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 darba kopsavilkums
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai
Specialitāte – medicīnas mikrobioloģija

Rīga, 2016

RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

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 darba kopsavilkums
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – medicīnas mikrobioloģija

Rīga, 2016

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

Darba zinātniskie vadītāji:

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

Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. profesore **Juta Kroiča**,

RSU Bioloģijas un mikrobioloģijas katedra, Latvija

Oficiālie recenzenti:

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

Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. habil. biol. profesors **Aleksandrs Rapoports**,

Latvijas Universitāte

Dr. habil. sc. eng. profesors **Gundars Mežinskis**,

Rīgas Tehniskā universitāte, Latvija

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2016. gada 7. novembrī plkst. 12.00 Rīgas Stradiņa universitātes Medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU mājas lapā: www.rsu.lv

Promocijas padomes sekretāre:

Dr. med. asociētā profesore **Angelika Krūmiņa**

SATURS

Darbā lietotie saīsinājumi.....	4
IEVADS.....	5
1. MATERIĀLS UN METODES.....	7
1.1. Pētījumā izmantotie biomateriāli.....	7
1.2. Pētījumā izmantotie mikroorganismi.....	11
1.3. Mikroorganismu adhēzijas noteikšana <i>in vitro</i>	11
1.4. Mikroorganismu kolonizācijas noteikšana <i>in vitro</i>	12
1.5. Mikroorganismu kolonizācijas noteikšana <i>in vivo</i>	13
1.6. Iekaisuma citokīnu ekspresijas noteikšana <i>in vivo</i>	13
1.7. Statistikas metodes.....	14
2. REZULTĀTI.....	15
2.1. Stikla keramikas biomateriāli – <i>in vitro</i> un <i>in vivo</i> izpēte.....	15
2.1.1. Baktēriju adhēzija <i>in vitro</i> uz stikla keramikas biomateriālu paraugiem.....	15
2.1.2. Baktēriju kolonizācija <i>in vitro</i> uz stikla keramikas biomateriālu paraugiem.....	18
2.1.3. Stikla keramikas biomateriālu izmeklēšanas rezultāti ar skenējošo elektronmikroskopiju.....	21
2.1.4. Stikla keramikas biomateriālu kolonizācija <i>in vivo</i>	25
2.1.5. Stikla keramikas biomateriālu imūnhistoķīmisko pētījumu atrade.....	28
2.2. Baktēriju adhēzijas un kolonizācijas izvērtēšana uz TiO ₂ /HAp kompozītmateriāliem.....	30
2.3. Baktēriju adhēzijas un kolonizācijas intensitāte <i>in vitro</i> sintētisko kalcijs fosfātu biomateriālu virsmā.....	37
2.4. Baktēriju adhēzijas un kolonizācijas intensitāte <i>in vitro</i> hidroksiapatītu un sudrabu (HAp un Ag) saturošo biomateriālu virsmā.....	40
3. DISKUSIJA.....	42
4. SECINĀJUMI.....	54
5. PRAKTISKĀS REKOMENDĀCIJAS.....	56
6. AR PĒTĪJUMU SAISTĪTĀS PUBLIKĀCIJAS.....	57
7. LITERATŪRAS SARAKSTS.....	65
PATEICĪBAS.....	73

DARBĀ LIETOTIE 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

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 oriģinālus biomateriālus. Implantācijā izmantojamiem biomateriāliem piemīt reaktogenitāte – spēja izraisīt dažādas intensitātes makroorganisma atbildes reakciju (*Слуцкий Л., Бемпа 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., Бемпа Я., 2001*). Reaktogenitāti var koriģēt daudzi faktori, piemēram, biomateriāla struktūra, makroorganisma īpašības, kā arī “trešais” spēks – mikroorganismi.

Daudziem mikroorganismiem, bieži normālās floras pārstāvjiem, piemīt afinitāte pret organismā implantētiem mākslīgiem objektiem. Kā piemērus var minēt ādas mikrofloras stafilokokus, *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, minētās baktērijas ir vienas no nozīmīgākajiem ar implantiem un biomateriāliem saistīto infekciju ierosinātājiem. Šo baktēriju spēja veidot biofilmu, kas koloniju pasargās no organisma nespecifiskās rezistences mehānismiem, kā arī dažādie rezistences mehānismi pret antibiotiskajām vielām, var vēl vairāk apgrūtināt infekcijas ārstēšanas procesu.

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.

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

Lai pētījumu veiktu, tika uzstādīti sekojoši **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.

Darba hipotēzes:

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

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 to spēja piesaistīt baktērijas, kā arī bakteriālās kolonizācijas intensitāte un tās ietekme uz iekaisuma mediatoru ekspresiju audos. Virsmas īpašības mērķtiecīgi mainītas, lai samazinātu baktēriju adhēzijas un kolonizācijas intensitāti, un baktēriju kolonizācijas ietekmi uz iekaisuma mediatoru ekspresiju audos.

Darbā izpētīti 32 oriģināli sintezētu ar atšķirīgu virsmas struktūru biomateriāli, mikroorganismu adhēzijas un kolonizācijas īpašības un to ietekme uz iekaisuma un antimikrobo peptīdu ekspresiju audos *in vivo* pētījumos. *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 tika uzsākti pētījumi, kā mikroorganismi varētu ietekmēt citokīnu ekspresiju audos ap implantēto biomateriāla paraugu, kas bijis kontaminēts ar mikroorganismiem.

Promocijas darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu valodā. Tam ir klasiska struktūra un tas sastāv no 9 daļām: ievads, literatūras apskats, materiāli un metodes, rezultāti, diskusija, secinājumi, praktiskās rekomendācijas, ar pētījumu saistīto publikāciju saraksts un literatūras saraksts. Promocijas darba apjoms ietver 107 lapaspuses, tai skaitā, 48 attēli, 13 tabulas. Literatūras saraksts sastāv no 158 avotiem.

1. MATERIĀLS UN METODES

1.1. Pētījumā izmantotie biomateriāli

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. Stikla keramika tika izgatavota klasiskā divpakāpju procesā: vispirms iegūstot stikla pulveri, tad to presējot formā un, veicot termisko apstrādi, tas tika salipināts un kristalizēts.

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 30 sek. ar H_2O_2 , HF un HNO_3 maisījumu.

Pētījumā iekļāvām analīzei izmantojām 8 oriģināli sintezētus biomateriālus:

A – izejviela un produkts ir kristāliski, maksimālā apdedzināšanas temperatūra – 1005 °C 30 min.

B – izejviela amorfa, produkts kristālisks, 760 °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 °C 30 min.

D – izejviela amorfa, produkts daļēji kristālisks, apstrādāts 760 °C 60 min.

D+ – D kodināts (30 h, H_2O_2 , HF, HNO_3), apstrādāts 760 °C 60 min., uz virsmas mazāk šķīstošās amorfās fāzes.

E – izejviela amorfa, produkts amorfs, apstrādāts 700 °C 30 min.

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

Kompozītmateriāli HAp/ TiO_2

Pēdējo desmit gadu laikā plaši izmanto metālisko implantu pārklāšanu ar bioaktīvo HAp/ TiO_2 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 implantanti, kuri ir bioinerti materiāli. HAp/ TiO_2 kompozītceramikas pārklājums uzrāda lielāku sasaistes stiprību ar metālu, salīdzinot ar tīru HAp. Palielinot TiO_2 daudzumu kompozītā, palielinās arī stiprība, turklāt TiO_2 piedeva var samazināt baktēriju piesaistīšanos pie biomateriāla, tādējādi samazinot iespējamo implanta infekcijas risku, tomēr infekcijas risks ap TiO_2 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 TiO_2 proporciju un saķepināšanas temperatūru – 1000 °C un 1200 °C:

1. 100% HAp – apdedzināts 1000 °C
2. 50% HAp un 50% TiO_2 – apdedzināts 1000 °C
3. 80% HAp un 20% TiO_2 – apdedzināts 1000 °C
4. 100% TiO_2 – apdedzināts 1000 °C
5. 20% HAp un 80% TiO_2 – apdedzināts 1000 °C
6. 100% TiO_2 – apdedzināts 1200 °C
7. 20% HAp un 80% TiO_2 – apdedzināts 1200 °C
8. 80% HAp un 20% TiO_2 – apdedzināts 1200 °C
9. 50% HAp un 50% TiO_2 – apdedzināts 1200 °C
10. 100% HAp – apdedzināts 1200 °C

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 -trikalcijfosfāta (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 attiecības, 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 1,5–1,67, paraugi tika sintezēti ar slapjo precipitācijas metodi. Sausais precipitāts tika noslīpēts, lai iegūtu smalku pulveri. Bifāziskās keramikas kompozīts tika iegūts izmantojot 2 metodes:

A metode – kalcija deficīta apatītu kalcinēšana un saķepināšana (*sintering*);

B metode – kalcinēšana un saķepināšana no mehāniski samaisītiem apatītiem ar Ca/P attiecību koeficientu no 1.5–1.67.

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.

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*), dejonizēts ūdens, kas tika izmantots visiem eksperimentiem.

Ca(OH)₂ tika pagatavots, slīpējot CaO 200 ml ūdens. Nepieciešamo AgNO₃ daudzumu izšķīdināja ūdenī un pievienoja kalcija hidroksīda suspensijai un uzkaršēja līdz 90 °C, nepārtraukti maisot. Fosforskābe tika pievienota pa pilnienam. Visa sintēze tika veikta [Ca+Ag]=0,25 mol apjomā un ar noteiktu atomu attiecību (Ca+Ag)/P – 1,67. Sudraba nitrāts tika pievienots attiecīgā apmērā un ar attiecīgu atomu attiecību – Ag/(Ag+Ca) = 0 (HAp); 0,002 (HAp/Ag1) un 0,012 (HAp/Ag2). Materiāla suspensija tika noturēta 15 h. Filtrēta un žāvēta pie 100 °C. 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 temperatūrās.

1.2. 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 izdale baktēriju kolonijas virsmā, kā rezultātā veidojas biofilmas.

1.3. Mikroorganismu adhēzijas noteikšana *in vitro*

No baktēriju tīrkultūrām tika gatavotas baktēriju suspensijas 1 ml TSB (*Triptycase soy broth*, *Oxoid*, UK) tilpumā ar koncentrāciju 10, 10² un 10³ 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 apgriezienos *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*).

1.4. Mikroorganismu kolonizācijas noteikšana *in vitro*

No pētījumā izmantotajām baktēriju tīrkultūrām gatavoja baktēriju suspensijas 1 ml TSB tilpumā ar koncentrāciju 10^2 un 10^3 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. 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 mm^2 biomateriāla parauga virsmas atbilstīgi literatūrā plaši aprakstītai metodikai (*Renz et al., 2015; Gregory et al., 2014; Schafer et al., 2008; Trampuz, Piper, 2007*).

1.5. Mikroorganismu kolonizācijas noteikšana *in vivo*

No pētījumā izmantotajām baktēriju tīrkultūrām gatavoja baktēriju suspensijas 1 ml TSB tilpumā ar koncentrāciju 10^2 un 10^3 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. 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).

1.6. 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.

1.7. Statistikas metodes

Statistisko rezultātu apstrādei un rezultātu iegūšanai tikai izmantota 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 $p < 0,05$.

2. REZULTĀTI

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

Pētījumā izvērtējām 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 10³ KVV/ml baktēriju koncentrācijā, bet kolonizācija – 48–72 h / 37 °C 10³ KVV/ml baktēriju koncentrācijā.

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

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 ± SD 0,003 KVV/mm², maksimālā – 0,055 KVV/mm², minimālā – 0,046 KVV/mm², *P. aeruginosa* vidējā adhēzijas intensitāte bija 0,048 ± SD 0,0029 KVV/mm², maksimālā – 0,052 KVV/mm² un minimālā – 0,044 KVV/mm² (1. tabula).

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 ± 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 (2.1. tabula).

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 $0,004 \pm \text{SD } 0,0003$ KVV/mm², maksimālā – 0,0055 KVV /mm² un minimālā – 0,0045 KVV/mm².

Rezultāti arī parādīja, ka kodināšana var padarīt biomateriāla virsmu “draudzīgāku” pseidomonām, jo uz B+ biomateriāla *P. aeruginosa* vidējā adhēzijas intensitāte bija $0,016 \pm \text{SD } 0,004$ KVV /mm², kas ir par pusi vairāk, nekā salīdzinot ar nekodināto biomateriāla versiju. Maksimālā adhēzijas intensitāte bija 0,02 KVV /mm² un minimālā – 0,01 KVV /mm² (2.1. tabula).

Pētījumā konstatējām, ka *S. epidermidis* uzrāda vidēju adhēzijas intensitāti uz C biomateriāla virsmas, kas bija $0,026 \pm \text{SD } 0,0007$ KVV /mm², un tā ir par pusi mazāka nekā *P. aeruginosa* vidējā adhēzijas intensitāte – $0,05 \pm \text{SD } 0,0021$ KVV /mm². Maksimālā *S. epidermidis* adhēzijas intensitāte uz C biomateriāla bija 0,027 KVV /mm², minimālā – 0,025 KVV /mm². Maksimālā *P. aeruginosa* adhēzijas intensitāte uz C biomateriāla bija 0,053 KVV /mm² un minimālā – 0,047 KVV /mm².

Iegūtie rezultāti varētu liecināt, ka C biomateriāla pagatavošanas tehnoloģija nesamazina baktēriju adhēzijas intensitāti uz biomateriālu virsmas (2.1. tabula).

Arī biomateriāla D paraugi uzrādīja zemu spēju piesaistīt abas pētāmās baktērijas. *S. epidermidis* vidējā adhēzijas intensitāte uz D biomateriāla virsmas bija $0,01 \pm \text{SD } 0,0022$ KVV /mm², maksimālā – 0,014 KVV /mm² un minimālā – 0,008 KVV /mm². *P. aeruginosa* vidējā adhēzijas intensitāte uz D biomateriāla virsmas bija $0,026 \pm \text{SD } 0,0037$ KVV /mm², maksimālā – 0,03 KVV /mm² un minimālā – 0,02 KVV /mm² (2.1. tabula).

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 – $0,048 \text{ KVV/mm}^2$ (2.1. tabula).

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 – $0,030$ (2.1. tabula).

***S. epidermidis* un *P. aeruginosa* adhēzijas intensitāte (KVV/mm²) 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 ± 0,003	0,005 ± 0,0003	0,004 ± 0,0003	0,026 ± 0,0007	0,01 ± 0,0022	0,048 ± 0,0021	0,005 ± 0,0004	0,01 ± 0,001
<i>P.aeruginosa</i>	0,048 ± 0,0029	0,005 ± 0,0003	0,016 ± 0,004	0,05 ± 0,0021	0,026 ± 0,0037	0,05 ± 0,001	0,01 ± 0,001	0,032 ± 0,002

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

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 $186 \pm \text{SD } 3,67 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā – 190 KVV/mm^2 un minimālā 180 KVV/mm^2 . Savukārt pēc 72 h kultivēšanas *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte bija $1255 \pm \text{SD } 22,9 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā – 1290 KVV/mm^2 un minimālā – 1230 KVV/mm^2 .

P. aeruginosa vidējā kolonizācijas intensitāte uz A biomateriāla pēc 48 h kultivēšanas sasniedza $394 \pm \text{SD } 3,67 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā kolonizācijas intensitāte bija 400 KVV/mm^2 un minimālā – 390 KVV/mm^2 . Pēc 72 h kultivēšanas *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte pieauga līdz $2926 \pm \text{SD } 9,9 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā kolonizācijas intensitāte bija 2936 KVV/mm^2 un minimālā – 2916 KVV/mm^2 (2.2. un 2.3. tabula).

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.

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 (2.2. un 2.3. tabula).

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/mm^2 un minimālā – 395 KVV/mm^2 . Pēc 72 h kultivēšanas *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte sasniedza pat $3340 \pm \text{SD } 7,9 \text{ KVV/mm}^2$. Maksimālā kolonizācijas intensitāte bija 3350 KVV/mm^2 un minimālā – 3330 KVV/mm^2 (2.2. un 2.3. tabula).

Uz D un D+ biomateriāliem tika novērota zema kolonizācijas intensitāte. *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte pēc 48 h kultivēšanas bija tikai $79 \pm \text{SD } 2,9 \text{ KVV/mm}^2$ (D biomateriāls) un $96 \pm \text{SD } 2,5 \text{ KVV/mm}^2$ (D+ biomateriāls), bet pēc 72 h kultivēšanas *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte palielinājās līdz $835 \pm \text{SD } 3,9 \text{ KVV/mm}^2$ (D biomateriāls) un $607 \pm \text{SD } 2,5 \text{ KVV/mm}^2$ (D+ biomateriāls).

P. aeruginosa vidējā kolonizācijas intensitāte pēc 48 h kultivēšanas bija nedaudz lielāka – $106 \pm \text{SD } 1,7 \text{ KVV/mm}^2$ (D biomateriāls) un $122 \pm \text{SD } 1,8 \text{ KVV/mm}^2$ (D+ biomateriāls), bet pēc 72 h kultivēšanas *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte uz D un D+ biomateriāla pieauga stipri vairāk par stafilokokiem – attiecīgi $1670 \pm \text{SD } 7,9 \text{ KVV/mm}^2$ un $1255 \pm \text{SD } 7,0 \text{ KVV/mm}^2$ (2.2. un 2.3. tabula).

Uz E un E+ biomateriāliem pēc 48 h kultivēšanas *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte bija samērā zema, salīdzinot ar citiem biomateriāliem – $53 \pm \text{SD } 3,6 \text{ KVV/mm}^2$ (E biomateriāls) un $117 \pm \text{SD } 2,5 \text{ KVV/mm}^2$ (E+ biomateriāls), bet pēc 72 h kultivēšanas *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte uz E un E+ biomateriāla bija attiecīgi $422 \pm \text{SD } 4 \text{ KVV/mm}^2$ un $1265 \pm \text{SD } 7,6 \text{ KVV/mm}^2$.

Uz E un E+ biomateriāliem pēc 48 h kultivēšanas *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte nebija augsta – tikai $80 \pm \text{SD } 1,6 \text{ KVV/mm}^2$ (E biomateriāls) un $186 \pm \text{SD } 2,7 \text{ KVV/mm}^2$ (E+ biomateriāls), bet pēc 72 h

kultivēšanas *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte uz E un E+ biomateriāla bija attiecīgi $835 \pm \text{SD}14 \text{ KVV/mm}^2$ un $2505 \pm \text{SD}7,9 \text{ KVV/mm}^2$ (2.2. un 2.3. tabula).

2.2. tabula

***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

2.3. tabula

***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

2.1.3. 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 caurviļošiem 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* uzradīja tendenci labāk kolonizēt kristāliskos un kodinātos biomateriālus. Savukārt *P. aeruginosa* kolonizācija atšķirībā no *S. epidermidis* kolonizācijas notika, veidojot retas un kompakas 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 (2.1., 2.2., 2.3. un 2.4. attēls) kā kristāliskā B biomateriāla gadījumā (2.5. un 2.6. 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 2.5. un 2.6. 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 2.1., 2.2., 2.5. un 2.6. 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 (2.1. attēls), bet pēc 72 stundām biomateriāla virsmu jau sedza pilnīgi kompakta, ar glikokaliksu noklāta biofilma (2.2. attēls).

Raksturīga amorfa virsma ir D biomateriālam (2.7. attēls), uz kura stafilokoks izteiktākas kolonijas veido tikai vēlākās kolonizācijas stadijās – pēc 72 stundām (2.8. attēls), kad *S. epidermidis* koloniju pārklāj glikokaliksa slānis. Savukārt uz šī paša D biomateriāla novērojām gandrīz pilnīgu virsmas kolonizāciju ar *P. aeruginosa* (2.3. un 2.4. 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 (2.9. attēls) virsmas atšķirības, salīdzinot ar

nekodināto B biomateriālu (2.1. attēls). Tāpat labi saskatāmas arī biomateriāla D+ kodinātā biomateriāla virsmas (2.10. attēls) atšķirības, salīdzinot ar D biomateriāla virsmu (2.7. 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.1.4. 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 (2.4. 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* (2.5. 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 intensitāti 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 biomateriālam B+, 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 10³ KVV/ml koncentrācijā uzrādīja biomateriāls B+ 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 (2.4. tabula), redzams, ka *S.epidermidis* kolonizē A, B un B+ biomateriālu paraugus *in vivo* vidē tikai 10³ KVV/ml koncentrācijā. Visos trijos gadījumos kolonizācijas intensitāte bija līdzīga. Uz A biomateriāla kolonizācijas intensitāte bija 0,015 $\pm$ SD 0,001 KVV/mm² ($p < 0,001$), maksimālā kolonizācijas intensitāte – 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 kolonizācijas intensitāte – 0,017 KVV/mm² un minimālā – 0,012 KVV/mm². Tieši tāpat bija uz B+ biomateriāla – kolonizācijas intensitāte bija 0,015 $\pm$ SD 0,002 KVV/mm² ($p < 0,001$), maksimālā kolonizācijas intensitāte – 0,017 KVV/mm² un minimālā 0,013 KVV/mm².

Pēc 3 mēnešu *P. aeruginosa* uzsējuma tikai uz 10³ KVV/ml koncentrācijā eksponētā A biomateriāla tika novērota kolonizācija (2.5. tabula); kolonizācijas intensitāte bija 0,11 $\pm$ SD 0,02 KVV/mm² ($p = 0,02$), maksimālā kolonizācijas intensitāte – 0,13 KVV/mm² un minimālā kolonizācijas intensitāte – 0,08 KVV/mm².

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.

2.4. tabula

***S. epidermidis* kolonizācijas intensitāte (KVV/mm²) 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 ± 0,0004	0,015 ± 0,001
B – 10 ² KVV/ml	negatīvs	0,005 ± 0,0003	negatīvs
B – 10 ³ KVV/ml	negatīvs	0,005 ± 0,00029	0,015 ± 0,002
B+ – 10 ² KVV/ml	0,01 ± 0,0001	0,005 ± 0,0003	negatīvs
B+ – 10 ³ KVV/ml	0,01 ± 0,0001	0,005 ± 0,0004	0,005 ± 0,0003

* Uzskatīts par negatīvu.

2.5. tabula

***P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte (KVV/mm²) 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 ± 0,008	2,23 ± 0,02	negatīvs
A – 10 ³ KVV/ml	1,65 ± 0,01	2,34 ± 0,008	0,11 ± 0,02
B – 10 ² KVV/ml	0,21 ± 0,01	0,9 ± 0,14	negatīvs*
B – 10 ³ KVV/ml	1,8 ± 0,05	3,13 ± 0,014	negatīvs
B+ – 10 ² KVV/ml	8,01 ± 0,008	0,42 ± 0,01	negatīvs
B+ – 10 ³ KVV/ml	8,7 ± 0,11	2,18 ± 0,008	negatīvs

* Uzskatīts par negatīvu.

2.1.5. Stikla keramikas biomateriālu imūnhistoķīmisko pētījumu atrade

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.

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.

Audu paraugos ap A biomateriālu, 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.

Audu paraugos ap A biomateriālu, kontaminētu ar *P. aeruginosa* 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.

2.2. Baktēriju adhēzijas un kolonizācijas izvērtēšana uz titāna dioksīda un hidroksilapatīta (TiO₂/HAp) kompozītmateriāliem

Adhēzijas izvērtējums

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 / 2 h / 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.

10^2 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 $0,009 \pm \text{SD } 0,0008 \text{ KVV/mm}^2$.

Mazāka adhēzija bija uz biomateriāliem, kuri tika apdedzināti

1200 °C:

- 6. biomateriālam (100% TiO₂), adhēzijas intensitāte $0,018 \pm \text{SD } 0,0008 \text{ KVV/mm}^2$;
- 7. biomateriālam, kas saturēja mazāku Hap un lielāku TiO₂ daudzumu, adhēzijas intensitāte $0,07 \pm \text{SD } 0,008 \text{ KVV/mm}^2$;
- 8. biomateriālam (prevalēja HAp), adhēzijas intensitāte $0,13 \pm \text{SD } 0,008 \text{ KVV/mm}^2$.

10³ KVV/ml / 2h / 37 °C ekspozīcijā vislielāko adhēzijas intensitāti novēro uz:

- 3. biomateriāla (apdedzināšanas temperatūra 1000 °C) virsmas, adhēzijas intensitāte $0,093 \pm \text{SD } 0,01 \text{ KVV/mm}^2$;
- 10. biomateriāla (apdedzināšanas temperatūra 1200 °C un sastāv no 100% Hap) virsmas, adhēzijas intensitāte $0,009 \pm \text{SD } 0,01 \text{ KVV/mm}^2$ (6. tabula).

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 $0,003 \pm \text{SD } 0,007 \text{ KVV/mm}^2$ un uz 4. biomateriāla (apdedzināšanas temperatūra 1000 °C, sastāv no TiO₂) virsmas ar adhēzijas intensitāti $0,001 \pm \text{SD } 0,00001 \text{ KVV/mm}^2$. 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 $0,08 \pm \text{SD } 0,0009 \text{ KVV/mm}^2$, uz 2. biomateriāla virsmas ar adhēzijas intensitāti $0,009 \pm \text{SD } 0,008 \text{ KVV/mm}^2$, uz 4. biomateriāla virsmas ar adhēzijas intensitāti $0,0013 \pm \text{SD } 0,0008 \text{ KVV/mm}^2$.

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. bio-materiāls 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 (2.6. tabula).

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*.

2.6. tabula

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

Pārbaugs	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* ± 0,0008	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

tabulas nobeigums						
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.

Kolonizācijas izvērtējums

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 $1,6 \pm \text{SD } 0,1 \text{ KVV/mm}^2$, savukārt *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte bija $627 \pm 2,44 \text{ KVV/mm}^2$. *S. epidermidis* maksimālā intensitāte sasniedza $1,7 \text{ KVV/mm}^2$ un minimālā intensitāte bija $1,4 \text{ KVV/mm}^2$. *P. aeruginosa* maksimālā intensitāte bija 630 KVV/mm^2 un minimālā kolonizācijas intensitāte bija 624 KVV/mm^2 .

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 virsma 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 $2168 \pm \text{SD } 21,1 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā – 2198 KVV/mm² un minimālā – 2148 KVV/mm². Savukārt uz 2. biomateriāla *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte bija mazāka nekā *S. epidermidis* – $487 \pm \text{SD } 16,3 \text{ KVV/mm}^2$, 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 $61 \pm \text{SD } 2,94 \text{ KVV/mm}^2$. 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 – $10109 \pm \text{SD } 14,14 \text{ KVV/mm}^2$, 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 $13223 \pm \text{SD } 23 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā – 13252 KVV/mm² un minimālā – 13196 KVV/mm². Savukārt uz 4. biomateriāla saglabājas zema *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte – $356 \pm \text{SD } 2,7 \text{ KVV/mm}^2$, 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 $13607 \pm \text{SD } 6,4 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā – 13613 KVV/mm² un minimālā – 13598 KVV/mm². *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte uz 5. biomateriāla ir zema – $270 \pm \text{SD } 4,96 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā bija 275 KVV/mm² un minimālā – 264 KVV/mm².

Uz 6. biomateriāla (100% TiO₂ – apdedzināts 1200 °C) *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte bija $3591 \pm \text{SD } 18,2 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā – 3611 KVV/mm² un minimālā – 3571 KVV/mm², bet *P. aeruginosa* vidējā

kolonizācijas intensitāte bija $1044 \pm \text{SD } 9,27 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā – 1052 KVV/mm^2 un minimālā – 1031 KVV/mm^2 .

Augstākā *P. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte tiek novērota uz 7. biomateriāla (20% HAp un 80% TiO_2 – apdedzināts 1200°C) – vidēji $1266 \pm \text{SD } 7,4 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā kolonizācijas intensitāte bija 1276 KVV/mm^2 un minimālā – 1258 KVV/mm^2 . Uz šī biomateriāla *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte bija $4459 \pm \text{SD } 18,1 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā – 4480 KVV/mm^2 un minimālā – 4436 KVV/mm^2 .

Uz 8. biomateriāla, kas pārsvarā sastāvēja no HAp un bija apdedzināts 1200°C , *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte bija $5839 \pm \text{SD } 9,7 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā intensitāte bija 5847 KVV/mm^2 un minimālā – 5826 KVV/mm^2 . *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte bija $476 \pm \text{SD } 8,6 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā – 487 KVV/mm^2 un minimālā – 466 KVV/mm^2 .

Uz 9. biomateriāla, kur HAp un TiO_2 bija vienādā daudzumā un kurš bija apdedzināts 1200°C , *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte bija $5362 \pm \text{SD } 19,4 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā – 5383 KVV/mm^2 un minimālā – 5345 KVV/mm^2 . *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte bija $780 \pm \text{SD } 11,9 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā – 794 KVV/mm^2 un minimālā – 465 KVV/mm^2 .

Augstāka *S. epidermidis* vidējā kolonizācijas intensitāte tika novērota uz 10. biomateriāla (100% HAp – apdedzināts 1200°C) – $18652 \pm \text{SD } 42 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā kolonizācijas intensitāte bija 18701 KVV/mm^2 un minimālā – 18598 KVV/mm^2 . Savukārt *P. aeruginosa* vidējā kolonizācijas intensitāte uz 10. biomateriāla arī bija visaugstākā – $1677 \pm \text{SD } 2,44 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā kolonizācijas intensitāte bija 1680 KVV/mm^2 un minimālā – 1675 KVV/mm^2 (2.11. attēls).

2.11. 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)

TiO₂/HAp kompozītmateriālu izmeklēšanas rezultāti ar skenējošo elektronmikroskopiju

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 izklaidus koloniju veidā. Novērojām minimālu glikokaliksa veidošanos, kas vairāk saturēja kopā baktēriju šūnas, nevis pārklāja koloniju, kā tas bija stikla keramikas materiālu gadījumā.

Retas *S. epidermidis* veidotas kolonijas tika novērotas uz 100% TiO₂ saturoša biomateriāla, kas bija apdedzināts 1200 °C temperatūrā. 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 izklaidus baktēriju slānīša veidā. Atsevišķos gadījumos varēja novērt glikokaliksu, kas veido matriksu un sasaista baktērijas kolonijā. 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 patogēnēzes mehānisms.

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

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).

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.

10² 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 ± 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 10² 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 ± 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 trikalcijfosfāta piedevu gan *S. epidermidis*, gan

P. aeruginosa piesaistās un to virsmu kolonizē vairāk. Savukārt pagatavošanas tehnoloģija lielu ietekmi uz adhēziju neatstāj.

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 $120 \pm \text{SD } 1,9$ 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) – $48 \pm \text{SD } 3,5$ 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 ($p > 0,05$).

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

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 tīriem 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 tīriem HAp biomateriāliem – bez Ag. Augstāka adhēzijas intensitāte

no šiem paraugiem bija uz 1. biomateriāla (HAp 1000 °C) – $0,0190 \pm \text{SD } 0,0050 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā intensitāte bija $0,022 \text{ KVV/mm}^2$ un minimālā intensitāte – $0,017 \text{ KVV/mm}^2$. 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 $0,0120 \pm \text{SD } 0,0008 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā adhēzijas intensitāte – $0,0013 \text{ KVV/mm}^2$ un minimālā intensitāte – $0,0011 \text{ KVV/mm}^2$. Uz 3. biomateriāla (HAp/Ag2 1150 °C) adhēzijas intensitāte bija par pusi mazāka – $0,0060 \pm \text{SD } 0,0002 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā intensitāte – $0,007 \text{ KVV/mm}^2$ un minimālā – $0,005 \text{ KVV/mm}^2$.

S. epidermidis adhēziju $10^3 \text{ KVV/ml/2h/37}^\circ\text{C}$ ekspozīcijā novēroja uz visiem biomateriālu paraugiem. Vislielāko adhēzijas intensitāti novēroja uz 1. biomateriāla (HAp 1000 °C): adhēzijas intensitāte bija $0,0910 \pm \text{SD } 0,0026 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā intensitāte – $0,094 \text{ KVV/mm}^2$ un minimālā intensitāte – $0,089 \text{ KVV/mm}^2$. Savukārt vismazāko *S. epidermidis* adhēzijas intensitāti novēroja uz 6. biomateriāla (HAp/Ag2 1150 °C): adhēzijas intensitāte bija $0,0050 \pm \text{SD } 0,0002 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā intensitāte – $0,006 \text{ KVV/mm}^2$ un minimālā intensitāte – $0,004 \text{ KVV/mm}^2$.

Savukārt *P. aeruginosa* adhēzijas intensitāte $10^3 \text{ KVV/ml/2h/37}^\circ\text{C}$ 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 $10^3 \text{ KVV/ml/2h/37}^\circ\text{C}$ ekspozīcijā notika uz 1. biomateriāla (HAp 1000 °C): adhēzijas intensitāte bija $0,3760 \pm \text{SD } 0,0350 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā intensitāte bija $0,38 \text{ KVV/mm}^2$ un minimālā intensitāte – $0,37 \text{ KVV/mm}^2$. Zemākā *P. aeruginosa* adhēzijas intensitāte bija uz 4. biomateriāla (HAp 1150 °C): adhēzijas intensitāte bija $0,0700 \pm \text{SD } 0,0050 \text{ KVV/mm}^2$, maksimālā intensitāte – $0,08 \text{ KVV/mm}^2$ un minimālā intensitāte –

0,065 KVV/mm².

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 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.

Pētot kolonizācijas intensitāti uz HAp un Ag saturošiem biomateriāliem, konstatējām, ka visvājāk šo biomateriālu paraugu virsma tiek kolonizēta gadījumos, kad saķepināšanas temperatūra bija 1150 °C. Arī uz Ag nesaturošo HAp biomateriālu virsmas, kuru sinterēšanas 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 glikokalikss. 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.

3. DISKUSIJA

Implantācijā izmantojamiem biomateriāliem piemīt reaktogenitāte – spēja izraisīt dažādas intensitātes makroorganisma atbildes reakciju (*Skagers, 2011; Слычков, Bempa, 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; Слычков, Bempa, 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 patoģenētisko 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 – metālbomateriālu, 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 bieža 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* patogēnētisko 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, hospitālos 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). Pacienti 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 fibrozes slimniekiem, uz

kontaminētiem katetriem, kontaktlēcām. Līdzīgi kā stafilokoku gadījumā, arī peidomonas labvēlīgos apstākļos var veidot daudzslāņu, biezas, sēnes atgādinošas 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 uzņēmumu 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 glikokalikss sastāda ~ 85–90%. Glikokalikss sastāv galvenokārt no baktēriju producētajiem eksopolisaharīdiem, kā arī nukleīnskābēm, minerālvielām un proteīniem. Glikokalikss 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 labi 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 2.5. un 2.6. 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 2.5. un 2.6. 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 2.7. attēlā, kur parādīts D biomateriāls, uz kura stafilokoks izteiktākas kolonijas veido tikai vēlākās kolonizācijas stadijas – pēc 72 stundām, kā to var redzēt 2.8. attēlā. Savukārt 2.3. un 2.4. 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. 2.9. attēlā labi redzamas B+ kodinātā biomateriāla virsmas atšķirības, salīdzinot ar 2.5. attēlā redzamo nekodināto B biomateriālu. Tāpat arī var redzēt 2.7. attēlā amorfā D biomateriāla virsmas izmaiņas, salīdzinot ar 2.10. 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 eksperimentā 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 izdalī (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 (Yuehwei, 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 (Yuehwei, 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 saņemti 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 šķidruma 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 fosfāta 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.

4. 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 kontami-nācijas 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.

5. 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.

6. 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., Vētra 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. Vētra J., Reinis A., Skadiņš I., Kroiča J. Mikroorganismu biofilmas un to ietekme uz implantātu biosaderību // Latvijas Ārsts, 2014; 84–89.
10. 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 3. 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., Vētra 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 bioma-teriālu virsmas // RSU Zinātniskā konference [2011. gada 26.–30. aprīlis]: Tēzes, 334.
 19. Reinis A., Pavlova A., Kroiča J., u.c. Bakteriālās 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 TNF α , 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 titanium 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 cytotoxicity 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.

7. 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. Anderson J. M., Rodriguez A., Chang D. T. Foreign body reaction to biomaterials // Semin Immunol, 2008; 86–100.
4. 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.
5. 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.
6. Balasubramanian D., Schnepfer L., Kumari H., Mathee K. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence // Nucleic Acids Res, 2013; 11–20.
7. 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.
8. Belcarz A., Bieniaś 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.
9. 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).
10. 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.
11. Berzina L., Cimdins 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.
12. Bērziņa L., Cimdiņš 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.
13. 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.).
14. 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.

15. 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.
16. Bridges A. W., García A. J. Anti-inflammatory polymeric coatings for implantable biomaterials and devices // *J Diabetes Sci Technol*, 2008; 2(6): 984–994.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Capello N.C. Hydroxyapatite coating // *The Adult Hip*, 2007; 68: 1005–1013.
21. Charo I. F., Ransohoff R. M. The many roles of chemokines and chemokines receptors in inflammation // *N Engl J Med*, 2006; 354: 610–621.
22. Chen Q., Thouas G. A. Metallic implant biomaterials // *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 2015; 87: 1–57.
23. 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.).
24. Cimdins R., Bossert J., Berzina L., et al. Microstructure of bioactive polylayer coating of Ti alloy // *J. Ceramica Acta*, 1998; 4(5): 157–164.
25. 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.
26. 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.
27. Dapunt U., Lehner B., Burckhard L., et al. Evaluation of implant sonication as a diagnostic tool in implant-associated infections // *J Appl Biomater Funct Mater*, 2014; 12(3): 135–140.
28. 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.
29. 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.
30. 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.).
31. 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.

32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. Haenle M., Skripitz C., Mittelmeier W., Skripitz R. Economic impact of infected total knee arthroplasty // *Scientific World Journal*, 2012; 2012: 196515.
37. 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.
38. Harder J., Meyer-Hoffer U., Teran L. M., et al. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF- α , and IL-1 β , but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia // *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000; 22: 714–721.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. Hetrick E. M., Schoenfisch M. H. Reducing implant-related infections: active release strategies // *Chem. Soc. Rev.*, 2006; 35:780–789.
43. 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.
44. 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.
45. Hin T. S. Engineering materials for biomedical applications // *World Scientific Publishing Company*: USA, 2004: 350.
46. 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.

47. 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.
48. Janeway C., Travers P., Walport M., Capra J. Immunobiology: The immune system in health and disease // New York, N.Y: Garland Publishers, 1999.
49. 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.
50. 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.
51. Kalab M., Yang A. F., Chabot D. Conventional scanning electron microscopy for bacteria // *Infocus*, 2008; 10: 44–61.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. Kraigsley A., Ronney P. D. Hydrodynamic influences on biofilm formation and growth // [http://carambola.usc.edu/research/biophysics/Biofilms4Web.html_\(sk.14.04.2013.\)](http://carambola.usc.edu/research/biophysics/Biofilms4Web.html_(sk.14.04.2013.)).
58. 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.
59. 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.
60. Lee S. H., Kim H. W., Lee E. J., et al. Hydroxyapatite-TiO₂ hybrid coating on Ti implants // *J Biomater Appl*, 2006; 20: 195.
61. 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.
62. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease // *Nat Rev Micro*, 2007; 48–56.
63. 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.

64. 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.
65. 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.).
66. Narumi Ueda. Sonication for diagnosis of implant-associated infections // *Bone Joint J*, 2013; 95(B): 565.
67. 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.
68. O'Gara J. P., Humphryes H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications // *J. Med. Microbiol.*, 2001; 7: 582–587.
69. 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.
70. 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.
71. Osborn J. F. Implantatwerkstoff hydroxylapatitkeramik – grunlangen und linische anwendung // Berlin Quintessenz Verlag, 1985.
72. Otto M. Biofilm development in *Staphylococcus epidermidis* // http://www.nature.com/nrmicro/journal/v7/n8/fig_tab/nrmicro2182_F1.html_(sk. 14.11.2014.).
73. Pamp S. J., Tolker-Nielsen T. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa* // *J Bacteriol*, 2007; 2531–2539.
74. Park J., Lakes R. S. *Biomaterials: An Introduction* // Springer: New York, 2007; 561.
75. 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.
76. 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.
77. 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.
78. 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.
79. 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.
80. 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.
81. 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.
 82. 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.
 83. 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.).
 84. 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.
 85. 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.
 86. 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.
 87. Rahaman M. N., Day D. E., Bal B. S., et al. Bioactive glass in tissue engineering // Acta Biomater, 2011; 7: 2355–2373.
 88. Ryder C., Byrd M., Wozniak D. J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development // Curr Opin Microbiol., 2007; 10(6): 644–648.
 89. Salma I., Pilmane M., Skagers A., et al. Early morphofunctional response of contact tissue after intraossal implantation in rabbit jaw of pure synthetic hydroxyapatite (Hap) bioceramic materials and Hap saturated with Lidocaine // J. Stomatologija, 2009, 11(4): 113–118.
 90. 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.
 91. 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.
 92. 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.
 93. 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.
 94. Schneider J. J., Unholzer A., Schaller M., et al. Human defensins // J Mol Med, 2005; 83: 587–595.
 95. Sharma G., Rao S., Bansal A., et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets // Biologicals, 2014; 42(1): 1–7.
 96. Skagers A., Salma I., Salms G., et al. Reactogenicity of synthetic porous Hap bioceramic materials after intraossal subperiosteal implantation in rabbits // 24th European Conference on Biomaterials, 2011; 151–155.

97. 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.
98. 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.
99. Standards in Biomaterials Testing // <http://www.standardsdirect.org/standards/standards2/StandardsCatalogue24> (sk. 05.05.2013.).
100. 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.
101. 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.
102. 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.
103. 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.
104. 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.
105. Trampuz A., Zimmerli W. Diagnosis and treatment of implant-associated septic arthritis and osteomyelitis // *Curr Infect Dis Rep*, 2008; 10: 394–403.
106. Trampuz A., Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment // *Swiss Med. Wkly*. 2005; 135: 243–251.
107. 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.
108. 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.
109. 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.
110. 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.
111. 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.
112. 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.
113. 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.

114. Yuehuei H. A., Friedman R. J. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces // *Applied Biomaterials*, 1998; 43: 338–348.
115. Yuehuei H. A., Friedman R. J. *Handbook of Bacterial Adhesion*. Towota: 2000. P. 11–20.
116. 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.
117. Zeller V., Ghorbani A., Strady C., et al. *Propionibacterium acnes*: an agent of prosthetic joint infection and colonization // *J Infect*, 2007; 55: 119–124.
118. 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.
119. 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.
120. Zimmerli W., Trampuz A., Ochsner P. E. Prosthetic-joint infections // *N Engl J Med*, 2004; 351: 1645–1654.
121. 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.
122. 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.
123. Берзиня Л. Я., Швинка В. Ю., Ветра Я. Я. Швинка Р. К., Эйдук Ю. Я. Кальциевофосфатные стеклокерамические материалы // *Всесоюз. совещание “Строение, свойства и применение фосфатных, фторидных и халькогенидных стекол”*, Рига, 1985, ч. 2., с. 69–70.
124. 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 Māra 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.