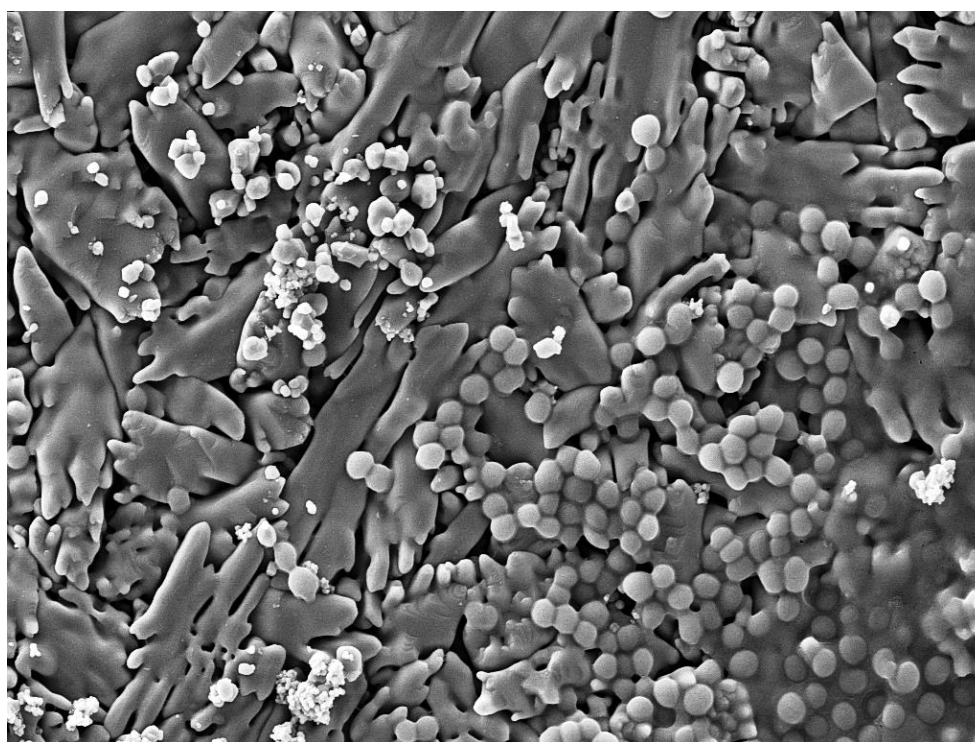
SEM MAG: 10.00 kx Vac: HiVac
SEM HV: 7.00 kV WD: 8.4057 mm 10 μ m MIRA\ TESCAN
Date(m/d/y): 06/13/11 Det: SE Detector Riga Technical University

4.28. attēls. *S. epidermidis* baktēriju kolonijas uz 100% TiO₂,
apdedzināta 1000 °C, virsmas



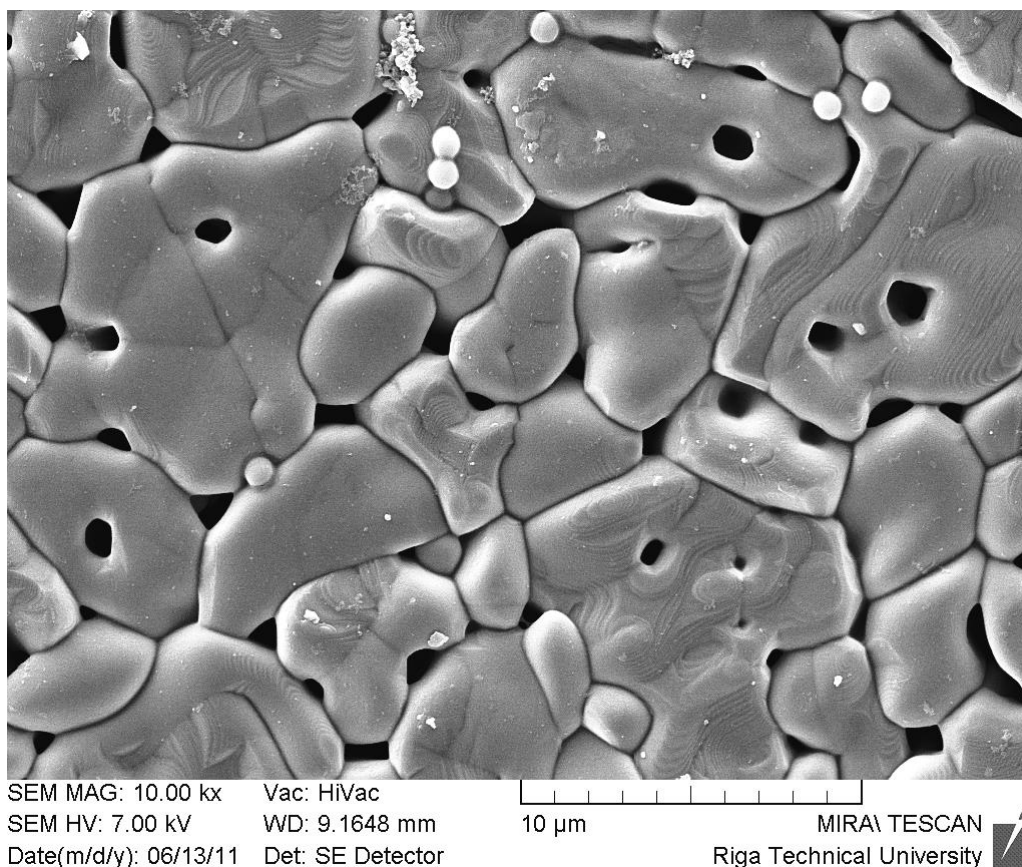
SEM MAG: 5.00 kx Vac: HiVac
SEM HV: 7.00 kV WD: 8.4057 mm 20 µm MIRA\ TESCAN
Date(m/d/y): 06/13/11 Det: SE Detector Riga Technical University

4.29. attēls. *S. epidermidis* baktēriju kolonijas uz 100% TiO₂, apdedzināta 1000 °C, virsmas



SEM MAG: 10.00 kx Vac: HiVac
SEM HV: 7.00 kV WD: 8.4057 mm 10 µm MIRA\ TESCAN
Date(m/d/y): 06/13/11 Det: SE Detector Riga Technical University

4.30. attēls. *S. epidermidis* baktēriju kolonijas uz 100% TiO₂, apdedzināta 1000 °C, virsmas



4.31. attēls. *S. epidermidis* retas baktērijas uz 100% TiO₂, apdedzināta 1200 °C, virsmas

4.3. Baktēriju adhēzijas un kolonizācijas intensitāte *in vitro* sintētisko kalcija fosfātu biomateriālu virsmā

4.3.1. Baktēriju adhēzijas intensitāte uz sintētisko kalcija fosfātu biomateriālu virsmas

Pētījumā izmantojām hidroksiapatīta un trikalcijfosfāta (HAp/TCP) biomateriālu paraugus ar šādām abu komponentu attiecībām: 100/0, 90/10, 60/40, 50/50 un 0/100. Paraugi tika iegūti, vai nu mehāniski samaisot HAp un TCP (A metode, A paraugi), vai arī mākslīgi sintezējot apatītu bez kalcija (B metode, B paraugi). Pētījuma rezultāti atspoguļoti 4.10. tabulā.

P. aeruginosa adhēzijas process sākās uz paraugiem, kuri bija inkubēti pētījumā izmantoto mikroorganismu koncentrācijā 10 KVV/ml/2h/37°C, un tikai uz viena parauga (HAp/TCP (100/0) netika novērota adhēzija. *S. epidermidis* adhēzija 10 KVV/ml/2h/37°C ekspozīcijā tika novērota tikai uz trijiem paraugiem – uz HAp/TCP (0/100), HAp/TCP (50/50) B parauga un HAp/TCP (50/50) A parauga. Savukārt pārējo paraugu virsma baktērijas nesaistīja.

10^2 KVV/ml/2h/37°C ekspozīcijā *S. epidermidis* uz HAp/TCP (100/0) virsmas adhēzija netika novērota. Bet zemākā adhēzijas intensitāte bija uz HAp/TCP (90/10) A parauga – $0,014 \pm \text{SD } 0,0005$ KVV/mm², maksimālā adhēzijas intensitāte bija $0,017$ KVV/mm² un minimālā – $0,014$ KVV/mm². Adhēzijas intensitātes amplitūda – $0,003$ KVV/mm². Uz pārējiem biomateriālu paraugiem novēroja līdzīgu adhēzijas intensitātes pakāpi.

P. aeruginosa zemākā adhēzijas intensitāte 10^2 KVV/ml/2h/37°C ekspozīcijā bija uz HAp/TCP (90/10), kas iegūts pēc A un B metodes. Adhēzijas vidējā intensitāte HAp/TCP (90/10) A paraugam bija $0,028 \pm \text{SD } 0,0002$ KVV/mm², maksimālā adhēzijas intensitāte – $0,032$ KVV/mm² un minimālā intensitāte – $0,025$ KVV /mm². Adhēzijas intensitātes amplitūda $0,007$ KVV/mm². Vidējā adhēzijas vidējā intensitāte HAp/TCP (90/10) B paraugam bija $0,028 \pm \text{SD } 0,00015$ KVV/mm², maksimālā intensitāte – $0,033$ KVV/mm² un minimālā intensitāte – $0,023$ KVV/mm². Adhēzijas intensitātes amplitūda – $0,01$ KVV/mm². Uz pārējiem izmeklējamajiem paraugiem *P. aeruginosa* adhēzijas intensitāte tika novērota vienādi augsta.

Palielinot baktēriju koncentrāciju līdz 10^3 KVV/ml, pēc 2 h / 37°C inkubēšanas augstākā *P. aeruginosa* adhēzijas intensitāte tika novērota uz HAp/TCP (0/100) biomateriāla – $1,127 \pm \text{SD } 0,005$ KVV/mm², maksimālā adhēzijas intensitāte bija $1,33$ KVV/mm² un minimālā – $1,12$ KVV/mm². Adhēzijas intensitātes amplitūda – $0,21$ KVV/mm². Zemāko adhēzijas intensitāti *P. aeruginosa* 10^3 KVV/ml/2h/37°C ekspozīcijā uzrāda uz HAp/TCP (100/0) – $0,704 \pm \text{SD } 0,002$ KVV/mm², maksimālā intensitāte bija $0,706$ KVV/mm² un minimālā – $0,703$ KVV/mm². Adhēzijas intensitātes amplitūda – $0,003$ KVV/mm².

S. epidermidis koncentrācijā 10^3 KVV/ml/2h/37°C uz visiem biomateriālu paraugiem uzrāda daudz zemāku adhēzijas intensitāti nekā *P. aeruginosa*. Zemākā *S. epidermidis* adhēzijas intensitāte bija uz HAp/TCP (100/0) – $0,028 \pm \text{SD } 0,0015$ KVV/mm², maksimālā intensitāte – $0,03$ KVV/mm² un minimālā – $0,025$ KVV/mm². Adhēzijas intensitātes amplitūda – $0,005$ KVV/mm².

Augstākā *S. epidermidis* adhēzijas intensitāte 10^3 KVV/ml/2h/37°C ekspozīcijā bija uz HAp/TCP (0/100) – $0,084 \pm \text{SD } 0,002$ KVV/mm², maksimālā intensitāte – $0,086$ KVV/mm² un minimālā – $0,082$ KVV/mm². Adhēzijas intensitātes amplitūda – $0,004$ KVV/mm².

Līdz ar to pētījuma rezultāti parādīja, ka testēšanā izmantotie Ca fosfātu saturošie biomateriālu paraugi nedaudz labāk piesaista *P. aeruginosa* nekā *S. epidermidis*. Kopumā adhēzija pie pētītajiem biomateriāliem nebija liela, bet pie materiāliem ar lielāku trikalcijsfosfāta piedevu gan *S. epidermidis*, gan *P. aeruginosa* piesaistās un to virsmu kolonizē vairāk. Savukārt pagatavošanas tehnoloģija lielu ietekmi uz adhēziju neatstāj.

***S. epidermidis* un *P. aeruginosa* adhēzijas intensitāte uz HAp un TCP saturošu biomateriālu virsmas KVV/mm² pēc ekspozīcijas 37 °C 2h (p < 0,05)**

Biomateriāls	Metode *	Adhēzijas intensitāte, KVV/mm ²					
		<i>S. epidermidis</i>			<i>P. aeruginosa</i>		
		10	10 ²	10 ³	10	10 ²	10 ³
HAp/TCP (100/0)		– **	–	0,028 ± 0,0015	–	0,042 ± 0,0015	0,704 ± 0,002
HAp/TCP (90/10)	A	–	0,014 ± 0,0005	0,042 ± 0,0016	0,014 ± 0,0006	0,028 ± 0,002	0,845 ± 0,002
HAp/TCP (60/40)	A	–	0,028 ± 0,0017	0,056 ± 0,002	0,028 ± 0,0013	0,042 ± 0,002	0,915 ± 0,005
HAp/TCP (50/50)	A	0,014 ± 0,0005	0,028 ± 0,0016	0,028 ± 0,002	0,028 ± 0,0013	0,042 ± 0,0017	1,07 ± 0,005
HAp/TCP (90/10)	B	–	0,028 ± 0,0015	0,042 ± 0,0016	0,014 ± 0,0005	0,028 ± 0,0015	0,873 ± 0,002
HAp/TCP (60/40)	B	–	0,028 ± 0,0013	0,056 ± 0,002	0,028 ± 0,0013	0,042 ± 0,0016	0,943 ± 0,005
HAp/TCP (50/50)	B	0,014 ± 0,0005	0,028 ± 0,0015	0,056 ± 0,0021	0,028 ± 0,002	0,042 ± 0,0016	1,056 ± 0,005
HAp/TCP (0/100)		0,014 ± 0,0005	0,028 ± 0,0012	0,084 ± 0,002	0,028 ± 0,0015	0,042 ± 0,0016	1,127 ± 0,005

* A metode – biomateriāls iegūts, mehāniski samaisot HAp un TCP. B metode – biomateriāls iegūts, mākslīgi sintezējot apatītu bez kalcija.

**Adhēziju nenovēro.

4.3.2. Baktēriju kolonizācijas intensitāte uz sintētisko kalcija fosfātu saturošo biomateriālu virsmas

Kolonizācijas intensitāte uz bifāziskiem biomateriāliem, kuri iegūti pēc B metodes (kalcinēšana un saķepināšana no mehāniski samaisītiem apatītiem ar Ca/P attiecību no 1,5–1,67), ir nedaudz augstāka nekā uz biomateriāliem, kas iegūti pēc A metodes (kalcija deficīta apatītu kalcinēšana un sinterēšana – saķepināšana). *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte uz tiem pašiem biomateriālu paraugiem ir augstāka nekā *S. epidermidis*.

Pēc A un B metodes iegūtajiem paraugiem zemākā *S. epidermidis* kolonizācijas intensitāte bija uz HAp/TCP (90/10, A metode) – $26 \pm \text{SD } 2,8$ KVV/mm², maksimālā intensitāte – 28 KVV/mm² un minimālā – 22 KVV/mm². Kolonizācijas intensitātes amplitūda – 6 KVV/mm². Uz HAp/TCP (90/10, B metode) kolonizācijas intensitāte bija $30 \pm \text{SD } 2,5$ KVV/mm², maksimālā intensitāte – 28 KVV/mm² un minimālā intensitāte – 22 KVV/mm². Kolonizācijas intensitātes amplitūda – 6 KVV/mm². Abu grupu kolonizācijas intensitātes līmenis statistiski ticami neatšķiras (p > 0,05).

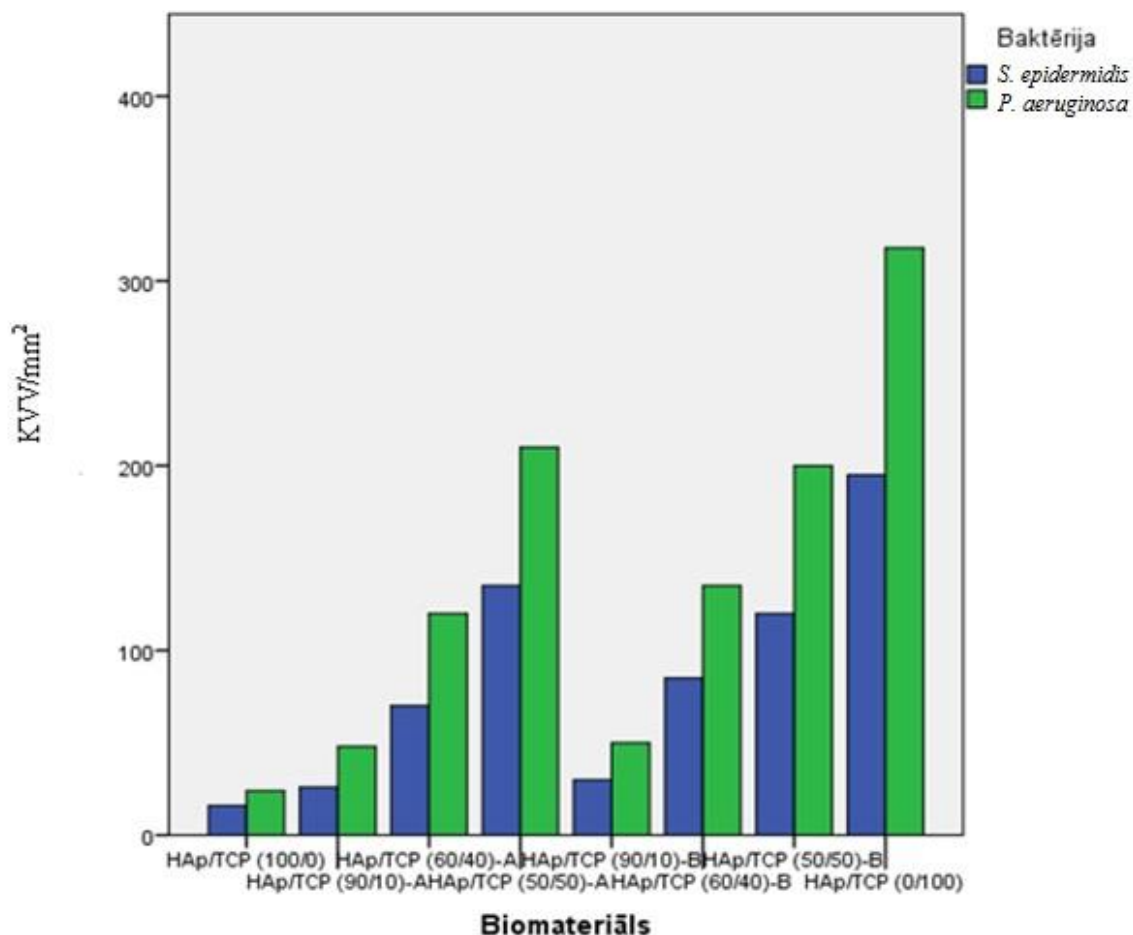
Augstākā *S. epidermidis* kolonizācijas intensitāte bija uz HAp/TCP (50/50, A metode) – $135 \pm \text{SD } 2,5$ KVV/mm², maksimālā intensitāte – 138 KVV/mm² un minimālā intensitāte –

132 KVV/mm². Kolonizācijas intensitātes amplitūda – 6 KVV/mm². Uz HAp/TCP (50/50, B metode) kolonizācijas intensitāte bija 120 ± SD 1,9 KVV/mm², maksimālā kolonizācijas intensitāte – 122 KVV/mm² un minimālā – 118 KVV/mm². Kolonizācijas intensitātes amplitūda – 4 KVV/mm². Abu grupu kolonizācijas intensitātes līmenis statistiski ticami neatšķiras ($p > 0,05$).

P. aeruginosa zemākā un augstākā kolonizācijas intensitāte bija novērojama uz tiem pašiem biomateriālu paraugiem kā *S. epidermidis* gadījumā.

Zemākā *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte bija uz HAp/TCP (90/10, A metode) – 48 ± SD 3,5 KVV/mm², maksimālā intensitāte – 53 KVV/mm² un minimālā intensitāte – 45 KVV/mm². Kolonizācijas intensitātes amplitūda – 8 KVV/mm². Uz HAp/TCP (90/10, B metode) kolonizācijas intensitāte bija 50 ± SD 2,1 KVV/mm², maksimālā intensitāte – 52 KVV/mm² un minimālā – 47 KVV/mm². Kolonizācijas intensitātes amplitūda – 5 KVV/mm². Abu grupu kolonizācijas intensitātes līmenis statistiski ticami neatšķiras ($p > 0,05$).

Augstākā *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte bija uz HAp/TCP (50/50, A metode) – 210 ± SD 2,5 KVV/mm², maksimālā intensitāte bija 213 KVV/mm² un minimālā – 207 KVV/mm². Kolonizācijas intensitātes amplitūda – 6 KVV/mm². Uz HAp/TCP (50/50, B metode) kolonizācijas intensitāte bija 200 ± SD 2,1 KVV/mm², maksimālā kolonizācijas intensitāte – 203 KVV/mm² un minimālā intensitāte – 198 KVV/mm². Kolonizācijas intensitātes amplitūda – 5 KVV/mm². Abu grupu kolonizācijas intensitātes līmenis statistiski ticami neatšķiras ($p > 0,05$) (4.32. attēls).



4.32. attēls. *S. epidermidis* un *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte uz HAp un TCP saturošu biomateriālu virsmas KVV/mm² pēc ekspozīcijas 37°C 24 h ($p > 0,05$)

4.4. Baktēriju adhēzijas un kolonizācijas intensitāte *in vitro* hidroksiapatītu un sudrabu (HAp un Ag) saturošo biomateriālu virsmā

4.4.1. Baktēriju adhēzijas intensitāte *in vitro* HAp un Ag saturošo biomateriālu virsmā

Pētījumā izmantotajiem HAp un Ag saturošajiem biomateriāliem pagatavošanas laikā, lai uzlabotu to antibakteriālās īpašības, tika pievienots sudraba nitrāts noteiktā apmērā un ar šādu atomu attiecību – $Ag/(Ag+Ca) = 0$ (HAp); 0,002 (HAp/Ag1) un 0,012 (HAp/Ag2).

No dotās biomateriālu partijas pētījām šādus biomateriālus:

1. HAp (iegūts 1000 °C);
2. HAp/Ag1 (iegūts 1000 °C);
3. HAp/Ag2 (iegūts 1000 °C);
4. HAp (iegūts 1150 °C);
5. HAp/Ag1 (iegūts 1150 °C);
6. HAp/Ag2 (iegūts 1150 °C).

S. epidermidis un *P. aeruginosa* adhēzija 10 KVV/ml/2h/37°C ekspozīcijā uz visiem biomateriālu paraugiem netika novērota.

P. aeruginosa adhēzija 10² KVV/ml/2h/37°C ekspozīcijā tika novērota tikai uz tūriem HAp biomateriāliem – bez Ag: uz 1. biomateriāla (HAp 1000 °C) adhēzijas intensitāte bija 0,0120 ± SD 0,0050 KVV/mm², maksimālā adhēzijas intensitāte – 0,0013 KVV/mm² un minimālā adhēzijas intensitāte – 0,0011 KVV/mm²; uz 4. biomateriāla (HAp 1150 °C) adhēzijas intensitāte bija 0,0100 ± SD 0,0020 KVV/mm², maksimālā intensitāte – 0,012 KVV/mm² un minimālā intensitāte – 0,009 KVV/mm².

S. epidermidis adhēzija 10² KVV/ml/2h/37°C ekspozīcijā arī tika novērota uz tūriem HAp biomateriāliem – bez Ag. Augstāka adhēzijas intensitāte no šiem paraugiem bija uz 1. biomateriāla (HAp 1000 °C) – 0,0190 ± SD 0,0050 KVV/mm², maksimālā intensitāte bija 0,022 KVV/mm² un minimālā intensitāte – 0,017 KVV/mm². Savukārt *S. epidermidis* adhēzija uz Ag saturošiem paraugiem tika novērota tikai uz paraugiem, kas apstrādāti 1000 °C, bet uz paraugiem, kas saturēja Ag un bija apstrādāti 1150 °C, adhēziju nenovēroja. Uz 2. biomateriāla (HAp/Ag1 1000 °C) adhēzijas intensitāte bija 0,0120 ± SD 0,0008 KVV/mm², maksimālā adhēzijas intensitāte – 0,0013 KVV/mm² un minimālā intensitāte – 0,0011 KVV/mm². Uz 3. biomateriāla (HAp/Ag2 1150 °C) adhēzijas intensitāte bija par pusi mazāka – 0,0060 ± SD 0,0002 KVV/mm², maksimālā intensitāte – 0,007 KVV/mm² un minimālā – 0,005 KVV/mm².

S. epidermidis adhēziju 10³ KVV/ml/2h/37°C ekspozīcijā novēroja uz visiem biomateriālu paraugiem. Vislielāko adhēzijas intensitāti novēroja uz 1. biomateriāla (HAp 1000 °C): adhēzijas intensitāte bija 0,0910 ± SD 0,0026 KVV/mm², maksimālā intensitāte – 0,094 KVV/mm² un minimālā intensitāte – 0,089 KVV/mm². Savukārt vismazāko *S. epidermidis* adhēzijas intensitāti novēroja uz 6. biomateriāla (HAp/Ag2 1150 °C): adhēzijas intensitāte bija 0,0050 ± SD 0,0002 KVV/mm², maksimālā intensitāte – 0,006 KVV/mm² un minimālā intensitāte – 0,004 KVV/mm².

Savukārt *P. aeruginosa* adhēzijas intensitāte 10³ KVV/ml/2h/37°C ekspozīcijā tika novērota tikai uz 4. biomateriāla parauga, un tā bija augstāka nekā *S. epidermidis* adhēzijas intensitāte. Adhēzija netika novērota uz 5. un 6. biomateriāla – uz HAp, kas saturēja Ag un bija apstrādāti 1150 °C. Augstākā *P. aeruginosa* adhēzijas intensitāte 10³ KVV/ml/2h/37°C ekspozīcijā notika uz 1. biomateriāla (HAp 1000 °C): adhēzijas intensitāte bija 0,3760 ± SD 0,0350 KVV/mm², maksimālā intensitāte bija 0,38 KVV/mm² un minimālā intensitāte – 0,37 KVV/mm². Zemākā *P. aeruginosa* adhēzijas intensitāte bija uz 4. biomateriāla (HAp 1150 °C): adhēzijas intensitāte bija 0,0700 ± SD 0,0050 KVV/mm², maksimālā intensitāte – 0,08 KVV/mm² un minimālā intensitāte – 0,065 KVV/mm² (4.11. tabula).

***S. epidermidis* un *P. aeruginosa* adhēzijas intensitāte uz HAp un Ag saturošu biomateriālu virsmas KVV/mm² pēc ekspozīcijas 37 °C 2 h (p > 0,05)**

Biomateriāls	Adhēzijas intensitāte, KVV/mm ²					
	<i>S. epidermidis</i>			<i>P. aeruginosa</i>		
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ¹	10 ²	10 ³
HAp 1000 °C	Nenovēro*	0,0190 ± 0,0050	0,0910 ± 0,0026	Nenovēro	0,0120 ± 0,0050	0,3760 ± 0,0350
HAp/Ag1 1000 °C	Nenovēro	0,0120 ± 0,0050	0,0480 ± 0,0016	Nenovēro	Nenovēro	0,2730 ± 0,0300
HAp/Ag2 1000 °C	Nenovēro	0,0060 ± 0,0002	0,0180 ± 0,0060	Nenovēro	Nenovēro	0,2420 ± 0,0300
HAp 1150 °C	Nenovēro	0,0050 ± 0,0002	0,0350 ± 0,0018	Nenovēro	0,0100 ± 0,0020	0,0700 ± 0,0050
HAp/Ag1 1150 °C	Nenovēro	Adhēziju nenovēro	0,0150 ± 0,0050	Nenovēro	Nenovēro	Nenovēro
HAp/Ag2 1150 °C	Nenovēro	Adhēziju nenovēro	0,0050 ± 0,0002	Nenovēro	Nenovēro	Nenovēro

* Adhēziju nenovēro.

Izmantojot neatkarīgo izlašu T testu eksperimenta rezultātu apstrādē, lai izvērtētu *S. epidermidis* adhēzijas intensitāti, tika secināts, ka HAp/Ag1 1000 °C un HAp/Ag2 1150 °C tā statistiski ticami neatšķiras (p > 0,05).

P. aeruginosa gadījumā, izmantojot neatkarīgo izlašu T testu, tika secināts, ka HAp/Ag1 1000 °C un HAp/Ag2 1150 °C biomateriāliem pseidomonu adhēzijas intensitāte statistiski ticami neatšķiras (p = 0,06).

Līdz ar to iegūtie rezultāti liek domāt, ka sinterēšanas-saķepināšanas temperatūra, kas bija izmantota biomateriālu partijas testēšanā, būtiski neietekmē adhēzijas intensitāti. Savukārt Ag kā antibakteriāla aģenta pielietošana vispār nopietni kavēja baktēriju piesaistīšanos pie pētījumā izmantotajiem paraugiem.

4.4.2. Baktēriju kolonizācijas intensitāte *in vitro* HAp un Ag saturošo biomateriālu virsmā

Pētot kolonizācijas intensitāti uz HAp un Ag saturošiem biomateriāliem, konstatējām, ka visvājāk šo biomateriālu paraugu virsma tiek kolonizēta gadījumos, kad sinterēšanas-saķepināšanas temperatūra bija 1150 °C (4.12. tabula un 4.33., 4.34., 4.36., 4.37. attēls). Arī uz Ag nesaturošo HAp biomateriālu virsmas, kuru saķepināšanas temperatūra bija 1150 °C, *S. epidermidis* kolonizācija nebija tik ievērojama kā uz HAp, kas tika saķepināti 1000 °C. *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāti uz bezsudraba HAp virsmas saķepināšanas temperatūra nebija sevišķi ietekmējusi – tā bija samērā augsta.

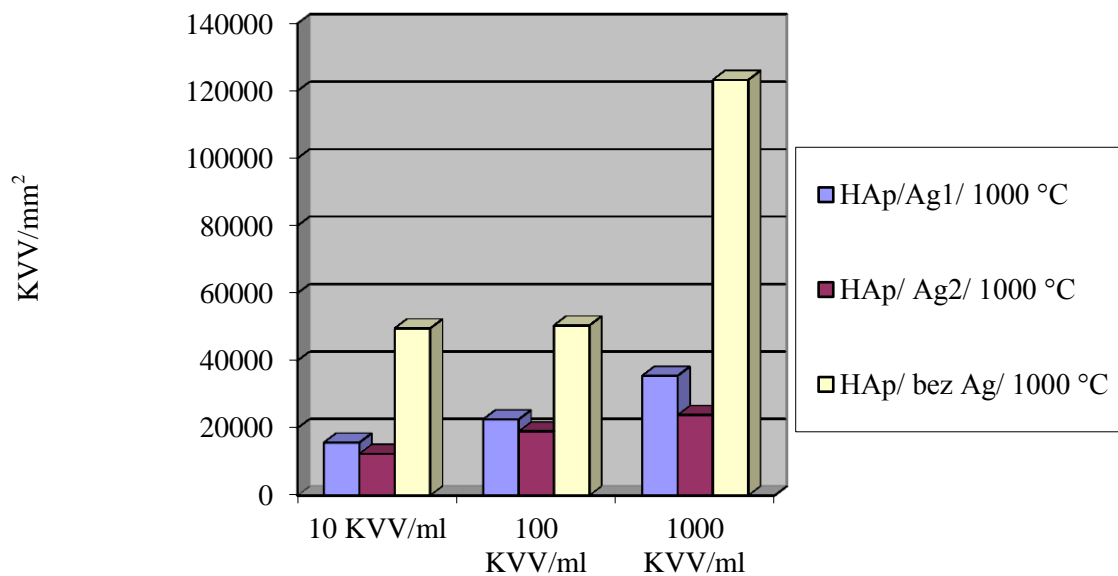
Izmantojot SEM, tika atrasts, ka *P. aeruginosa* uz 1000 °C temperatūrā saķepinātā biomateriāla aug homogēna slāņa veidā, ko neklāj glikokaliks (4.38. attēls).

Tāpat arī SEM analīzē tika novērots, ka *S. epidermidis* uz biomateriāliem, kuru sastāvā nebija Ag, veidoja blīvas kolonijas. Dažas no tās veidojošām stafilokoku šūnām bija sasaistītas ar glikokaliksa pavedieniem. Uz biomateriāliem, kuru sastāvā bija Ag, stafilokoki veidoja retas kolonijas bez glikokaliksa klātbūtnes. Izteikti retu stafilokoku kolonizāciju novēroja uz biomateriāliem, kuru saķepināšanas temperatūra pagatavošanas procesā bija 1150 °C (4.35. attēls).

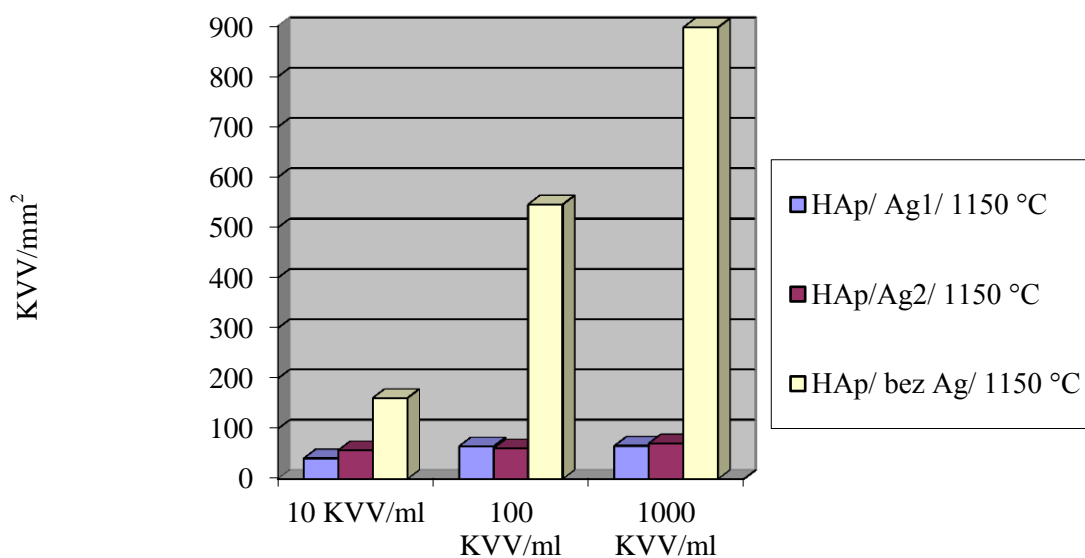
4.12. tabula

***S. epidermidis* un *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte uz HAp un Ag saturošu biomateriālu virsmas KVV/mm² pēc eksponēšanas 37 °C 24 h (p < 0,05)**

Biomateriāls	Kolonizācijas intensitāte, KVV/mm ²					
	<i>S. epidermidis</i>			<i>P. aeruginosa</i>		
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ¹	10 ²	10 ³
Hap/Ag1/ 1000 °C	15689 ± 57	22558 ± 152	35488 ± 178	19393 ± 88	24242 ± 90	38181 ± 122
Hap/Ag2/ 1000 °C	12366 ± 93	18996 ± 102	23859 ± 126	18181 ± 79	19112 ± 90	24442 ± 110
Hap/bez Ag/ 1000 °C	49562 ± 183	50424 ± 195	123232 ± 361	44776 ± 177	54726 ± 156	139303 ± 353
Hap/Ag1/ 1150 °C	41 ± 2,2	65 ± 3,1	66 ± 2,0	4975 ± 50	9340 ± 91	9600 ± 88
Hap/Ag2/ 1150 °C	57 ± 2,8	61 ± 2,9	71 ± 1,9	12 ± 0,9	14 ± 0,86	23 ± 1,0
Hap/ bez Ag/ 1150 °C	161 ± 9,3	546 ± 12	898 ± 21	30303 ± 112	36363 ± 101	49090 ± 119

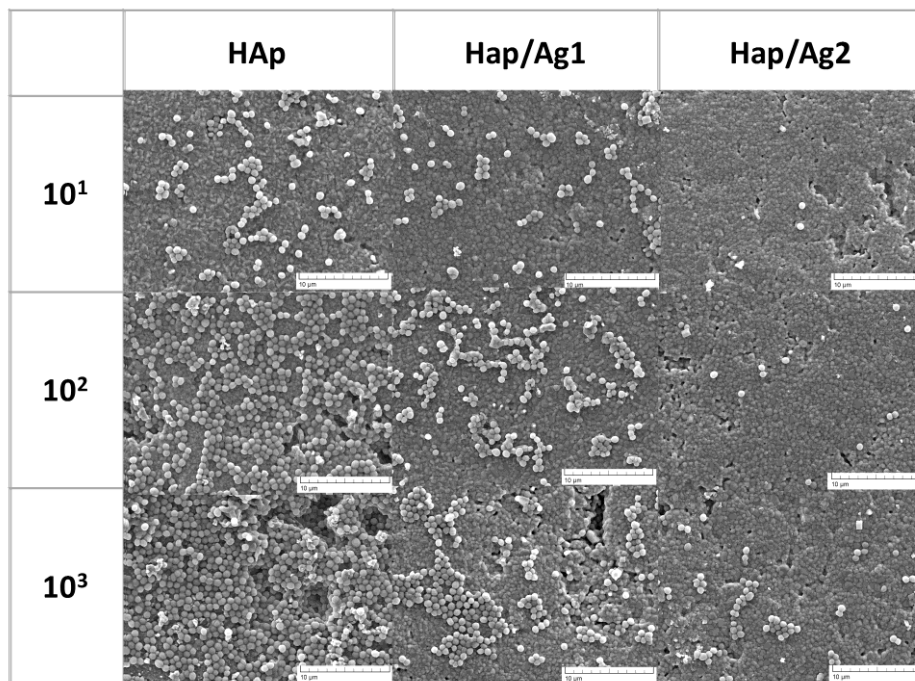


4.33. attēls. *S. epidermidis* kolonizācijas intensitāte uz HAp un Ag saturošu biomateriālu (saķepināšanas temperatūra 1000 °C) virsmas KVV/mm² pēc ekspozīcijas 37 °C 24 h (p < 0,05)

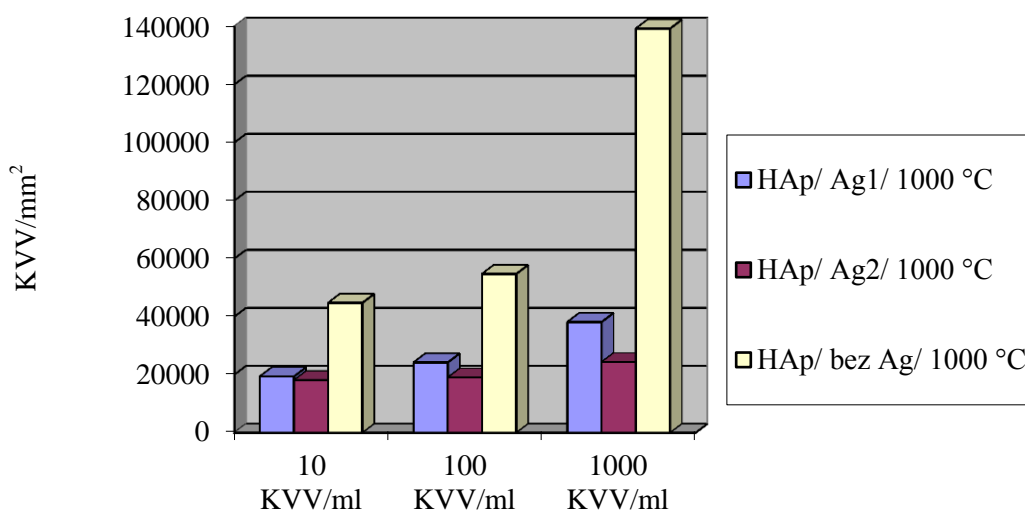


4.34. attēls. *S. epidermidis* kolonizācijas intensitāte uz HAp un Ag saturošu biomateriālu (saķepināšanas temperatūra 1150 °C) virsmas KVV/mm² pēc ekspozīcijas 37 °C 24 h (p < 0,05)

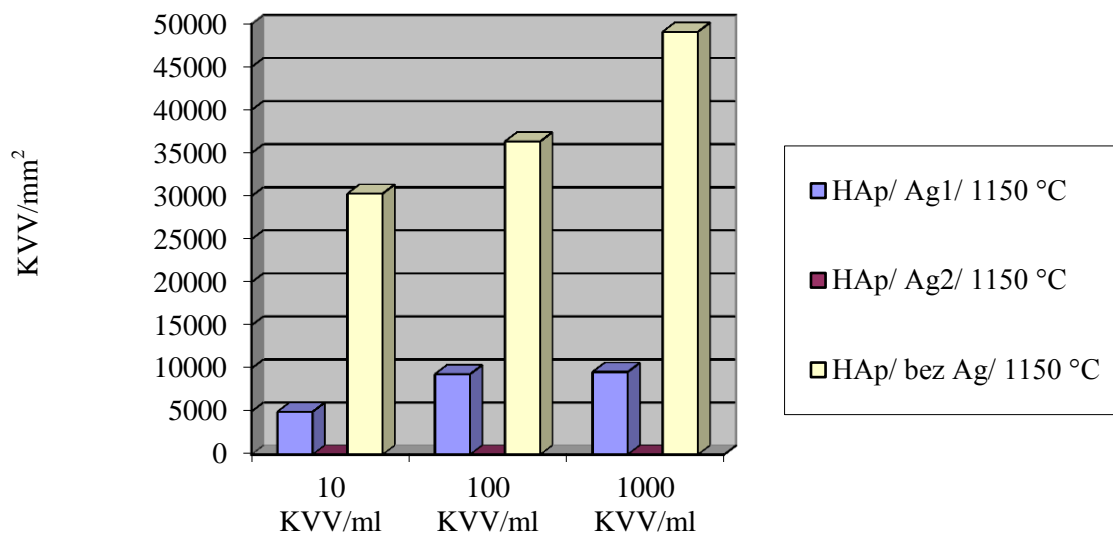
Biomateriāls



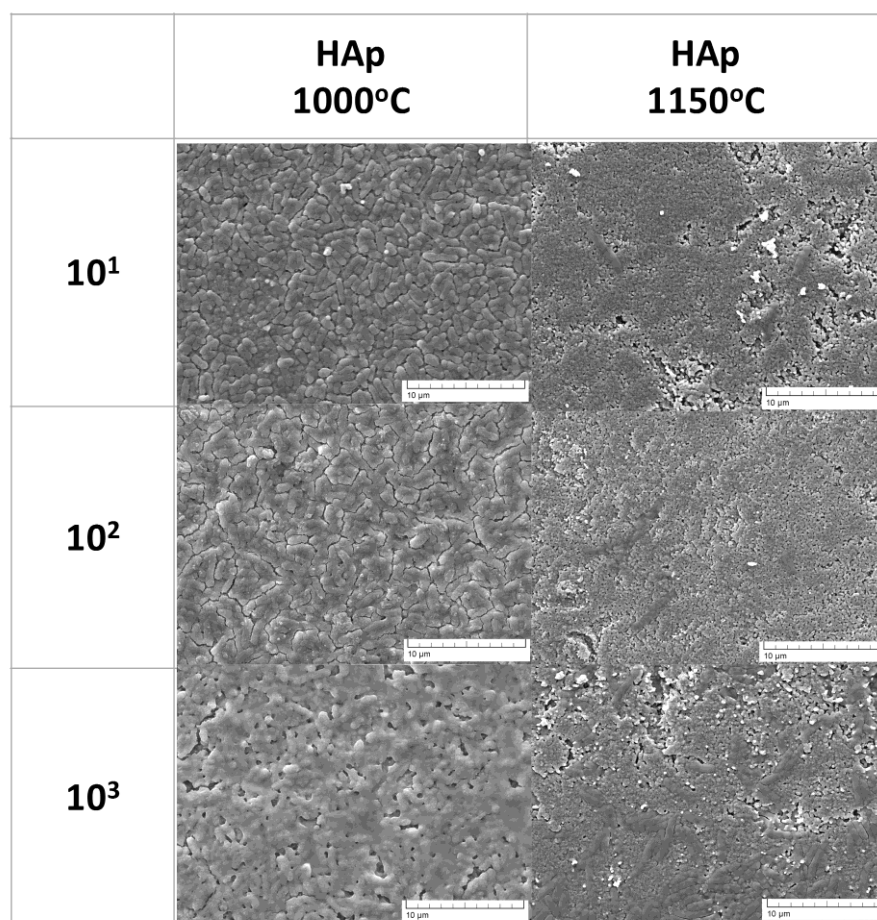
4.35. attēls. *S. epidermidis* kolonizācijas intensitāte uz HAp un Ag saturošu biomateriālu virsmas



4.36. attēls. *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte uz HAp un Ag saturošu biomateriālu (saķepināšanas temperatūra 1000 °C) virsmas KVV/mm² pēc ekspozīcijas 37 °C 24 h (p < 0,05)



4.37. attēls. *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte uz HAp un Ag saturošu biomateriālu (saķepināšanas temperatūra 1150 °C) virsmas KVV/mm² pēc ekspozīcijas 37 °C 24 h (p < 0,05)



13

4.38. attēls. *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte uz HAp un Ag saturošu biomateriālu virsmas

5. DISKUSIJA

Implantācijā izmantojamiem biomateriāliem piemīt reaktogenitāte – spēja izraisīt dažādas intensitātes makroorganisma atbildes reakciju (*Skagers, 2011; Слуцкий, Вемпа, 2001; Berzina, 1989*). Pati atbildes reakcija pēc kvalitatīvām pazīmēm vienmēr ir vienāda – iekaisums un svešķermeņa ierobežošana ar saistaudu kapsulu, ja nav iespējams to degradēt vai izstumt laukā (*Skagers, 2011; Слуцкий, Вемпа, 2001*). Reaktogenitāti var koriģēt daudzi faktori, piemēram, biomateriāla struktūra (*Bridges, García, 2008*), makroorganisma īpašības (*Anderson et al., 2008; Bridges, García, 2008*), kā arī “trešais” spēks – mikroorganismi (*Renz, 2015; Gregory, 2014; Trampuz, Zimmerli, 2005; James et al., 2001*). Lielai daļai mikroorganismu, kuri ir cilvēka organisma normālās floras pārstāvji vai kuru nēsātāji mēs varam būt, piemīt spēja virzīties uz organismā implantētiem mākslīgiem objektiem, piesaistīties pie tiem (adhēzija) un tos kolonizēt, izveidojot ar glikokaliksu klātu koloniju (*Büttner et al., 2015; Renz, 2015; Gregory, 2014; Anderson, 2008; Trampuz, Zimmerli, 2005; James et al., 2001*).

Mūsu zinātniskajā darbā galvenais pētījumu objekts bija tieši minētais “trešais” spēks jeb mikroorganismi un to saistība un ietekme uz biomateriālu, lai noteiktu gan to spēju piesaistīties (adhēziju), gan kolonizēt biomateriālu, kā arī atsevišķu biomateriālu (stikla keramikas) gadījumā – *in vivo* modelim izraisīt ar biomateriāliem saistītu infekciju.

Ar implantiem saistītās infekcijas ir plaši atzītas kā vienas no visnopietnākajām un postošākajām komplikācijām, kas var rasties biomateriālu izmantošanas gadījumos medicīnas praksē (*Renz, 2015; Dapunt, 2014; Gregory, 2014; Ando, 2012, 2009; Busscher et al., 2012; Hidron, 2008; Trampuz, Zimmerli, 2005, James et al., 2001; Atkins, 1998*). Pieaug interese un vajadzība pēc tādu implantu biomateriālu izveides, kuriem būtu samazināta jutība pret mikrobu kolonizāciju un arī kavēta biofilmas attīstība (*Haenle et al., 2012*). Tādēļ šo patogēnētisko mehānismu ietekmes mazināšanai vajag izstrādāt dažādus *in vitro* un *in vivo* modeļus biomateriālu preklīniskai novērtēšanai un testēšanai (*Iwakura et al., 2014*). Pašreizējās tehnoloģijas nodrošina šos pētījumus ar plašu kvalitatīvo un kvantitatīvo metožu izvēli, lai precīzi varētu novērtēt biomateriālu bioloģisko aktivitāti un pretmikrobo iedarbību (*Dapunt, 2014; Belcarz, 2010*). Šos testus parasti veic, izmantojot speciāli šim nolūkam izraudzītu references baktēriju tīrkultūru – testa vai standarta celmu. Pētījumiem jāizvēlas tādi testmikrobu celmi, kuri var pildīt klīniski nozīmīgu infekciju ierosinātāju funkciju (*Renz, 2015; Gregory, 2014*). Pareiza references celmu izvēle preklīniskajos testos ir izšķiroši nozīmīga, lai vēlāk no attiecīgā biomateriāla izgatavotu un tad medicīnas praksē izmantotu implantu vai citu ierīci (*Campoccia et al., 2008*).

Mūsu pētījumam izvēlējamies divus mikroorganismus: grampozitīvo koku – *S. epidermidis* – un gramnegatīvo nūjiņu – *P. aeruginosa*.

Stafilokoki ir nozīmīgi ar implantiem saistīto infekciju ierosinātāji. *S. aureus* bieži var izraisīt ar biomateriāliem saistītās infekcijas – metālbiomateriālu, kaulu un locītavu, mīksto audu infekcijas, bet *S. epidermidis*, kas ir ādas normālās mikrofloras pārstāvis, ierosina arī ar polimēriem saistītās implantu infekcijas (Renz, 2015; Gregory, 2014; Harris, Richards, 2006). Stafilokoki ir cilvēka un citu zīdītāju ādas un gļotādu normālajā mikroflorā, no kurienes tie var vai nu tiešas pārnese ceļā, vai hematogēni kontaminēt implantētos biomateriālus. Tāpat stafilokokiem piemīt svarīga īpašība – metabolisma rezultātā izdalīt gļotas, kas pārklāj koloniju un veido uz implanta virsmas biofilmu. Parasti stafilokoku veidotā biofilma ir bieza un daudzslāņaina, veidota no intracelulārā polisaharīdu adhezīna, kuram ir galvenā nozīme biofilmas veidošanās procesā, turklāt tas veicina baktēriju agregāciju un hemaglutināciju. Biofilmas sastāvā esošais intracelulārais polisaharīdu adhezīns nodrošina stafilokoku kolonijas aizsardzību pret saimniekorganisma nespecifiskās rezistences faktoriem, piemēram, fagocitozi, komplementa sistēmu u. c. (Voung et al., 2004). Raugoties uz visu koagulāzes negatīvo stafilokoku grupu, *S. epidermidis* saglabā līderpozīcijas, tiek izsēts no implantu paraugiem un vispār tiek uzskatīts par ļoti nozīmīgu hospitālo (nozokomiālo) infekciju etioloģisko aģentu, kuram piemīt spēja veidot arī meticilīnrezistentos un pret daudzām antibiotisko un antimikrobo vielu grupām multirezistentos celmus (Greco et al., 2015; Kurtz et al., 2010; Harris, Richards, 2006). Šo *S. epidermidis* patoģenētisko spēju kolonizēt biomateriālus mēs arī izmantojam savā pētījumā.

Par otru testa organismu izvēlējamies *P. aeruginosa*, kas ir gramnegatīva nūjiņa, pieder pie *Pseudomonaceae* dzimtas. Pseudomonas ir ļoti plaši izplatītas dabā – tās pieder pie augsnes, ūdens, augu un dzīvnieku (ieskaitot cilvēku) mikrofloras. Kā lielākā daļa normālās mikrofloras pārstāvju, arī pseudomonas ir pieskaitāmas pie oportunistiem, kas var izraisīt smagas nozokomiālās, hospitāļos iegūtās, infekcijas, īpaši imūnsupresētiem pacientiem (Biswal et al., 2014; Balasubramanian et al., 2013). ASV Nacionālās veselības aprūpes aģentūra *P. aeruginosa* ir ierindojusi 6. vietā starp infekcijām, kurām ir tendence atkārtoties, 2. vietā kā ar mākslīgo ventilēšanu saistīto pneimoniju ierosinātāju, 7. vietā kā ar katetriem saistīto bakteriēmiju un sepšu ierosinātāju (Sharma et al., 2013; Hidron et al., 2008). Pacientiem ar apdeguma brūcēm, AIDS un cistiskās fibrozes slimniekiem pseudomonu izraisītās hospitālās infekcijas nozīmīgi palielina nāves risku (Sharma et al., 2013).

Nedrīkst nepieminēt arī citu būtisku pseudomonu īpašību – spēju veidot pret antibiotiskajām vielām multirezistentus celmus. Rezistence pret antibiotiskām vielām tikai pieaug, ja minētā baktērija ir izveidojusi biofilmu un tā ir ieslēgta kā apvalkā eksopolisaharīdu

veidotajā matriksā (*Balasubramanian, 2013; Ma, 2009; Lewis, 2007; Mah et al., 2003*). Šī baktērija spēj veidot biofilmas uz dažādām dzīvām un nedzīvām virsmām, piemēram, uz gļotu korķiem elpceļos cistiskās fibrozēs slimniekiem, uz kontaminētiem katetriem, kontaktlēcām. Līdzīgi kā stafilokoku gadījumā, arī peidomonas labvēlīgos apstākļos var veidot daudzslāņu, biezas, sēnes atgādināšas biofilmas ar kanāliem barības vielu uzņemšanai un metabolo galaproduktu izvadīšanai (*Sharma et al., 2013*). Līdz ar to *P. aeruginosa* tiek uzskatīta par labāko modeļorganismu, lai pētītu un modelētu gramnegatīvo baktēriju veidotās biofilmas (*Sharma et al., 2013*).

Savukārt, pamatojoties uz iegūtajiem novērojumiem, mikrobioloģisko uzsējumu rezultātiem un SEM kā orientējošu metodi biomateriālu virsmas kolonizēšanas izvērtēšanai, domājam, ka ļoti liela nozīme biofilmas veidošanās patogēnēzē ir mikroorganismu adhēzijai un kolonizācijai, kuru intensitāti uz biomateriāliem nosaka to virsmas īpašības, piemēram, kristāliskā vai amorfā fāze, kā tas bija mūsu pētījumā.

Biofilmu veidojošā pamatvienība ir baktēriju mikrokolonija. No nobriedušas biofilmas sastāva 10–15% aizņem baktērijas, kamēr glikokaliksks sastāda ~ 85–90%. Glikokaliksks sastāv galvenokārt no baktēriju producētājiem eksopolisaharīdiem, kā arī nukleīnskābēm, minerālvielām un proteīniem. Glikokaliksks kopā ar baktēriju šūnām izveido biezu masu, kas skenējošā elektronmikroskopā pēc formas var atgādināt torņus vai sēnes un to augstums var sasniegt pat vairākus milimetrus (*Abd El-Baky, 2012; Dunne, 2002*). Ikvienas nozokomiālās infekcijas patogēnēzē glikokaliksa vislielākā nozīme ir būt par evāzijas faktoru, jo tas pārklāj mikroorganismu koloniju un pasargā to pret biocīdajiem aģentiem un makroorganisma aizsardzības mehānismiem. Tāpat ir novērota atvērtu kanālu veidošanās starp mikrokolonijām, kas var pildīt primitīvas cirkulācijas un drenāžas sistēmas funkcijas, lai nodrošinātu biofilmas sastāvā esošo mikrokoloniju apgādi ar ūdeni un barības vielām, kā arī vielmaiņas galaproduktu izvadi ārā no kolonijām (*Abd El-Baky, 2012; Ma, 2009; Ryder, 2007; Dunne, 2002*). *In vivo* apstākļos un ārējā vidē biofilmas parasti sastāv no vairāku sugu baktērijām, kuru kopumam mēdz pievienoties arī sēnes, jo šādā gadījumā vienu sugu sintezētās vielas kalpo par barības vielu avotu citām sugām. Tāpat arī vienas sugas mikrobu adhēzija pie mērķa virsmas var nodrošināt citas sugas ar vajadzīgajiem, piesaisti nodrošinošajiem ligandiem. Arī nobriedušā biofilmā esošo baktēriju daudzums ir ļoti liels – pat 10^3 – 10^5 (*Abd El-Baky, 2012*).

Tāpēc arī mūsu pētījumā būtiska nozīme bija mikroorganismu kolonizācijas izpētei dažādu biomateriālu virsmā, to īpašībai veidot uz tā ar glikokaliksu pārklātas kolonijas, kā arī, atsevišķos pētījumos izmantojot SEM metodi, to veidošanās dinamikas un morfoloģijas izpētei (Kalab, Yang, Chabot, 2008). SEM izmeklēšanas tehnoloģija ļabi vizualizē glikokaliksa veidošanos dinamikā, ko mēs arī darījām mūsu pētījumā ar stikla keramikas biomateriāliem. Šādus biomateriālus gan vēl klīnikā neizmanto, tādēļ būtu jāturpina materiāla izpēti gan *in vitro*, nosakot dažādu baktēriju adhēziju un kolonizāciju dažādām materiāla modifikācijām, gan *in vivo*, pētot iekaisuma citokīnu produkcijas dinamiku.

Iegūtie rezultāti lika domāt, ka A biomateriāla (izejviela un produkts bija kristāliski) virsmas īpašības nav īpaši labvēlīgas pētījumā izmantoto baktēriju augšanai, kas varētu būt labs rezultāts, ja šāda veida biomateriālu izmantotu implantu gatavošanai. Uz amorfās virsmas biomateriāliem mēs novērojām, ka *P. aeruginosa* neveido tik blīvu biofilmu kā uz kristāliskajiem un, lai arī tiek kolonizēta visa virsma, biofilma ir plānāka un nav tik izteikti klāta ar glikokaliksu kā kristāliskā B biomateriāla gadījumā. Tas liek domāt, ka biomateriāli ar amorfāku virsmu nav tik labvēlīgi baktēriju kolonizācijai kā biomateriāli ar kristālisko virsmu. Piemēram, *S. epidermidis* kolonizācija uz kristāliskā B biomateriāla 48 un 72 stundu laikā ir attēlota 14. un 15. attēlā, kur labāk ir redzama biomateriāla virsma, jo stafilokoks to pārklāj retāk nekā *P. aeruginosa*, veidodams izklaidus izvietotas kolonijas.

Šo atšķirīgo *P. aeruginosa* un *S. epidermidis* kolonizācijas raksturu uz pētāmajiem biomateriāliem ļoti labi var novērot 4.4. un 4.5. attēlā, kur kā piemērs parādīts kristāliskais B biomateriāls un kur labi var redzēt *P. aeruginosa* biofilmas veidošanās dinamiku uz tā virsmas: pēc 48 stundām varējām novērot ar glikokaliksu pārklātu biofilmu, ko caurvija kanāli un caur kuru vēl bija redzama biomateriāla kristāliskā virsma, bet pēc 72 stundām biomateriāla virsmu jau sedza pilnīgi kompakta, ar glikokaliksu noklāta biofilma. Iegūtie rezultāti varētu liecināt, ka C biomateriāla (iegūts no amorfas izejvielas, bet produkts bija kristālisks) pagatavošanas tehnoloģija nesamazina baktēriju adhēzijas intensitāti uz biomateriālu virsmas.

Pretēji kristāliskajiem biomateriāliem raksturīga amorfa virsma ir redzama 4.10. attēlā, kur parādīts D biomateriāls, uz kura stafilokoks izteiktākas kolonijas veido tikai vēlākās kolonizācijas stadijas – pēc 72 stundām, kā to var redzēt 4.11. attēlā. Savukārt 4.6. un 4.7. attēlā ir parādīta *P. aeruginosa* kolonizācija uz šī paša D biomateriāla. Runājot par kodinātajiem biomateriāliem, jāakcentē, ka kodināšanu veica ar mērķi uz virsmas samazināt vieglāk šķīstošo amorfo fāzi. 4.12. attēlā ļabi redzamas B+ kodinātā biomateriāla virsmas atšķirības, salīdzinot ar 4.9. attēlā redzamo nekodināto B biomateriālu. Tāpat arī var redzēt

4.10. attēlā amorfā D biomateriāla virsmas izmaiņas, salīdzinot ar 4.13. attēlu, kur redzama D+ kodinātā biomateriāla virsma.

Tātad ir jādomā, ka biomateriāliem ar izteiktu amorfo fāzi piemīt lielāka spēja piesaistīt pie savas virsmas mikroorganismus, savukārt kodināšanas procesā samazinot amorfo fāzi uz biomateriāla virsmas, varētu panākt tikai to, ka biomateriāls kļūst mikrobioloģiski “nedrošāks”.

Tāpat arī, analizējot attēlus, kas iegūti, izmantojot skenējošo elektronmikroskopu, ļoti labi varēja novērot atšķirīgo *P. aeruginosa* un *S. epidermidis* kolonizācijas raksturu uz pētāmajiem biomateriāliem. Tika novērots, ka *P. aeruginosa* bija tendence kolonizēt visu biomateriāla virsmu, veidojot vairāk vai mazāk biezu biofilmu ar to caurvijošiem kanāliem. Pēc 72 h kolonizācijas varēja novērot glikokaliksu, kas pilnīgi pārklāja koloniju, nosedzot arī kanālus. *P. aeruginosa* uzrādīja arī labāku kolonizācijas tendenci uz kristāliskiem un kodinātiem biomateriāliem, ja salīdzina ar biomateriāliem ar amorfāku virsmu. Turpretim *S. epidermidis* kolonizēja, veidojot retas un kompakas kolonijas, arī uzrādot tendenci labāk kolonizēt kristāliskos un kodinātos biomateriālus.

Stikla keramikas biomateriālu gadījumā bija iespējams ar biomateriāliem saistīto infekciju modelēt, izmantojot arī laboratorijas dzīvniekus. Mūsu pētījuma *in vivo* daļā izvēlējamies kontaminēt biomateriāla paraugus divās koncentrācijās – 10^2 un 10^3 KVV/ml, jo, kā rādīja *in vitro* testi, baktēriju adhēzija sākas tieši šajās koncentrācijās. Minētājai situācijai varētu pat dot nosaukumu “minimālā biomateriālu inficējošā deva” – pēc analogijas ar minimālo inficējošo devu daudzu infekcijas slimību gadījumos. Savukārt izvēlētais *in vivo* ekspozīcijas laiks, kas bija 2 un 4 nedēļas un 3 mēneši, pēc daudzu ar biomateriāliem vai implantiem saistīto infekciju pētnieku domām atbilst agrīnas implantu infekcijas gadījumam (Trampuz, Zimmerli, 2005, Jonas et al., 2001). Pētījumā svarīgi bija modelēt agrīnu implantu infekciju ar eksperimentāli izmantotajiem, oriģināli sintezētajiem biomateriālu paraugiem, tādējādi nosakot baktēriju kolonizācijas intensitāti *in vivo* apstākļos, kā arī iekaisuma intensitāti, nosakot svarīgus iekaisuma citokīnus – TNF- α , Il-10 un β defensīnu-2.

Biomateriāla implantācija ir traumatisks process, ko vēl pasliktina tas, ka biomateriāla paraugs ir kontaminēts ar baktērijām. Rezultātā implantācijas vietā sākas pastiprināta citokīnu, piemēram, TNF- α , produkcija, kuru daži pētnieki iesaka izmantot kā prognostisku marķieri iekaisuma intensitātes pētīšanā (Bottner, 2007). Līdz ar to fakts, ka iekaisuma citokīnu produkcijas intensitāte nesāk samazināties aptuveni 7 dienas pēc operācijas veikšanas, var nozīmēt, ka ap implantu sāk attīstīties infekcija (Bottner, 2007; Shindo, 2003). *S. epidermidis* kā ādas normālās mikrofloras pārstāvis var ierosināt ar implantiem saistītās

infekcijas, kā arī stimulēt β defensīna-2 izdali (Sawamura, 2005). TNF- α un *P. aeruginosa* arī var stimulēt β -defensīna-2 izdali (Gollwitzer, 2013, Lai, 2010).

Il-10 ir iekaisumu supresējošs citokīns, kura darbības rezultātā samazinās TNF- α , Il-6, Il-1 produkcija. Il-10 arī veicina citu pretiekaisuma citokīnu produkciju, kuri samazina iekaisuma citokīnu receptoru ekspresiju uz imūnkompetento šūnu virsmas (Zhang, 2007). Autori norāda, ka Il-10 pat 21 dienu pēc operācijas ir izteikti ekspresēts audos ap implantu. Tāpat pētījumos ir pierādīts, ka Il-10 maz ietekmē implantētā biomateriāla toksicitāte, jo gan toksisko – varu saturošo – biomateriālu, gan netoksisko – TiO₂ saturošo – materiālu gadījumos Il-10 dinamika bija līdzīga (Duarte, 2009; Gretzer, 2006; Suska, 2005). Atšķirība tika novērota tikai tādu paraugu implantācijā, kuri bija kontaminēti ar baktērijām (Duarte, 2009). Līdz ar to TNF- α pētnieki uzskata par labāku prognostisku marķieri, kas ļauj spriest par iekaisuma dinamiku (Sun, 2010; Gul, 2010; Schutte, 2009). Piemēram, TNF- α atrade locītavu šķidrumā var liecināt par to, ka sākusies ar implantu saistītas infekcijas attīstība (Gollwitzer, 2013).

Mūsu pētījumā TNF- α un Il-10 ekspresija audos ap implantētajiem biomateriāliem kopumā bija vidēji izteikta kontroles paraugos, kuri netika kontaminēti ar baktērijām. Līdzīgu ainu novērojām arī biomateriālu paraugos ar *S. epidermidis*. Visintensīvākā gan TNF- α , gan Il-10 ekspresija tika novērota ap paraugiem, kontaminētiem ar *P. aeruginosa*. Sakarā ar to, ka Il-10 piemīt spēja supresēt celulāro imūno atbildi, jo dotais citokīns spēj samazināt makrofāgu spēju izdalīt interleikīnu-12, kurš savukārt nepieciešams celulāro imunitāti stimulējošā T līdzētājšūnas-1 subpopulācijas veidošanā. Līdz ar to var domāt, ka paaugstinātā Il-10 koncentrācija ap biomateriālu var norādīt gan uz makroorganisma mēģinājumu samazināt imūnās sistēmas reaktivitāti ap implantu, gan arī uz to, ka šāda reakcija var kalpot kā iemesls oportūnistiskas infekcijas attīstības riskam. (Franz et al., 2011; Higgins et al., 2009).

Pamatā arī citu autoru pētījumos, kuros gan nebija izmantoti ar baktērijām kontaminēti biomateriāli, tika novērota iekaisuma citokīnu paaugstināšanās – ar dažādu dinamiku, atkarībā no izmantotā biomateriāla veida. Visi autori norāda uz Il-10 paaugstināšanos, kamēr TNF- α dinamika ir dažāda (Jonas et al., 2001; Higgins et al., 2009). Par ar baktērijām kolonizētu biomateriālu ietekmi uz β defensīnu-2 produkciju literatūrā ir maz datu, un tie ir pretrunīgi (Schneider et al., 2005).

Būtu ieteicams, ka lielās kompānijas, kas specializējas diagnostisko ierīču produkcijā, ieteiktu uz imūnfermentatīvo reakciju vai imūnhromatogrāfijas tehniku bāzētus testus vai eksprestestus ortopēdiem un traumatologiem, lai maksimāli ātri varētu diagnosticēt ar implantiem saistīto infekciju attīstību.

HAp un TiO₂ kompozītmateriāli neuzrādīja lielu spēju piesaistīt pētījumā izmantotās baktērijas. No eksperimentālajiem datiem redzams, ka tīram TiO₂ ir ļoti niecīga baktēriju adhēzija, salīdzinot ar citiem paraugiem, kas sakrīt ar *Pavlovas et al.* 2011. gada pētījumiem. To var izskaidrot ar to, ka TiO₂ ir hidrofila virsma, bet abu pētījumā izmantoto baktēriju virsmas ir hidrofobas. Tā kā mikroorganismi ar hidrofobām virsmas īpašībām labāk piesaistās pie hidrofobām materiālu virsmām, tad kompozītiem ar lielāku TiO₂ saturu ir mazāka adhēzija. Mūsu pētījumā novērojām, ka *S. epidermidis* baktērijām ir lielāka spēja piesaistīties sintezētam HAp. Savukārt uz paraugu virsmām, kas apdedzināti 1200 °C temperatūrā, ir novērojama mazāka adhēzija, jo baktērijām vieglāk piesaistīties pie porainiem materiāliem, tādēļ uz blīvākiem paraugiem mikroorganismu adhēzijas intensitāte ir daudz mazāka, jo 1200 °C temperatūrā apdedzinātiem paraugiem mikrostruktūra ir mazāk poraina (*Yuehuei, Friedman, 1998*).

Mūsu pētījumā izmantotajiem kompozītiem HAp ar 50%TiO₂ un HAp ar 80%TiO₂, kas apstrādāti 1200 °C temperatūrā, ir vismazākā mikroorganismu adhēzija. Turklāt *P. aeruginosa* baktēriju tendence piesaistīties pie kompozītceramikas virsmām ir mazāka nekā *S. epidermidis*.

Pēc mūsu eksperimentālajiem datiem redzams, ka *P. aeruginosa* baktēriju tieksme kolonizēties pie paraugu keramikas virsmām ir daudz mazāka nekā *S. epidermidis*. Uz paraugu virsmām, kas apdedzināti 1200 °C, arī ir novērojama mazāka mikroorganismu kolonizācija pazeminātas porainības dēļ (*Yuehuei, Friedman, 1998*). Tādēļ *S. epidermidis* gadījumā kompozītceramikai, kas sastāv no HAp ar 80%TiO₂, ir mazāka kolonizācijas iespējamība 1200 °C temperatūrā, bet *P. aeruginosa* gadījumā tas ir raksturīgs visiem sastāviem pie abām apdedzināšanas temperatūrām.

Biomateriāli ar antimikrobām piedevām kļūst aizvien populārāki un nozīmīgāki. Sudrabs ir viens no biežākajām piedevām, ko pievieno biomateriāliem, lai nodrošinātu ar biomateriāliem saistīto infekciju profilaksi (*Chen et al., 2015, 2007; Costa et al., 2014; Kankilic et al., 2014; Coraça-Huber et al., 2013; Pritchard et al., 2013*).

Dažādu autoru pētījumos akcentēti Ag saturoši pārklājumi kā jauns un perspektīvs virziens, lai kavētu ar biomateriāliem saistītās infekcijas (*Johnson et al., 2012*). Pētījumos ir pierādīts, ka HAp/Ag pārklājumi var nodrošināt baktēriju adhēzijas un kolonizācijas efekta samazināšanos pat 10⁴–10⁵ reižu, norādot, ka šādiem pārklājumiem ir antibakteriāls efekts gan *in vitro*, gan *in vivo* apstākļos. Autori arī iesaka nākotnes pētījumiem izmantot TiO₂/HAp/Ag pārklājumus (*Noda et al., 2010; Ando et al., 2009*).

Arī viens no mūsu pētījuma mērķiem bija izvērtēt HAp biomateriālu, kas tika piesūcināti ar sudrabu, skafoldu antibakteriālā efektivitāte, tādēļ tika salīdzināti HAp/Ag

0,2% un HAp/Ag 1,2% paraugi, sinterēti 1000 °C un 1150 °C temperatūrā.

Atšķirības starp *S. epidermidis* un *P. aeruginosa* adhēzijas rezultātiem tika novērotas uz biomateriāliem, kuriem atšķīrās saķepināšanas temperatūra. Uz paraugiem, kuri bija saķepināti 1000 °C, *S. epidermidis* adhēzijas process sākās tikai pēc 2 h inkubācijas 10^2 KVV/ml baktēriju koncentrācijā, bet *P. aeruginosa* gadījumā – tikai 10^3 KVV/ml baktēriju koncentrācijā. Paraugi, kuri tika saķepināti 1150 °C temperatūrā, uzrādīja ļoti labas antibakteriālās īpašības, jo *P. aeruginosa* kolonizācijas aktivitāte tika pilnīgi nomākta, bet *S. epidermidis* gadījumā tā notika tikai 10^3 KVV/ml koncentrācijā un arī bija zema. Nozīme bija arī sudraba koncentrācijai – uz paraugiem, kuros Ag koncentrācija bija 1,2%, stafilokoku un pseidomonu kolonizācija bija kavēta.

Ando et al. pētījumos (2012) tika pierādīta augsta HAp/Ag pārklājumu efektivitāte pret *E. coli*, *S. aureus* un meticilīnrezistentu *S. aureus*, kavējot minētajiem mikroorganismiem veidot biofilmas apstākļos, kuri pietuvināti *in vivo* apstākļiem (modelējot šķidrums plūsmu). Rezultāti parādīja HAp/Ag pārklājumu spēju kavēt biofilmas veidošanos un ar biomateriālu infekciju vistiešākā veidā saistītas spējas kavēšanu. Biofilmas, kā arī adhēzijas un kolonizācijas kavēšana ir saistīta ar sudraba jonu antimikrobo iedarbību un plašo antimikrobo darbības spektru (*Ando et al.*, 2012).

Pētījumā izmantotajiem kalcija fosfātu saturošajiem biomateriāliem netika pierādīta iegūšanas tehnoloģijas ietekme uz stafilokoku un pseidomonu adhēzijas un kolonizācijas procesiem – to ietekmēja biomateriāla ķīmiskais sastāvs. Iegūtais rezultāts ar baktērijām sakrita arī ar osteoblastu piesaistīšanās spējām uz minētajiem biomateriāliem (*Loča et al.*, 2013, 2012).

Atšķirībā no Ti saturošajiem biomateriāliem, *P. aeruginosa* uz sintētisko kalcija fosfātu materiālu virsmas izrāda lielāku adhēzijas un kolonizācijas intensitāti. Tāpat baktēriju tieksmi piesaistīties pie pētījumā izmantotajiem materiāliem ietekmē to ķīmiskais sastāvs – trikalcijfosfāta daudzums. Materiāliem ar lielāku trikalcijfosfāta piedevu gan *S. epidermidis*, gan *P. aeruginosa* piesaistās un tos kolonizē vairāk. Trikalcijfosfāta daudzums ietekmē ne tikai baktēriju, bet arī osteoblastu piesaistīšanos un proliferāciju, kas tika pierādīts Ločas un Romančikovas pētījumos (*Loča, Romančikova*, 2013).

Pie sintētiskajiem kalcija fosfātu biomateriāliem pētījumā izmantotās baktērijas uzrādīja spēju piesaistīties jau zemās un vidējās ekspozīcijas koncentrācijās (10 un 10^2 KVV/ml). Arī citi pētnieki (*Al-Ahmad et al.*, 2008) apgalvo, ka trikalcijfosfātu saturošiem biomateriāliem piemīt augstas spējas piesaistīt dažādus grampozitīvus un gramnegatīvus mutes mikrofloras pārstāvjus, kā arī kandidas sēnīti, tādējādi prognozējot, ka, izmantojot minētos materiālus, kas

nav piesūcināti ar antimikrobām vielām, piemēram, mutes ķirurģijas vajadzībām, varētu palielināt ar biomateriāliem saistītās infekcijas risku.

Pētījums aktualizē nepieciešamību izstrādāt ar pretsēnīšu un antibakteriāliem aģentiem piesūcinātus trikalcijfosfātu saturošus materiālus, izvērtējot HAp daudzumu tajos.

6. SECINĀJUMI

1. *P. aeruginosa* adhēzijas un kolonizācijas intensitāte uz pētījumā izmantoto biomateriālu virsmas ir ievērojami izteiktāka nekā *S. epidermidis* adhēzija un kolonizācija *in vitro* pētījumā.
2. *P. aeruginosa* veidotā biofilma ir blīva, ar polipveidīgiem izaugumiem un kanāliem starp tiem, savukārt *S. epidermidis* veido kompaktas atsevišķas kolonijas biomateriālu virsmā *in vitro* pētījumā.
3. Pētījumā izmantotajām baktērijām ir zema adherence pie biomateriāliem, kuru sastāvā ir HAp un TiO₂.
4. Optimālākais HAp/TiO₂ kompozītceramikas sastāvs, kad mikroorganismu kontaminācijas risks ir viszemākais, ir ar 50% un 80% TiO₂ saturu pēc biomateriāla termiskas apstrādes 1200 °C temperatūrā.
5. *P. aeruginosa* infekcijas gadījumā audos β defensīna-2 produkcija samazinās, vājinot organisma nespecifisko rezistenci.
6. Citokīnu ekspresija audos ap biomateriālu, kas kontaminēts ar *P. aeruginosa*, ir ievērojami izteiktāka nekā *S. epidermidis* kontaminācijas gadījumā.
7. Citokīnu ekspresija samazinās pēc 3 mēnešu ekspozīcijas.

7. PRAKTISKĀS REKOMENDĀCIJAS

1. Izmantot sonikācijas metodi, lai noteiktu ar implantiem un katetriem saistīto infekciju etioloģisko spektru.
2. Biomateriālu preklīniskās izmeklēšanas mikrobioloģiskajā daļā biomateriāliem noteikt baktēriju adhēzijas un kolonizācijas intensitāti gan *in vitro*, gan *in vivo*, kā arī iekaisuma citokīnu ekspresiju audos pēc implanta eksplantācijas.

8. AR PĒTĪJUMU SAISTĪTĀS PUBLIKĀCIJAS

Zinātniskie raksti

1. Reinis A., Kroiča J., Vētra J., u.c. Biomateriālu spēja piesaistīt *Staphylococcus epidermidis* pētījumā *in vitro* // RSU Zinātniskie raksti, 2002; 211–214.
2. Reinis A., Stunda A., Kroiča J., u.c. *Staphylococcus epidermidis* un *Pseudomonas aeruginosa* adhēzijas un kolonizācijas intensitātes novērošana uz biomateriāliem ar dažādas kristalizācijas pakāpi un modificētu virsmu *in vitro* pētījumā // RSU Zinātniskie raksti, 2009; 457–468.
3. Reinis A., Vetra J., A. Stunda, L., et al. *In vitro* and *in vivo* examinations for detection of minimal infective dose for biomaterials // World Congress of Biomechanics, 2010; 1204–1207.
4. Reinis A., Pilmane M., Stunda A., et al. *In vitro* and *in vivo* study of *S. epidermidis* and *Ps. aeruginosa* adhesion and colonisation intensity on originally synthesised biomaterials with different chemical composition and modified surfaces and its effect on TNF- α , β -defensin-2 and Il-10 expression in tissues // Medicina, 2011; 47(10): 560–565.
5. Pavlova A., Reinis A., Berzina-Cimdina L., et al. *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* adhesion intensity on a TiO₂ ceramic in an *in vitro* study // Adv. Mater. Res., 2011; 222: 301–304.
6. Skadins I., Reinis A., Kroica J., et al. Adhesion and colonisation intensity of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on a composite material surface of Hydroxyapatites and Titanium Dioxide // International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health, 2012; 4(12): 2065–2076.
7. Stasko J., Romancikova N., Reinis A., et al. Development of poly(vinyl alcohol) cryo-systems with medicines and their comparative study of antimicrobial activity and cytotoxicity // IFMBE Proceedings 38, 2013; 113–118.
8. Loca D., Dubnika A., Reinis A., Romancikova N. *In vitro* evaluation of osteoblast cell behavior and antimicrobial properties of biphasic calcium phosphate ceramics // IFMBE Proceedings 38, 2013; 186–189.
9. Dubnika A., Loca D., Reinis A., et al. Impact of sintering temperature on the phase composition and antibacterial properties of silver-doped hydroxyapatite // Pure and Applied Chemistry, 2013; 85(2): 453-462.

10. Dubnika A., Loca D., Salma I., Reinis A., et al. Evaluation of the physical and antimicrobial properties of silver doped hydroxyapatite depending on the preparation method // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2014; 25(2): 435-444.
11. Vētra J., Reinis A., Skadiņš I., Kroiča J. Mikroorganismu biofilmas un to ietekme uz implantātu biosaderību // *Latvijas Ārsts*, 2014; 84–89.
12. Narkevica I., Reinis A., Bugovecka L., et al. *In vitro* bioactivity and bacteriostasis effect of thermally treated and UV-light irradiated TiO₂ ceramics // *Key Engineering Materials*, 2016; 674: 121–126.

Zinātnisko konferenču tēzes

1. Berzina-Cimdina L., Reinis A., Kroica J., et al. Bacterial colonization on surface of calcium phosphate glass ceramics // 2nd International Congress on Ceramics, Verona, 2008; 16.
2. Skadins I., Reinis A., Kroica J. Analysis methods of antibacterial efficiency of retainers impregnated with antibiotics // Symposium “Bioceramics and cells for reinforcement of bone”, Riga, Latvia, October 18–20, 2012; 25.
3. Loca D., Vecbiskena L., Reinis A., et al. Bacteria adhesion and colonization on biphasic calcium phosphate ceramics surfaces // 24th European Conference on Biomaterials: Book of Abstracts, Dublin, Ireland, 2011; 1.
4. Pavlova A., Reinis A., Berzina-Cimdina L., Kroica J. *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* adhesion intensity on a TiO₂ ceramic in an *in vitro* study // Book of Digest: 9th International Conference on Global Research and Education, Inter-Academia, 2010; 164–165.
5. Reinis A., Dubnika A., Kroica J., et al. Evaluation of bacterial adhesion and colonisation on originally synthesized composite material containing hydroxylapatite (Hap) and silver (Ag) // 11th Baltic Congress of Laboratory Medicine, Lithuania, Vilnius, May 10–12, 2012; 47.
6. Reinis A., Dubnika A., Kroiča J., u.c. Bakteriālās adhēzijas un kolonizācijas izvērtējums uz oriģināli sintezētu hidroksilapatītu (Hap) un sudrabu (Ag) saturošu biomateriālu virsmas // RSU Zinātniskā konference [2012. gada 29.–30. marts]: Tēzes, 2012; 319.
7. Reinis A., Kroica J., Vetra J., et al. Biomaterial associated infections – causative agents and mechanisms // 12th Baltic Congress of Laboratory Medicine, Latvia, Riga, September 18–20, 2014; 33.

8. Reinis A., Kroica J., Vetra J., et al. The adhesion intensity of *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* on the surface of bioactive glass 4N // 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Nice, France, 2006; 10.
9. Reinis A., Kroica J., Vetra J., et al. Bacterial colonisation of original synthesized biomaterials in *in vivo* examinations // 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Munich, Germany, 2007; 141.
10. Reinis A., Kroiča J., Bērziņa-Cimdiņa L., et al. *In vitro* study of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and colonization intensity // 12th Annual Seminar & Meeting “Ceramics, Cells and Tissues”, Faenza, Italy, 2009; 124–125.
11. Reinis A., Kroiča J., Bērziņa-Cimdiņa L., u.c. *Staphylococcus epidermidis* un *Pseudomonas aeruginosa* adhēzijas un kolonizācijas intensitātes novērošana uz biomateriāliem ar dažādu kristalizācijas pakāpi un virsmas modifikāciju *in vitro* pētījumā // RSU zinātniskā konference [2009.gada 2. un 3. aprīlis]: Tēzes, 91.
12. Reinis A., Kroiča J., Vētra J., et al. *In vitro* and *in vivo* study of bacterial adhesion and colonisation on different biomaterials // Symposium “Bioceramics and cells for reinforcement of bone”, Riga, Latvia, October 18–20, 2012; 22.
13. Reinis A., Kroiča J., Vētra J., u.c. Biomateriālu spēja piesaistīt *Staphylococcus epidermidis in vitro* // RSU zinātniskā konference [2002. gada 15. februāris]: Tēzes, 71.
14. Reinis A., Kroiča J., Vetra J., et al. *Staphylococcus epidermidis* adhesion to different biomaterials *in vitro* // Abstracts of the 5th Nordic-Baltic congress on infectious diseases “Towards optimal diagnostics and management”, St. Peterburg, 2002; 50.
15. Reinis A., Kroiča J., Vētra J. *Salmonella typhimurium* adhēzijas intensitātes noteikšana uz bioaktīvā stikla (4N) un kristāliskā biokeramikas stikla (4NK) virsmas *in vitro* pētījumā // Latvijas Ārstu kongress [2005. gada 16.–18. jūnijs]: Tēzes, 2005; 74.
16. Reinis A., Kroiča J., Vētra J., u.c. *Salmonella typhimurium* adhēzijas un kolonizācijas intensitāte uz hidroksilapatīta un trikalcijfosfāta-hidroksilapatīta (1:1) granulu virsmas // RSU zinātniskā konference [2004. gada 5. marts]: Tēzes, 67.
17. Reinis A., Kroiča J., Vētra J., u.c. *Staphylococcus epidermidis* adhēzijas intensitātes noteikšana uz bioaktīvā stikla (4N) un kristāliskā biokeramikas stikla (4NK) virsmas *in vitro* pētījumā // Latvijas Ārstu kongress, [2005. gada 16.–18. jūnijs]: Tēzes, 2005; 73.

18. Reinis A., Loča D., Kroiča J., u.c. Bakteriālās adhēzijas izvērtējums uz dažāda sastāva oriģināli sintezētu hidroksiapatītu (HAP) un trikalcijfosfātu (TCP) saturošu biomateriālu virsmas // RSU Zinātniskā konference [2011. gada 26.–30. aprīlis]: Tēzes, 334.
19. Reinis A., Pavlova A., Kroiča J., u.c. Bakteriālas adhēzijas izvērtējums uz oriģināli sintezētu titāna dioksīdu (TiO₂) saturošu biomateriālu virsmas // RSU Zinātniskā konference [2011. gada 26.–30. aprīlis]: Tēzes, 2011; 333.
20. Reinis A., Pilmane M., Kroica J., et al. Evaluation of bacterial colonisation on biomaterials and its effect on TNF-A, B-defensin-2 and Il-10 expression in tissues, *in vivo* study, after 2- an 4-week exposure in rabbit tissues // 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) and 27th International Congress of Chemotherapy (ICC), 2011; 1786.
21. Reinis A., Pilmane M., Kroica J., et al. Evaluation of bacterial colonisation on TNF-A, B-defensin-2 and Il-10 expression in tissues *in vivo* study, after 2 and 4 week, and 3 month exposure in rabbit tissues // 1st Congress of Baltic Microbiologists, Latvia, Riga, 2012; 5.
22. Reinis A., Pilmane M., Kroiča J., u.c. Biomateriālu bakteriālas kolonizācijas izvērtējums un tā ietekme uz TNFα, β-defensīna-2 un Il-10 ekspresiju audos *in vivo* pētījumā pēc 2 un 4 nedēļu ekspozīcijas truša audos // RSU Zinātniskā konference [2011. gada 26.–30. aprīlis]: Tēzes, 332.
23. Reinis A., Pura A., Kroica J., et al. Evaluation of bacterial adhesion on originally synthesized composite material surfaces containing titan dioxide (TiO₂) and hydroxylapatite (Hap) // 11th Baltic Congress of Laboratory Medicine, Lithuania, Vilnius, May 10–12, 2012; 46.
24. Reinis A., Pūra A., Kroiča J., u.c. Bakteriālās adhēzijas izvērtējums uz oriģināli sintezētu titāna dioksīdu (TiO₂) un hidroksilapatītu (Hap) saturošu kompozītmateriālu virsmas // RSU Zinātniskā konference [2012. gada 29.–30. marts]: Tēzes, 2012; 318.
25. Reinis A., Staško J., Kroiča J., u.c. Polivinilspirta (PVS) gēla matricu paraugu un to analogu mikrobioloģiskā testēšana // RSU Zinātniskā konference [2011. gada 26.–30. aprīlis]: Tēzes, 2011; 335.
26. Reinis A., Stunda A., Kroica J., et al. *In vitro* study of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and colonization intensity on calcium phosphate glass-ceramics // 10th Joint Symposium Rostock–Riga “Biomaterials and bioengineering for oral and maxillofacial surgery”, 2009.

27. Reinis A., Vetra J., Stunda A., et al. *In vitro* and *in vivo* examinations for detection of minimal infective dose for biomaterials // 6th World Congress of Biomechanics, 2010; 520.
28. Skadins I., Kroica J., Salma I., et al. 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, 16.
29. Skadins I., Kroica J., Salma I., et al. 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.
30. Skadins I., Kroica J., Salma I., et al. 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.
31. Skadins I., Kroica J., Salma I., et al. Antibacterial efficiency of hydroxyapatite biomaterials with biodegradable polycaprolactone polymer, saturated with gentamicin // 12th Baltic Congress of Laboratory Medicine, Latvia, Riga, September 18–20, 2014; 42.
32. Skadins I., Kroica J., Salma I., et al. Antibacterial efficiency of biomaterials with biodegradable polymer and antibiotics // Scandinavian Society for Biomaterials 8th conference. Sigulda, Latvia, 6–8 May, 2015; 49.
33. Skadins I., Kroica J., Salma I., et al. Biomaterial antibacterial efficiency with reduced level of porosity // European Orthopaedic Research Society 22nd Annual Meeting, 2014, 2–4 July, Nantes, France, P7.1.
34. Skadins I., Kroica J., Salma I., et al. 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; 41.
35. Skadins I., Reinis A., Kroiča J. Adhesion and colonisation intensity of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on a composite material surface of hydroxyapatites and titanium dioxide // 6th International Online Medical Conference (IOMC), November 23–25, 2012.
36. Skadiņš I., Kroiča J., Šalma I., u.c. Biomateriālu antibakteriālās efektivitātes noteikšanas metodes ietekme uz antibakteriālo ilgumu // RSU Zinātniskā konference [2015. gada 26.–27. marts], 2015; 307.

37. Skadiņš I., Kroiča J., Šalma I., u.c. Biomateriālu antibakteriālās efektivitātes noteikšana // RSU Zinātniskā konference [2014. gada 10.–11. aprīlis]: Tēzes, 335.
38. Skadiņš I., Kroiča J., Šalma I., u.c. Biomateriālu efektivitāte pret *Ps. aeruginosa* un *S. epidermidis* // RSU Zinātniskā konference [2014. gada 10.–11. aprīlis]: Tēzes, 337.
39. Skadiņš I., Kroiča J., Šalma I., u.c. Fizioloģiskās vides ietekme uz biomateriāliem ar biodegradējamu polipienskābes polimēru // RSU Zinātniskā konference [2015. gada 26.–27. marts]: Tēzes, 2015; 306.
40. Skadiņš I., Kroiča J., Šalma I., u.c. 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]: Tēzes, 334.
41. Skadiņš I., Kroiča J., Šalma I., u.c. Hidroksiapatīta-polipienskābes-ciprofloksacīna biomateriālu ar vidējo porainību – 15% antibakteriālā efektivitāte *in vitro* // RSU Zinātniskā konference [2014. gada 10.–11. aprīlis], 336.
42. Stasko J., Reinis A., Romanchikova N., et al. Microbiological and citotoxicity testing of poly (vinyl alcohol) gel with Paste of Pine Extract used for wound care // 24th European Conference on Biomaterials: Book of Abstracts, Dublin, Ireland, 2011; 1.
43. Stunda A., Morozova K., Brante I., et al. Investigation of phases of sodium and niobium containing calcium phosphate glass-ceramics // Functional materials and nanotechnologies, Riga, Latvia, 2009; 88.

10. LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Abdel-Baky R. M. Application of scanning electron microscopy for the morphological study of biofilm in medical devices, scanning electron microscopy, Dr. Viacheslav Kazmiruk (Ed.) // <http://www.intechopen.com/books/scanning-electron-microscopy/application-of-scanning-electron-microscopy-for-the-morphological-study-of-biofilm-in-medical-device> (02.12.2015).
2. Al-Ahmad A., Wiedmann-Al-Ahmad M., Carvalho et al. Bacterial and *Candida albicans* adhesion on rapid prototyping-produced 3D-scaffolds manufactured as bone replacement materials // J. Biomed. Mater. Res., 2008; 87A: 933–943.
3. Alexander W. S., Hilton D. J. The role of suppressors of cytokine signaling in regulation of the immune response // An Rev Imm, 2004; 503–529.
4. Anderson J. M., Rodriguez A., Chang D. T. Foreign body reaction to biomaterials // Semin Immunol, 2008; 86–100.
5. Ando Y., Miyamoto H., Noda I., et al. A Novel antibacterial biomaterial containing silver (2) – antibacterial activities *in vitro* and *in vivo* // J Bone Joint Surg Br, 2009; 91-B(SUPP. II): 304.
6. Ando Y., Noda I., Miyamoto H., et al. The hydroxyapatite containing silver inhibits the biofilm formation in a flow condition // J Bone Joint Surg Br, 2012; 94-B (SUPP. XXV): 4.
7. Arciola C. R., Campoccia D., Gamberini S., et al. Presence of fibrinogen-binding adhesin gene in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheters-associated and orthopaedic implant-associated infections // Biomaterials 25, 2004; 4825–4829.
8. Atkins B. L., Athanasou N., Deeks J. J., et al. Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty: The OSIRIS Collaborative Study Group // J Clin Microbiol, 1998; 36: 2932–2939.
9. Aykent F., Yondem I., Ozyesil A. G., et al. Effect of different finishing techniques for restorative materials on surface roughness and bacterial adhesion // Prosthet Dent, 2010; 103: 221–227.
10. Balasubramanian D., Schneper L., Kumari H., Mathee K. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence // Nucleic Acids Res, 2013; 11–20.
11. Barken K. B., Pamp S. J., Yang L., et al. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Environmental Microbiology, 2008; 10(9): 2331–2343.
12. Belcarz A., Bienias J., Surowska B., Ginalska G. Studies of bacterial adhesion on TiN, SiO₂–TiO₂ and hydroxyapatite thin layers deposited on titanium and Ti6Al4V alloy for medical applications // Thin Solid Films 519, 2010; 797–803.
13. Belcarz A., Ginalska G., Zalewska J., et al. Covalent coating of hydroxyapatite by keratin stabilizes Gentamicin release // www.interscience.wiley.com (sk. 2.12.2015).
14. Bensch K. W., Raida M., Magert H. J., et al. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma // FEBS Lett, 1995; 368: 331–335.
15. Berzina L., Cimdinš R., Skagers A., et al. Response to the implantation of hydroxyapatite on the bone and cartilage // Medical & Biological Engineering & Computing, 1996; 34(1): 160-170.
16. Bērziņa L., Cimdinš R., Vētra J., et al. Bioceramics in the system CaO-Nb₂O₅-P₂O₅ // Proceedings of the 7th International Symposium on Ceramics in Medicine, Bioceramics, 1994; 7: 151–158.
17. Biological evaluation of medical devices: Tests for local effects after implantation http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=44789 (sk. 16.11.2015.).
18. 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): 26–29.
19. Bottner F., Wegner A., Winkelmann W. et al. Interleukin-6, procalcitonin and TNF-alpha: markers of peri-prosthetic infection following total joint replacement // J Bone Joint Surg Br, 2007; 89(1): 94–99.
20. Bridges A. W., García A. J. Anti-inflammatory polymeric coatings for implantable biomaterials and devices // J Diabetes Sci Technol, 2008; 2(6): 984–994.
21. Busscher H. J., Van der Mei H. C., Subbiahdoss G., et al. Biomaterial-associated infection: locating the finish line in the race for the surface // Sci Transl Med, 2012; 4(153): 153rv10.

22. 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.
23. Campoccia D., Montanaro L., Moriarty T. F., et al. The selection of appropriate bacterial strains in preclinical evaluation of infection-resistant biomaterials // *Int J Artif Organs*, 2008; 31(9): 841–847.
24. Capello N.C. Hydroxyapatite coating // *The Adult Hip*, 2007; 68: 1005–1013.
25. Charo I. F., Ransohoff R. M. The many roles of chemokines and chemokines receptors in inflammation // *N Engl J Med*, 2006; 354: 610–621.
26. Chen Q., Thouas G. A. Metallic implant biomaterials // *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 2015; 87: 1–57.
27. Chen W., Oh S., Ong A. P., et al. Ong antibacterial and osteogenic properties of silver-containing hydroxyapatite coatings produced using a sol gel process // www.interscience.wiley.com (sk. 14.12.2015.).
28. Cimmins R., Bossert J., Berzina L., et al. Microstructure of bioactive polylayer coating of Ti alloy // *J.Ceramica Acta*, 1998; 4(5): 157–164.
29. 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.
30. 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.
31. Costerton J. W. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections // *Science*, 1999; 284: 1318–1322.
32. Dapunt U., Lehner B., Burckhard I., et al. Evaluation of implant sonication as a diagnostic tool in implant-associated infections // *J Appl Biomater Funct Mater*, 2014; 12(3): 135–140.
33. Das K., Bose S., Bandyopadhyay A., et al. Surface coatings for improvement of bone cell materials and antimicrobial activities of Ti implants // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2008; 87(2): 455–460.
34. De Gabory L., Bareille R., Stoll D., Bordenave L., Fricain J. C. Biphasic calcium phosphate to repair nasal septum: The first *in vitro* and *in vivo* study // *Acta Biomaterialia*, 2010; 6: 909–919.
35. Dos Santos E. A., Farina M., Soares G. A., Anselme K. Chemical and topographical influence of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate surfaces on human osteoblastic cell behavior // www.interscience.wiley.com (sk. 14.11.2015.).
36. Duarte P. M., De Mendonça A. C., Máximo M. B., et al. Differential cytokine expressions affect the severity of peri-implant disease // *Clin Oral Implants Res*, 2009; 20(5): 514–520.
37. Dunne W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilm lately? // *Clin. Microbiol*, 2002; 15: 155–166.
38. 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.
39. Fu H., Rahaman M. N., Day D. E., Huang W. Long-term conversion of 45S5 bioactive glass-ceramic microspheres in aqueous phosphate solution // *J Mater Sci: Mater Med*, 2012; 23: 1181–1191.
40. Ganz T., Selsted M. E., Lehrer R. I. Defensins // *Eur J Haematol*, 1990; 44: 1–8.
41. Garcia J. R. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity // *FASEB J*, 2001; 15: 1819–1821.
42. Gollwitzer H., Dombrowski Y., Proding P. M., et al. Antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines in periprosthetic joint infection // *J Bone Joint Surg*, 2013; 95: 644–651.
43. Greco G., Shi W., Michler R. E., et al. Costs associated with health care-associated infections in cardiac surgery // *J Am Coll Cardiol*, 2015; 65(1): 15–23.
44. Gretzer C., Emanuelsson L., Liljensten E., Thomsen P. The inflammatory cell influx and cytokines changes during transition from acute inflammation to fibrous repair around implanted materials // *J Biomater Sci Polym Ed*, 2006; 17(6): 669–687.
45. 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.

46. Haenle M., Skripitz C., Mittelmeier W., Skripitz R. Economic impact of infected total knee arthroplasty // *Scientific World Journal*, 2012; 2012: 196515.
47. Harder J., Bartels J., Christophers E., Schroder J. M. A peptide antibiotic from human skin // *Nature*, 1997; 387: 861.
48. Harder J., Bartels J., Christophers E., Schroder J. M. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic // *J Biol Chem* 2001; 276: 5707–5713.
49. Harder J., Meyer-Hoffer U., Teran L. M., et al. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia // *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000; 22: 714–721.
50. Harle J., Kim H, Mordan N., et al. Initial responses of human osteoblasts to sol–gel modified titanium with hydroxyapatite and titania composition // *Acta Biomaterialia*, 2006; 2: 547–556.
51. Harmsen M., Yang L., Pamp S. J., Tolker-Nielsen T. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal // *FEMS Immunol Med Microbiol* 59, 2010; 253–268.
52. Heimann R. B., Schürmann N., Müller R. T. *In vitro* and *in vivo* performance of Ti6Al4V implants with plasma-sprayed osteoconductive hydroxylapatite-bioinert titania bond coat “duplex” systems: an experimental study in sheep // *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2004; 15: 1045–1052.
53. Hench L. Properties of biomaterials: Ceramics, glasses and glass-ceramics // *Biomaterials science* / Ed. by Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J. 2nd ed. – UK, 2004. – Pp. 128-151.
54. Hetrick E. M., Schoenfisch M. H. Reducing implant-related infections: active release strategies // *Chem. Soc. Rev.*, 2006; 35:780–789.
55. Hidron A. I., Edwards J. R., Patel J., et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the centers for disease control and prevention, 2006–2007 // *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008; 996–1011.
56. Higgins D. M., Basaraba R. J., Hohnbaum A. C., et al. Localized immunosuppressive environment in the foreign body response to implanted biomaterials // *The American Journal of Pathology*, 2009(1); 175: 161–170.
57. Hin T. S. Engineering materials for biomedical applications // *World Scientific Publishing Company: USA*, 2004: 350.
58. Huang Q., Yu H.J., Liu G.D., et al. Comparison of the effects of human β -defensin 3, vancomycin, and clindamycin on *Staphylococcus aureus* biofilm formation // *Orthopedics*, 2012; 35(1): 53–60.
59. Iwakura T., Lee S. Y., Niikura T., et al. Gentamycin-impregnated calcium phosphate cement for calcaneal osteomyelitis: a case report // *J Orthop Surg*, 2014; 22(3): 437–439.
60. Janeway C., Travers P., Walport M., Capra J. Immunobiology: The immune system in health and disease // *New York, N.Y: Garland Publishers*, 1999.
61. Johnson J. R., 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.
62. Jones L. C., Frondoza C., Hungerford D. S. Effect of PMMA particles and movement on an implant interface in a canine model // *J Bone Joint Surg*, 2001; 83(B): 448–458.
63. Kalab M., Yang A. F., Chabot D. Conventional scanning electron microscopy for bacteria // *Infocus*, 2008; 10: 44–61.
64. 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.
65. Kim E. J., Wang W., Deckwer W. D., Zeng A. P. Expression of the quorum-sensing regulatory protein LasR is strongly affected by iron and oxygen concentrations in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* irrespective of cell density // *Microbiology*, 2005; 151: 1127–1138.
66. Kim H. W., Kim H. E., Salih V., Knowles J.C. Hydroxyapatite and titania sol–gel composite coatings on titanium for hard tissue implants: Mechanical and *in vitro* biological performance // *J. Biomed. Mater. Res., Part B*, 2005; 72: 1–8.
67. Kinnari T. J., Esteban J., Martin-de-Hijas N. Z., et al. Influence of surface porosity and pH on bacterial adherence to hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate bioceramics // *Journal of Medical Microbiology*, 2009; 58: 132–137.

68. Klausen M., Aaes-Jorgensen A., Molin S., Tolker-Nielsen T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // *Mol Microbiol*, 2006; 50: 61–68.
69. Klausen M., Heydorn A., Ragas P., et al. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants // *Mol Microbiol*, 48: 1511–1524.
70. Koerner R. J., Butterworth L. A., Mayer I. V., et al. Bacterial adhesion to titanium-oxy-nitride (TiNOX) coatings with different resistivities: a novel approach for the development of biomaterials // *Biomaterials* 23, 2002; 2835–2840.
71. Kraigsley A., Ronney P. D. Hydrodynamic influences on biofilm formation and growth // <http://carambola.usc.edu/research/biophysics/Biofilms4Web.html> (sk. 14.04.2013.).
72. Kurtz S. M., Ong K. L., Lau E., et al. Prosthetic joint infection risk after TKA in the Medicare population // *Clin Orthop Relat Res*, 2010; 468: 52–56.
73. Kurtz S., Ong K., Lau E., et al. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030 // *J Bone Joint Surg Am*, 2007; 89: 780–785.
74. Lai Y., Cogen A. L., Radek K. A., et al. Activation of TLR2 by a small molecule produced by *Staphylococcus epidermidis* increases antimicrobial defense against bacterial skin infections // *J Invest Dermatol*, 2010; 130(9): 2211–2221.
75. Lee S. H., Kim H. W., Lee E. J., et al. Hydroxyapatite-TiO₂ hybrid coating on Ti implants // *J Biomater Appl*, 2006; 20: 195.
76. Lehrer R. I., Lichtenstein A. K., Ganz T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells // *Annu Rev Immunol*, 1993; 11: 105–128.
77. Lévy P. Y., Fenollar F. The role of molecular diagnostics in implant-associated bone and joint infection // *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18(12): 1168–1175.
78. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease // *Nat Rev Micro*, 2007; 48–56.
79. Lingzhou Zz, Chu P. K., Zhang Y., Wu Z. Preparation and characteristics of micro-arc oxidation film on novel Ti-3Zr-2Sn-3Mo-25Nb biomedical alloy // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2009; 470–480.
80. Llinos G., Harris R., Geoff R. *Staphylococci* and implant surfaces: a review // *Injury, Int. J. Care Injured*, 2006; 37: 3–14.
81. Lozano F. S., García-Criado F. J., Fresnadillo M. J., et al. Systemic inflammatory response induced by dacron graft and modulation by antimicrobial agents: experimental study // *J Surg Res*, 2002; 107(1): 7–13.
82. Ma L., Conover M., Lu H., et al. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix // *PLoS Pathog.*, 2009; 5(3): e1000354.
83. Mack D., Becker P, Chatterjee I., et al. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses // *International Journal of Medical Microbiology* 294, 2004; 203–212.
84. Mah T. F., Pitts B., Pellock B., et al. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance // *Nature*, 2003; 306–310.
85. McGee M. F., Schomisch S. J., Marks J. M., et al. Late phase TNF-alpha depression in natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES) peritoneoscopy // *Surgery*, 2008; 143(3): 318–328.
86. Murdoch D. R., Roberts S. A., Fowler V. G., et al. Infection of orthopedic prostheses after *Staphylococcus aureus* bacteremia // *Clin Infect Dis*, 2001; 32: 647–649.
87. Murray J., Barbara J., Dunkley S., et al. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: Requirements for TNF-R55 and TNF-R75 for induction of an apoptosis *in vitro* // *Blood*, 1990; 7: 2772–2783.
88. Narayanan R., Seshadri S. K., Kwon T. Y., Kim K. H. Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys // www.interscience.wiley.com (sk. 12.11.2015.).
89. Narumi Ueda. Sonication for diagnosis of implant-associated infections // *Bone Joint J*, 2013; 95(B): 565.
90. Noda I., Ando Y., Miyamoto H., et al. Next-generation antibacterial Ha coating development of silver-containing Ha coatings technology and its characterization // *J Bone Joint Surg Br*, 2010; 92(B): 93–94.
91. O`Gara J. P., Humphryes H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications // *J. Med. Microbiol.*, 2001; 7: 582–587.

92. O'Gara J. P., Humphryes H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications // J. Med. Microbiol., 2001; 50(7): 582–587.
93. O'Toole G. A., Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development // Mol Microbiol, 1998; 30: 295–304.
94. Ochoa I., Sanz-Herrera J. A., Garcí'a-Aznar J. M., et al. Permeability evaluation of 45S5 bioglass-based scaffolds for bone tissue engineering // J Biomech., 2009; 42(3): 257–260.
95. Ong K. L., Kurtz S. M., Lau E., et al. Prosthetic joint infection risk after total hip arthroplasty in the Medicare population // J Arthroplasty, 2009; 24(6): 105–109.
96. Osborn J. F. Implantatwerkstoff hydroxylapatitkeramik – grunlangen und linische anwendung // Berlin Quintessenz Verlag, 1985.
97. Otto M. Biofilm development in *Staphylococcus epidermidis* // http://www.nature.com/nrmicro/journal/v7/n8/fig_tab/nrmicro2182_F1.html (sk. 14.11.2014.).
98. Pamp S. J., Tolker-Nielsen T. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa* // J Bacteriol, 2007; 2531–2539.
99. Pandey R., Berendt A. R., Athanasou N. A. Histological and microbiological findings in non-infected and infected revision arthroplasty tissues: The OSIRIS Collaborative Study Group. Oxford Skeletal Infection Research and Intervention Service // Arch Orthop Trauma Surg, 2000; 120: 570–574.
100. Park J., Lakes R. S. Biomaterials: An Introduction // Springer: New York, 2007; 561.
101. Patriquin G. M., Banin E., Gilmour C., et al. Influence of quorum sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* // J Bacteriol, 2008; 190: 662–671.
102. Pavlova A., Reinis A., Berzina-Cimdina L., et al. *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* adhesion intensity on a TiO₂ ceramic in an *in vitro* study // Advanced Materials Research, 2011; 222: 301–304.
103. Peel T. N., Buising K. L., Choong P. F. M. Diagnosis and management of prosthetic joint infection // Curr Opin Infect Dis. 2012; 25(6): 670–676.
104. Peel T. N., Cheng A. C., Buising K. L., Choong P. F. The microbiological aetiology, epidemiology and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective? // Antimicrob Agents Chemother, 2012; 56: 2386–2391.
105. Perala D. G., Chapman R. J., Gelfand J. A., et al. Relative production of IL-1 beta and TNF alpha by mononuclear cells after exposure to dental implants // J Periodontol., 1992; 63(5): 426–430.
106. Pfeufer N. Y., Hofmann-Peiker K., Mühle M., et al. Bioactive coating of titanium surfaces with recombinant human β -defensin-2 (rHu β D2) may prevent bacterial colonization in orthopaedic surgery // J Bone Joint Surg Am., 2011; 93(9): 840–846.
107. Pilmane M., Berzina-Cimdina L., Skagers A., et al. Biocompatibility, reactogenicity and bioactivity after implantation of different biomaterials in experimental animals // Proceedings, 12th International Congress on Oral Cancer, 2008; 128–129.
108. Piper K. E., Jacobson M. J., Cofield R. H., et al. Microbiologic diagnosis of prosthetic shoulder infection by use of implant sonication // J Clin Microbiol, 2009; 47: 1878–1884.
109. Potvin E. Cycle de formation dy biofilm bacterien chez *P. aeruginosa* // <http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/fichiers/24237/ch01.html> (sk. 14.04.2013.).
110. Pratten J., Nazhat S. N., Blaker J. J., Boccaccini A. R. *In vitro* attachment of *Staphylococcus epidermidis* to surgical sutures with and without Ag-containing bioactive glass coating // J Biomater Appl., 2004; 19(1): 47–57.
111. Pritchard E. M., Valentin T., Panilaitis B., et al. Antibiotic-releasing silk biomaterials for infection prevention and treatment // Adv Funct Mater, 2013; 23(7): 854–861.
112. Puckett S. D., Taylor E., Raimondo T., Webster T. J. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment // Biomaterials, 2010; 31: 706–713.
113. Rahaman M. N., Day D. E., Bal B. S., et al. Bioactive glass in tissue engineering // Acta Biomater, 2011; 7: 2355–2373.
114. Ryder C., Byrd M., Wozniak D. J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development // Curr Opin Microbiol., 2007; 10(6): 644–648.
115. Salma I., Pilmane M., Skagers A., et al. Early morphofunctional response of contact tissue after intraoral implantation in rabbit jaw of pure synthetic hydroxyapatite (Hap) bioceramic materials and Hap saturated with Lidocaine // J. Stomatologija, 2009, 11(4): 113–118.

116. Salms G., Berzina L., Cimdins R. et al. Outcome of semados dental implants in one stage with sinus floor elevation by Hap granules // *Stomatologija*, 2002; 1(1): 2–7.
117. Sampedro M. F., Huddleston P. M., Piper K. E., et al. A biofilm approach to detect bacteria on removed spinal implants // *Spine*, 2010; 35(12): 1218–1224.
118. Sauer K., Camper A. K., Ehrlich G. D., et al. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm // *J Bacteriol*, 2002; 184: 1140–1154.
119. Sawamura D., Goto M., Shibaki A., et al. Beta defensin-3 engineered epidermis shows highly protective effect for bacterial infection // *Gene Therapy*, 2005; 857–861.
120. Schafer P., Fink B., Sandow D., et al. Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy // *Clin Infect Dis*, 2008; 47: 1403–1409.
121. Schneider J. J., Unholzer A., Schaller M., et al. Human defensins // *J Mol Med*, 2005; 83: 587–595.
122. Sharma G., Rao S., Bansal A., et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets // *Biologicals*, 2014; 42(1): 1–7.
123. Shindo S., Ogata K., Kubota K., et al. Vascular prosthetic implantation is associated with prolonged inflammation following aortic aneurysm surgery // *J Artif Organs*, 2003; 6(3): 173–178.
124. Shive M. S., Brodbeck W. G., Colton E., Anderson J. M. Shear stress and material surface effects on adherent human monocyte apoptosis // *J Biomed Mater Res.*, 2002; 60(1): 148–158.
125. Skagers A., Salma I., Salms G., et al. Reactogenicity of synthetic porous Hap bioceramic materials after intraosseal subperiosteal implantation in rabbits // 24th European Conference on Biomaterials, 2011; 151–155.
126. Slutski L. I., Vetra J. J. Letter to the editor: Biocompatibility and reactogenicity of materials: a semantic and logical analysis of definitions and their practical significance // *Cells Materials*, 1996; 6: 137–142.
127. Song W., Shi Y., Xiao M., et al. *In vitro* bactericidal activity of recombinant human beta-defensin-3 against pathogenic bacterial strains in human tooth root canal // *Int J Antimicrob Agents*, 2009; 33(3): 237–243.
128. Spangehl M. J., Masri B. A., O’Connell J. X., Duncan C. P. Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties // *J Bone Joint Surg Am*, 1999; 81: 672–83.
129. Standards in Biomaterials Testing // <http://www.standardsdirect.org/standards/standards2/StandardsCatalogue24> (sk. 05.05.2013.).
130. Su-Hee Lee S., Hae-Won Kim, Eun-Jung Lee, et al. Hydroxyapatite-TiO₂ Hybrid Coating on Ti Implants // *J Biomater Appl*, 2006; 20: 195.
131. Suska F., Gretzer C., Esposito M., et al. *In vivo* cytokine secretion and NF-kappaB activation around titanium and copper implants // *Biomaterials*, 2005; 26(5): 519–527.
132. Tielker D., Hacker S., Loris R., et al. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation // *Microbiology*, 2005; 151: 1313–1323.
133. Tolker-Nelsen T., Brinch U. C., Ragas P. C., et al. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. // *Biofilms. J Bacteriol*, 2000; 6482–6489.
134. Tracey K., Cerami A. Metabolic response to Cachectin/TNF // *Annals of the New York Academy of Sciences*, 325–330.
135. Tracey K., Cerami A. Tumor necrosis factor: A pleiotropic cytokine and therapeutic target // *Annual Review of Medicine*, 45: 491–503.
136. Trampuz A., Piper K. E., Jacobson M. J., et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection / *N Engl J Med*, 2007; 357: 654–663.
137. Trampuz A., Steckelberg J. M., Osmon D. et al. Advances in the laboratory diagnosis of prosthetic joint infection. *Rev Med Microbiol*, 2003; 14: 1–14.
138. Trampuz A., Zimmerli W. Diagnosis and treatment of implant-associated septic arthritis and osteomyelitis // *Curr Infect Dis Rep*, 2008; 10: 394–403.
139. Trampuz A., Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment // *Swiss Med. Wkly*. 2005; 135: 243–251.
140. Tunney M. M., Patrick S., Curran M. D., et al. Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene // *J Clin Microbiol*, 1999; 37: 3281–3290.

141. Valerio P., Guimarães M. H., Pereira M. M., et al. Primary osteoblast cell response to sol-gel derived bioactive glass foams // *J Mater Sci Mater Med.*, 2005; 16(9): 851–856.
142. Vuong C., Voyich M. J., Fischer E. R., et al. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system // *Cellular Microbiology*, 2004 6(3): 269–275.
143. Widmer A. F. New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants // *Clin Infect Dis*, 2001; 33(2): 94–106.
144. Wren A. W., Coughlan A., Hassanzadeh P., Towler M. R.. Silver coated bioactive glass particles for wound healing applications // *J Mater Sci: Mater Med.*, 2012; 23: 1331–1341.
145. Xiao X. F., Liub R. F., Zheng Y.Z. Characterization of hydroxyapatite / titania composite coatings codeposited by a hydrothermal–electrochemical method on titanium // *Surf. Coat. Technol.*, 2006; 200: 4406–4413.
146. Yang L., Barken K. B., Skindersoe M. E., et al. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa* // *Microbiology*, 2007; 153: 1318–1328.
147. Yang, Y. Z., Kim H. H., Ong J. L. Review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process – an alternative to plasma spraying // *Biomaterials*, 2005. 26(3): 327–337.
148. Yuehwei H. A., Friedman R. J. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces // *Applied Biomaterials*, 1998; 43: 338–348.
149. Yuehwei H. A., Friedman R. J. Handbook of Bacterial Adhesion. Towota: 2000. P. 11–20.
150. Zanger P., Holzer J., Schleucher R., et al. Severity of *Staphylococcus aureus* infection of the skin is associated with inducibility of human beta-defensin 3 but not human beta-defensin 2 // *Infect Immun.*, 2010; 78(7): 3112–3117.
151. Zeller V., Ghorbani A., Strady C., et al. *Propionibacterium acnes*: an agent of prosthetic joint infection and colonization // *J Infect*, 2007; 55: 119–124.
152. Zhao L., Chu P. K., Zhang Y., Wu Z. Antibacterial coatings on titanium implants // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009; 91(1): 470–480.
153. Zhou Z, Ruan J, Zou J, et al. Bioactivity of bioresorbable composite based on bioactive glass and poly-L-lactide // *Trans Nonferrous Met SOCC China* 17, 2007; 394–399.
154. Zimmerli W., Trampuz A., Ochsner P. E. Prosthetic-joint infections // *N Engl J Med*, 2004; 351: 1645–1654.
155. Берзиня Л. Я., Бука Ю. А., Ветра Я. Я., Янсон Я. А. Физико-химические превращения гидроксилатапата при термической обработке // *Неорганические стекла, покрытия и материалы*. Рига, 1989, с. 86–192.
156. Берзиня Л. Я., Керене Я. К., Ветра Я. Я., Седмалис У. Я. Морфологические изменения в имплантированной биокерамике // *Изв. АН Латв. ССР*, 1988, Т. 5, с. 99–103.
157. Берзиня Л. Я., Швинка В. Ю., Ветра Я. Я. Швинка Р. К., Эйдук Ю. Я. Кальциевофосфатные стеклокерамические материалы // *Всесоюзн. совещание “Строение, свойства и применение фосфатных, фторидных и халькогенидных стекол”*, Рига, 1985, ч. 2., с. 69–70.
158. Слуцкий Л., Ветра Я. Биологические вопросы биоматериаловедения. – Рига: Латвийская Медицинская академия, 2001, с. 25–43.

PATEICĪBAS

No sirds pateicos mana zinātniskā darba vadītājiem – profesorei Jutai Kroičai un profesoram Jānim Vētram, zinātniskajai konsultantei profesorei Mārai Pilmanei un profesoram Andrejam Skaģeram.

Neatsveramu praktisku atbalstu sniedza RSU Bioloģijas un mikrobioloģijas katedras kolektīvs, īpaši docente Valentīna Kuzņecova un asistents Ingus Skadiņš.

Neizsakāma pateicība par pacietību RSU zinātņu prorektorei profesorei Ivetai Ozolantai un zinātniskajai sekretārei Ingrīdai Kreilei.