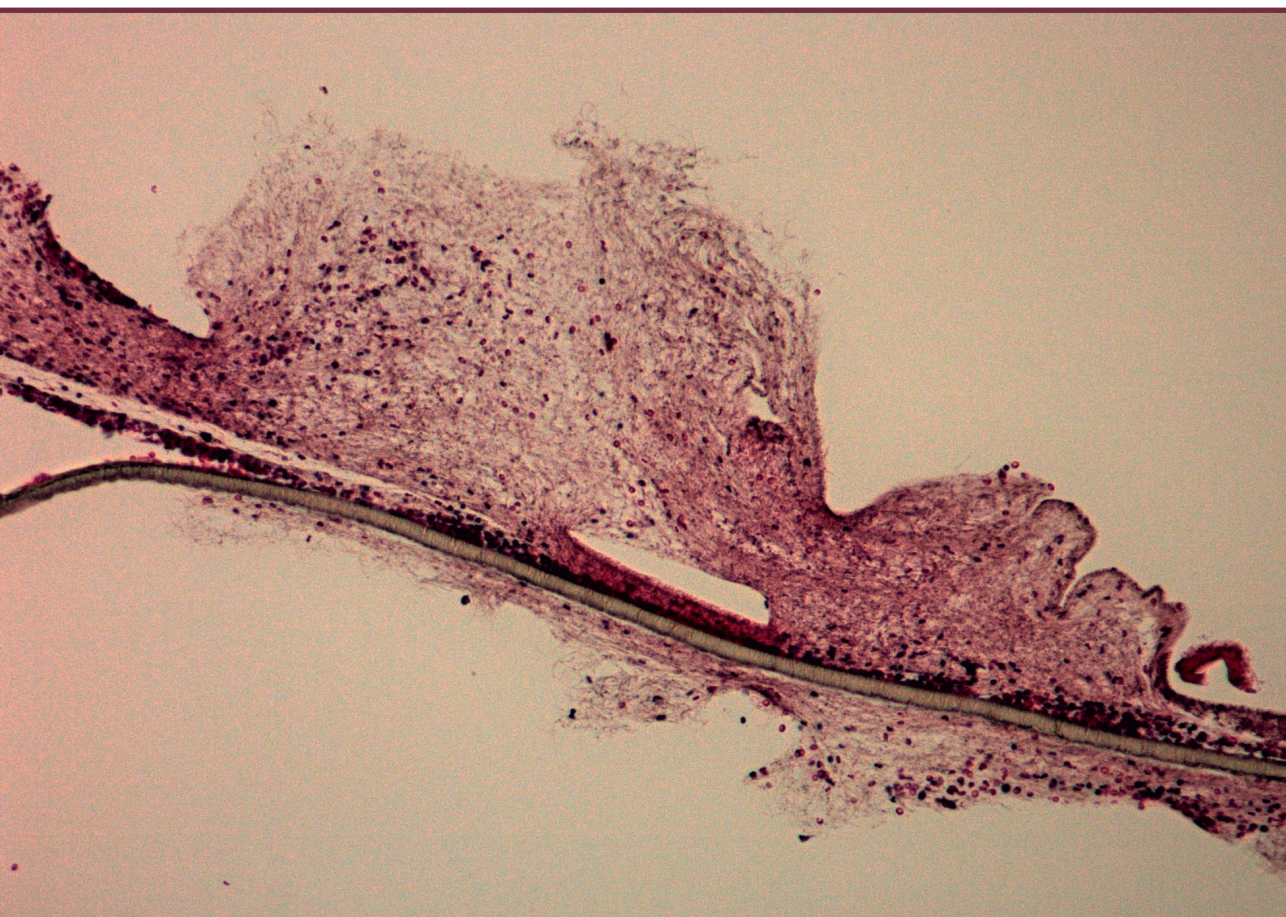


**Karina Egle**

# **AUTOLOGU FIBRĪNA MATRICU IZSTRĀDE MEDICĪNISKAM PIELIETOJUMAM**

Promocijas darba kopsavilkums



# RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE

Dabazinātņu un tehnoloģiju fakultāte  
Biomateriālu un bioinženierijas institūts

**Karina Egle**

Doktorantūras studiju programmas “Ķīmija, materiālzinātne un tehnoloģijas” doktorante

## AUTOLOGU FIBRĪNA MATRICU IZSTRĀDE MEDICĪNISKAM PIELIETOJUMAM

Promocijas darba kopsavilkums

Zinātniskā vadītāja  
Docente *Dr. sc. ing.*  
ARITA DUBNIKA

RTU Izdevniecība  
Rīga 2024

Egle, K. Autologu fibrīna matricu izstrāde medicīniskam pielietojumam. Promocijas darba kopsavilkums. – Rīga: RTU Izdevniecība, 2024. – 33 lpp.

Publicēts saskaņā ar promocijas padomes “RTU P-02” 2024. gada 5. jūnija lēmumu, protokols Nr. 04030-9.2.2/7.

Promocijas darba pētījumi izstrādāti, pateicoties Eiropas Savienības pētniecības un inovāciju programmai “Apvārsnis 2020” ar grantu līgumiem Nr. 857287 (BBCE) un Nr. 952347 (RISEus2). Šo promocijas darbu atbalstīja arī Latvijas Zinātnes padomes pētniecības projekts Nr. lzp-2020/1-0054 “Antibakteriālu autologu fibrīna matricu izstrāde mutes, sejas un žokļu ķirurģijai (MATRI-X)”.



Vāka attēla autore Karina Egle

<https://doi.org/10.7250/9789934370915>  
ISBN 978-9934-37-091-5 (pdf)

## PATEICĪBAS

Liels paldies manai ģimenei – mammai Nataļjai, omei Tamārai, opim Vladimiram un pārējiem par ieguldījumu, uzmundrinājumu un centību šad un tad saprast, ar ko es vispār nodarbojos!

Paldies arī maniem draugiem – Ritai, Marinai, Oznur, Kristīnei, Agnesei, Karolinai, Esterei, Eleonorai, Signei, Annai – par atbalstu, idejām, uzmundrinājumu un tām reizēm, kurās es nedomāju par šī darba izstrādi!

Milzīgs paldies maniem projektu partneriem Ilzei Šalmai, Ingum Skadiņam, Lanai Mičko, Evai Dohlei, Verenai Hoffmann, Geraldine Guex par ieguldījumu šī darba tapšanā un paveikto kopīgu mērķu sasniegšanai! Paldies arī maniem kolēģiem par atbalstu un uzmundrinājumiem!

Visdziļākā pateicība manai darba vadītājai docentei *Dr.sc. ing.* Aritai Dubņikai par zinātniskajām idejām, izaicinājumiem un sniegtajām zināšanām!

# PROMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS ZINĀTNES DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ

Promocijas darbs zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2024. gada 26. augustā Rīgas Tehniskās universitātes Dabaszinātņu un tehnoloģiju fakultātē, Paula Valdena ielā 3, 272. auditorijā.

## OFICIĀLIE RECENZENTI

Profesors *Dr. sc. ing.* Remo Merijs-Meri,  
Rīgas Tehniskā universitāte

Profesore *Dr. med.* Ilze Akota,  
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Profesors *João F. Mano*,  
Aveiro Universitāte, Portugāle

## APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājusi šo promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai. Promocijas darbs zinātniskā grāda iegūšanai nav iesniegts nevienā citā universitātē.

Karina Egle ..... (paraksts)

Datums: .....

Promocijas darbs sagatavots kā tematiski vienotu zinātnisko publikāciju kopa ar kopsavilkumu latviešu un angļu valodā. Tajā ietvertas četras zinātniskas publikācijas. Publikācijas zinātniskajos žurnālos uzrakstītas angļu valodā, to kopējais apjoms, ieskaitot pielikumus, ir 76 lpp.

## SATURS

|   |    |
|---|----|
| PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS.....  | 6  |
| Tēmas aktualitāte.....  | 6  |
| Mērķi un uzdevumi .....   | 9  |
| Tēzes aizstāvēšanai .....   | 9  |
| Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti .....                                     | 9  |
| Praktiskā nozīme .....  | 10 |
| Darba struktūra un apjoms .....   | 10 |
| Darba aprobācija un publikācijas .....  | 10 |
| PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI.....  | 13 |
| Ceļš no pacienta asins paraugiem līdz injicējamam PRF.....                          | 13 |
| PRF potenciāls stimulēt CLP antibakteriālo jūtību .....                             | 15 |
| Ievadīto piegādes sistēmu īpašību ietekme uz zāļu izdalīšanos no PRF matricas ..... | 19 |
| Nesējsistēmu ietekme uz PRF sastāvā esošo bioaktīvo molekulu izdalīšanos.....       | 23 |
| SECINĀJUMI .....  | 29 |
| LITERATŪRAS SARAKSTS .....  | 30 |

- 1. pielikums** Egle, K., Salma, I., Dubnika, A. From Blood to Regenerative Tissue: How Autologous Platelet-Rich Fibrin Can Be Combined with Other Materials to Ensure Controlled Drug and Growth Factor Release. *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, 22 (21), 11553.
- 2. pielikums** Egle, K., Skadins, I., Grava, A., Micko, L., Dubniks, V., Salma, I., Dubnika, A. Injectable Platelet-Rich Fibrin as a Drug Carrier Increases the Antibacterial Susceptibility of Antibiotic – Clindamycin Phosphate. *Int. J. Mol. Sci.*, **2022**, 23 (13), 7407.
- 3. pielikums** Dubnika, A., Egle, K., Skrinda-Melne, M., Skadins, I., Rajadas, J., Salma, I. Development Development of Vancomycin Delivery Systems Based on Autologous 3D Platelet-Rich Fibrin Matrices for Bone Tissue Engineering. *Biomedicines*, **2021**, 9 (7), 814.
- 4. pielikums** Egle, K., Dohle, E., Hoffmann, V., Salma, I., Al-Maawi, S., Ghanaati, S., Dubnika, A. Fucoidan/Chitosan Hydrogels as Carrier for Sustained Delivery of Platelet-Rich Fibrin Containing Bioactive Molecules. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2024**, 262 (1), 129651.

# PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

## Tēmas aktualitāte

Mūsdienās joprojām tiek diskutēts par to, vai trombocītus var uzskatīt par asins šūnu fragmentiem vai sīkām bez kodola asins šūnām [1], taču ir zināms, ka tie atbild par biomolekulu aktivēšanu un atbrīvošanu. Ar trombocītiem bagātināts fibrīns (*PRF*) ir autologs materiāls, ko centrifugēšanas ceļā var iegūt no cilvēka asinīm. *PRF* izmanto, lai veicinātu brūču dzīšanu un audu reģenerāciju, kā arī dažādās medicīnās jomās, tostarp zobārstniecībā un sejas žokļu ķirurģijā [2].

*PRF* sastāvā esošie leikocīti veicina brūču dzīšanu, un tas satur augšanas faktorus, kas izdalās laika gaitā. Mutes un sejas žokļu ķirurģijā, plastiskā ķirurģijā, sirds ķirurģijā un zobārstniecībā ir liela interese par *PRF* antimikrobiālo iedarbību [3]. *PRF* struktūras sarežģītība, neviendabīgais raksturs un recēšanas spēja apgrūtina tā antimikrobiālo iedarbības novērtēšanu. Jāņem vērā, ka lielākā daļa izmantoto testēšanas metožu antimikrobiālās iedarbības izvērtēšanai ir balstītas antibakteriālo līdzekļu spējā difundēt barotnē. *PRF* visbiežāk izmanto mutes un sejas žokļu reģionos, tāpēc tā antimikrobiālās aktivitātes novērtējums ir plašāk apskatīts mutes mikrobiomā. *PRF*, kas sagatavots saskaņā ar noteiktu protokolu (atkarībā no ķirurģiskās vietas), var nodrošināt antimikrobiālas un pretiekaisuma īpašības un var būt noderīgs līdzeklis klīniskajā praksē mutes un sejas žokļu ķirurģijā [4]. Pēdējo 10 gadu laikā veikti vairāki pētījumi, kuros antibiotikas kombinētas ar *PRF*, lai nodrošinātu antimikrobiālo efektu. Pamatojoties uz apkopoto literatūru par *PRF* antimikrobiālajām īpašībām, ir ieteicams tajā integrēt zāles, lai izveidotu vienotu sistēmu, nevis izmantotu zāles un *PRF* atsevišķi [5].

Mutes un sejas žokļu ķirurģijas pacientiem, kuriem ir alerģija pret penicilīnu, kā aizstājēju lieto klindamicīnu, līdz ar to palielinās nepieciešamība šo medikamentu izpētīt padziļināti. Ārsti min, ka papildus baktericīdajai iedarbībai klindamicīnam ir augstāka perorālā uzsūkšanās, ievērojams sadalījums audos (radot augstāku zāļu koncentrāciju kaulos) un zems rezistences līmenis [6]. Turklāt bieži vien priekšroka tiek dota zāļvielu prekursoriem, neaktīviem prekursoriem, kas organismā tiek pārveidoti par aktīvām vielām, nevis tiešai aktīvo vielu lietošanai farmācijā. Šī izvēle ir saistīta ar to spēju uzlabot zāļu stabilitāti, šķīdību un biopieejamību, uzlabojot terapeitiskos rezultātus. Klindamicīna fosfāts (*CLP*) ir klindamicīna zāļvielu prekursori, kam nav antimikrobiālas aktivitātes. Tiek ziņots, ka *CLP* asinīs ātri hidrolizējas par aktīvo bāzi (klindamicīnu) [2]. Promocijas darbā pētīta spēja pārveidot *CLP* aktīvajā formā, apvienojot to ar *PRF*. Turklāt pētīts arī vankomicīna hidroģēnhlorīds (*VANKA*), lai apskatītu plašākas aktīvo vielu izmantošanas iespējas kombinācijā ar *PRF*. *VANKA* ir ūdenī šķīstoša triciklisko glikopeptīdu antibiotika [7], kas novērš/iznīcina noteiktus grampozitīvus mikroorganismus, kas ir visizplatītākie patogēni. *VANKA*, tāpat kā klindamicīns, tiek lietots gadījumos, kad penicilīns ir neefektīvs vai izraisa alerģiskas reakcijas, kā arī tādu infekciju ārstēšanai, kurās citas antibiotikas ir rezistentas [8, 9].

Zāļu pamata farmakoloģiskās īpašības var uzlabot, izmantojot piemērotu zāļu piegādes sistēmu, kas nodrošina to ievadīšanu kā brīvu molekulu [10]. Zāļu piegādes sistēma ir metode

vai tehnoloģiska pieceja, ko izmanto, lai sistemātiski un precīzi ievadītu terapeitiskās vielas (piemēram, zāles vai medikamentus) cilvēka organismā. Šis process ietver tādu sistēmu izveidi un ieviešanu, kas uzlabo ārstēšanas efektivitāti un drošību. Šo sistēmu galvenais mērķis ir precīzi kontrolēt zāļu piegādi konkrētiem audiem vai šūnām, vienlaikus cenšoties samazināt iespējamās blakusparādības [11, 12]. Piemēram, *VANKA* var iekapsulēt liposomās, unikālos zāļu nesējos, jo tās var pārvarēt perorāli vai intravenozi lietojamo zāļu trūkumus. Kā alternatīva *VANKA* iekapsulēšanai ir pētītas arī polipien-ko-glikolskābes (*PLGA*) polimēru mikrokapsulas. Gan liposomām, gan *PLGA* mikrokapsulām ir zema iekapsulēšanas efektivitāte, bet, neskatoties uz to, *VANKA* iekapsulēšana nesējā nodrošina augstus klīniskos ieguvumus ilgstošai antibiotiku lietošanai. Tāpēc ir būtiski pielāgot *VANKA* nesēja sastāvu un zāļu izdalīšanās ātrumu no autologajiem paraugiem. Pašreizējo pētījumu skaits par zāļu nesējiem, kas integrēti autologajos *PRF* paraugos, ir ierobežots [13].

Papildus *PRF* kombinācijai ar zāļu piegādes sistēmām, kas nodrošina kontrolētu zāļu piegādi, *PRF* ietver augšanas faktorus un citokīnus, ko var atbrīvot tieši ievadīšanas vietā. Vairāki autori aprakstījuši dažādu centrifugēšanas protokolu ietekmi uz augšanas faktoru un citokīnu izdalīšanos, apstiprinot pagatavošanas protokolu būtisko ietekmi uz *PRF* īpašībām. Ir pierādīts, ka augšanas faktoru un citokīnu izdalīšanās modeļu atšķirības pastāv ne tikai starp dažādiem trombocītu koncentrātiem, bet arī katra veida *PRF* [14]. Trombocītu koncentrāts galvenokārt satur trombocītus, savukārt *PRF* ir papildus sajaukts ar fibrīna šķiedru veidojošiem proteīniem, kas veicina audu dziļānu. Esošajā literatūrā pētītas trombocītiem bagātinātas plazmas (*PRP*) vai *PRF* kombinācijas ar hitozāna/fukoidāna kompleksiem vai želatīna/hitozāna hidrogēliem [15, 16]. Šajos pētījumos abu veidu trombocītu koncentrāti tika iejaukti hitozāna šķīdumā, un iegūtajiem materiāliem novērtēts atbrīvoto olbaltumvielu daudzums. Jaunu metodoloģiju ieviešana, balstoties šajās publikācijās, sarežģītu medicīniskās procedūras, kas ietveru vairākus izstrādes posmus. Iepriekšējos pētījumos noteikta gan individuāla *PRF* ietekme uz kaulu veidošanos un reģenerāciju, gan integrējot to polimēru matricās [17]. *Xu et al.* iekļāva granulu-liofilizētu trombocītiem bagātinātu fibrīnu (*G-L-PRF*) polivinilspirta (*PVA*) hidrogēlos, panākot ilgstošu augšanas faktoru izdalīšanos no *G-L-PRF/PVA* pamatnēm līdz deviņām dienām [18]. Citā *ex vivo* pētījumā tika analizēta injicējamā *PRF* kombinācija ar piecām dažāda veida kolagēna bāzes membrānām un to spēja nodrošināt autologu augšanas faktoru piegādi. Tādējādi šis bija pirmais pētījums, kurā mēģināts izprast biomateriālu spēju un piemērotību iekļaut *PRF* [19].

Nesen kaulaudu inženierijas nolūkos izstrādāti vairāki fukoidānu (*FU*) saturoši kompozītmateriāli, jo *FU* palielina osteoblastiem līdzīgo šūnu proliferācijas spēju un uzlabo osteoblastu veidoto minerālu nogulsnešanos [20]. *FU* līdzība cilvēka ārpusšūnu matricai un plašās īpašības, piemēram, augsta bioloģiskā saderība un atjaunojība, ir ieinteresējušas pētniekus. Šīs īpašības ir nozīmīgas reģeneratīvās medicīnas materiālu izstrādē, īpaši brūču ārstēšanai [21]. *FU* ir heparīnam līdzīga molekula, un tas uzlabo augšanas faktoru ietekmi uz šūnu proliferāciju, osteogēno diferenciaciju un mezenhimālo cilmes šūnu aktivitāti [22]. Vairākos pētījumos [23, 24] aprakstīts, ka *FU* var mijiedarboties ar augšanas faktoriem (piemēram, *bFGF* un *TGF-β*), lai kontrolētu to izdalīšanās ātrumu un aktivitāti, saistoties un



regulējot signāla vadīšanas ceļus. Signāla vadīšanas ceļi ir ļoti svarīgi autologos *PRF* paraugos, lai nodrošinātu augšanas faktoru izdalīšanos no matricām.

Kopumā hitozāna struktūra un īpašības ir līdzīgas glikozaminoglikānam (GAG), dabiskajam polisaharīdam un galvenajai ārpusšūnas matricas (*ECM*) sastāvdaļai [25]. Hitozāns ir dabisks katjonu kopolimērs, kas radījis ievērojamu interesi par tā potenciālu hidrogēļu izstrādē. Šī polimēra hidrofilā daba nodrošina tā noārdīšanos cilvēka fermentu darbības rezultātā, tādējādi veicinot bioloģisko saderību un bioloģisko noārdīšanos, kas ir divas būtiskas medicīnisko ierīču īpašības. Hitozānā balstīti hidrogēli varētu kalpot kā pamatnes audu atjaunošanai [26]. Hitozāns paātrina brūču dzīšanu, aktivējot un modulējot iekaisuma šūnas un veicinot granulāro audu veidošanos. Tā spēja saistīt negatīvi lādētas sarkanās asins šūnas uzlabo recēšanu, padarot to par būtisku brūču pārsēju sastāvdaļu [27].

Līdz šim kontrolētas augšanas faktoru piegādes metodes, kas balstītas *PRF* kombinācijā ar citiem biomateriāliem, nodrošinot ilgstošākas terapijas iespējas, nav pētītas. Šajā darbā tika izstrādāti hidrogēli, kas sastāv no fukoidāna (FU) un hitozāna (CS), ņemot vērā to bioloģisko saderību un spēju veidot polielektrolītu kompleksus pašsavienšanās ceļā [28]. Polielektrolītu kompleksu veidošanās starp pretēji lādētām hitozāna un fukoidāna aktīvajām grupām padara iespējamu *PRF* sastāvā esošo augšanas faktoru iekļaušanu FU un CS hidrogēlā elektrostatiskās mijiedarbības rezultātā [29]. Tādējādi promocijas darbā izstrādāti fukoidāna/hitozāna hidrogēli, pētot to turpmākās izmantošanas iespējas kā materiālus, lai iekļautu un uzglabātu *PRF*.

Šajā promocijas darbā tika izvirzīti šādi mērķi: 1) izpētīt *PRF* potenciālu zāļvielu prekursoru pārveidošanā aktīvajā formā, izmantojot klindamicīna fosfātu kā vienu no zāļvielu prekursoriem piemēriem; 2) novērtēt *PRF* spēju palēnināt aktīvās vielas straujo sākotnējo izdalīšanos, iekļaujot aktīvo vielu *PLGA* mikrokapsulās vai liposomās, izmantojot *VANKA* kā vienu no aktīvās vielas piemēriem; 3) izpētīt *PRF* sastāvā esošo bioaktīvo molekulu kontrolētu izdalīšanos no *PRF* saturošām jūras polisaharīdu (fukoidāna un hitozāna) hidrogēļu piegādes sistēmām.

## Mērķi un uzdevumi

Promocijas darba mērķis ir izstrādāt *PRF* balstītas matricas, kas var nodrošināt antimikrobiālās īpašības, pievienojot zāles vai to piegādes sistēmas, kā arī nodrošināt kontrolētu *PRF* sastāvā esošo bioaktīvo molekulu piegādi, izvērtējot dažādus *PRF* nesējus. Lai sasniegtu mērķi, tika definēti vairāki uzdevumi.

1. Izpētīt *PRF* ierosināšanas potenciālu klindamicīna fosfāta pārveidošanai par aktīvo zāļu formu klindamicīnu, nodrošinot efektīvākas antimikrobiālās īpašības.
2. Novērtēt *PRF* matricu mijiedarbību ar zāļu piegādes sistēmu nesējiem (*PLGA* mikrokapsulas vai liposomas) un to ietekmi uz antibiotiku (*VANKA*) izdalīšanās kinētiku.
3. Izstrādāt fukoidāna/hitozāna hidrogēlu iegūšanas tehnoloģijas metodiku to apvienošanai ar *PRF*, lai nodrošinātu *PRF* sastāvā esošo bioaktīvo molekulu aizkavētu izdalīšanos.

## Tēzes aizstāvēšanai

1. *CLP* iekļaušana *PRF* kā nesējmatricā paaugstina tā antibakteriālās īpašības, nodrošinot zāļvielu prekursora pārveidošanos par tā bioloģiski aktīvo formu klindamicīnu.
2. *PRF* matricās iekļauto antibiotiku *VANKA* izdalīšanās kinētiku var modelēt no sešām līdz 10 dienām atkarībā no zāļu piegādei izmantotā nesēja (*PLGA* mikrokapsulas vai liposomas).
3. Balstoties fukoidāna spējā regulēt bioaktīvo molekulu izdalīšanos un aktivitāti, ilgstošu bioaktīvo molekulu izdalīšanos (no sešām stundām līdz septiņām dienām) no *PRF* var panākt, apvienojot *PRF* ar fukoidāna/hitozāna hidrogēliem.

## Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti

Zinātniskā novitāte balstās uz perspektīvu duālu *PRF* lietojumu. Pirmkārt, inovatīva hidrogēla izstrāde ar spēju modulēt *PRF* sastāvā esošo bioaktīvo molekulu izdalīšanos, un, otrkārt, jaunu zāļu piegādes sistēmu izstrāde, ietverot kontrolētu antibiotiku vai daļiņu piegādi, kurā daļiņas iekļautas *PRF* un darbojas kā bioloģiski aktīvo molekulu nesēji.

Darbā izstrādāta jauna metode, lai nodrošinātu *PRF* sastāvā esošo bioaktīvo molekulu iekapsulēšanu jūras polisaharīdu fukoidāna un hitozāna hidrogēlos, tādējādi panākot to ilgstošu izdalīšanos. Šajā metodē izmantoti videi draudzīgi materiāli hitozāns un fukoidāns, kas polielektrolītu pašsavienošanās ceļā veido hidrogēlus. Atšķirībā no tradicionālajām zāļu piegādes sistēmu sagatavošanas metodēm šī hidrogēlu iegūšanas metode nav atkarīga no ķīmiskiem šķērssaistītājiem.

Paralēli izstrādāta arī jauna metodoloģija *PRF* izmantošanai kā bioaktīvo molekulu nesējam, lai uzlabotu zāļu antibakteriālās īpašības. *PRF* kā nesējs paplašina zāļvielu prekursoru (piemēram, klindamicīna fosfāta), kam ir mazāk blakusparādību nekā aktīvajai formai, izmantošanas iespējas. Iegūtā zāļu/*PRF* kombinācija uzrāda nepieciešamību pēc zemākas

zāļvielu prekursoru koncentrācijas, salīdzinot ar nepieciešamo zāļvielu prekursoru daudzumu bez *PRF*. Nākotnē šī metodoloģija tiks attīstīta plašākai zāļu antibakteriālo īpašību uzlabošanai.

## Praktiskā nozīme

Darbā pētītas *PRF* īpašības un tā kombinācijas ar dažādām zāļu piegādes sistēmām un matricām. Atrasts *PRF* lietojums tālāk minēto inovatīvo kombināciju izstrādē.

1. *PRF* kā nesējmatrica zāļvielu prekursoram – *CLP* mutes, sejas un žokļu ķirurģijā, tādējādi iegūstot aktīvo zāļu formu, kas nodrošinātu antibakteriālu iedarbību pēcoperācijas periodā.
2. *PRF* kombinēšana ar dažādiem bioloģiski aktīvo vielu (piemēram, *VANKA*) nesējiem (*PLGA* mikrokapsulas vai liposomas), samazinot nepieciešamību pēc perorālas zāļu lietošanas un pielāgojot bioloģiski aktīvas vielas terapijas ilgumu.
3. Jauna un videi draudzīga metode fukoidāna/hitozāna hidroģēlu iegūšanai kombinācijā ar *PRF*, nodrošinot ilgstošu *PRF* sastāvā esošo bioaktīvo molekulu izdalīšanos.

## Darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs ir sagatavots kā tematiski vienotu zinātnisko publikāciju kopa, kas veltīta pētījumiem par autologo fibrīna matricu izstrādi medicīniskiem nolūkiem. Darbs ietver trīs oriģinālpublikācijas *SCI* žurnālos un vienu apskatrakstu.

## Darba aprobācija un publikācijas

Promocijas darba galvenie rezultāti publicēti trīs zinātniskajos oriģinālrakstos. Promocijas darba izstrādes laikā sagatavots viens apskatraksts. Promocijas darba rezultāti prezentēti 14 zinātniskajās konferencēs.

Zinātniskās publikācijas

1. **Egle, K.**, Dohle, E., Hoffmann, V., Salma, I., Al-Maawi, S., Ghanaati, S., Dubnika, A. Fucoidan/Chitosan Hydrogels as Carrier for Sustained Delivery of Platelet-Rich Fibrin Containing Bioactive Molecules. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2024**, 262 (1), 129651. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.129651.
2. **Egle, K.**, Skadins, I., Grava, A., Micko, L., Dubniks, V., Salma, I., Dubnika, A. Injectable Platelet-Rich Fibrin as a Drug Carrier Increases the Antibacterial Susceptibility of Antibiotic – Clindamycin Phosphate. *International Journal of Molecular Sciences*, **2022**, 23 (13), 7407. doi: 10.3390/ijms23137407 (Scopus, Open Access).
3. Dubnika, A., **Egle, K.**, Skrinda-Melne, M., Skadins, I., Rajadas, J., Salma, I. Development Development of Vancomycin Delivery Systems Based on Autologous 3D Platelet-Rich Fibrin Matrices for Bone Tissue Engineering. *Biomedicines*, **2021**, 9 (7), 814. doi: 10.3390/biomedicines9070814 (Scopus, Open Access).

4. **Egle, K.**, I.Salma, A.Dubnika. From Blood to Regenerative Tissue: How Autologous Platelet-Rich Fibrin Can Be Combined with Other Materials to Ensure Controlled Drug and Growth Factor Release. *International Journal of Molecular Sciences*, **2021**, 22 (21), 11553. doi: 10.3390/ijms222111553 (Scopus, Open Access).

Promocijas darba rezultāti ir prezentēti 14 zinātniskajās konferencēs.

1. **Egle, K.**, Dohle, E., Hoffmann, V., Salma, I., Al-Maawi, S., Ghanaati, S., Dubnika, A. Exploring Platelet-Rich Fibrin Microstructure and Histology: with and without Hydrogel Carriers. *6<sup>th</sup> International Scientific Conference of RTU: Materials Science and Applied Chemistry*, Riga, Latvia, October 6, **2023** (mutiskā prezentācija).
2. **Egle, K.**, Dohle, E., Hoffmann, V., Salma, I., Al-Maawi, S., Ghanaati, S., Dubnika, A. Fucoidan/Chitosan Hydrogels for Sustained Delivery of Platelet-Rich Fibrin Containing Growth Factors. *3<sup>rd</sup> Annual Conference of the European Society for Biomaterials*, Davos, Switzerland, 4–8 September **2023** (stenda referāts).
3. Dubnika, A., **Egle, K.**, Skadins, I., Skrinda-Melne, M., Micko, L., Grava, A., Dubniks, V., Salma, I. Development Of Drug Delivery Systems Based On Autologous 3D Platelet-rich Fibrin Matrices, TERMIS-AM 2023 Annual Conference, Boston, MA, 11–14 April **2023** (stenda referāts).
4. Micko, L., Salma, I., Skadins, I., Salms, G., Dubnika, A., **Egle, K.** Platelet-rich fibrin immunological testing methodology using Elisa assay, *RSU International Research Conference on Medical and Health Care Sciences: Knowledge for Use in Practice*, Riga, Latvia, 29–31 March **2023** (mutiskā prezentācija).
5. Micko, L., Skadins, I., Salma, I., Dubnika, A., **Egle, K.**, Salms G. Platelet-rich fibrin antibacterial activity against *Klebsiella pneumoniae*, *RSU International Research Conference on Medical and Health Care Sciences: Knowledge for Use in Practice*, Riga, Latvia, 29–31 March **2023** (mutiskā prezentācija).
6. **Egle, K.**, Skadins, I., Grava, A., Micko, L., Dubniks, V., Salma, I., Dubnika, A. Injectable platelet-rich fibrin as a drug carrier increases the antibacterial susceptibility of antibiotic-clindamycin phosphate. *16<sup>th</sup> Annual Meeting for Scandinavian Society for Biomaterials*, Roros, Norway, 21–24 March **2023** (stenda referāts).
7. Micko, L., **Egle, K.**, Grava, A., Skadins, I., Salma, I., Salms, G., Dubnika, A. Antimicrobial activity of platelet-rich fibrin. *26<sup>th</sup> Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, Madrid, Spain, 27–30 September **2022** (stenda referāts).
8. **Egle, K.**, Dohle, E., Hoffmann, V., Salma, I., Al-Maawi, S., Ghanaati, S., Dubnika, A. Fucoidan/chitosan hydrogels as matrices for sustained delivery of platelet-rich fibrin containing bioactive molecules. *32<sup>nd</sup> Annual Conference of the European Society for Biomaterials*, Bordeaux, France, 4–8 September **2022** (stenda referāts).
9. Salma, I., Micko, L., **Egle, K.**, Dubnika, A. Development of protocol for obtaining autologous liquid PRF for local drug delivery systems. *32<sup>nd</sup> Annual Conference of the European Society for Biomaterials*, Bordeaux, France, 4–8 September **2022** (stenda referāts).

10. **Egle, K.**, Micko, L., Grava, A., Salma, I., Skadins, I., Dubnika, A. Study on the effect of fibrin matrice on the antibacterial activity of clindamycin phosphate. *Scandinavian Society for Biomaterials 2022 15<sup>th</sup> Annual Meeting*, Jurmala, Latvia, 13–15 June **2022** (stenda referāts).
11. **Egle, K.**, Salma, I., Dubnika, A. From blood to regenerative tissue: how autologous platelet-rich fibrin can be used as drug carrier system. *62<sup>nd</sup> International Scientific Conference of RTU: Materials Science and Applied Chemistry*, Riga, Latvia, October 22, **2021** (stenda referāts).
12. **Egle, K.**, Dubnika, A. Development of fibrin matrices for sustained drug delivery. *31<sup>st</sup> Conference of the European Society for Biomaterials*, Porto, Portugal, 5–9 September **2021** (stenda referāts).
13. **Egle, K.**, Salma, I., Skadins, I., Dubnika, A. Study of autologous fibrin matrices for controlled drug delivery. *Scandinavian Society for Biomaterials*, Jurmala, Latvia, 14 June **2021** (stenda referāts).
14. Skadins, I., Micko, L., Salma, I., Dubnika, A., **Egle K.** Antibacterial properties of platelet-rich fibrin matrices saturated with vancomycin. *Scandinavian Society for Biomaterials*, Jurmala, Latvia, June 14 **2021** (stenda referāts).
15. Dubnika, A., **Egle, K.**, Skadins, I., Salma, I. Commercial vs autologous fibrin-handling from material point of view. *RSU International Research Conference on Medical and Health Care Sciences: Knowledge for Use in Practice*, Riga, Latvia, 24–26 March **2021** (mutiskā prezentācija tiešsaistē).
16. Skadins, I., Dubnika, A., **Egle, K.**, Dovbenko, A., I. Salma, L. Micko. Antibacterial effect of autologous matrices. *RSU International Research Conference on Medical and Health Care Sciences: Knowledge for Use in Practice*, Riga, Latvia, 24–26 March **2021** (stenda referāts).
17. **Egle, K.**, Dubnika, A. Development of fibrin matrices for controlled drug delivery. *61<sup>st</sup> International Scientific Conference of RTU: Materials Science and Applied Chemistry*, Riga, Latvia, October 23, **2020** (stenda referāts).
18. **Egle, K.** Development of autologous fibrin matrices for controlled drug delivery. *61<sup>st</sup> Riga Technical University Student Scientific and Technical Conference*, Riga, Latvia, May 22, **2020** (mutiskā prezentācija).

Citas zinātniskās publikācijas, kas publicētas promocijas darba izstrādes laikā.

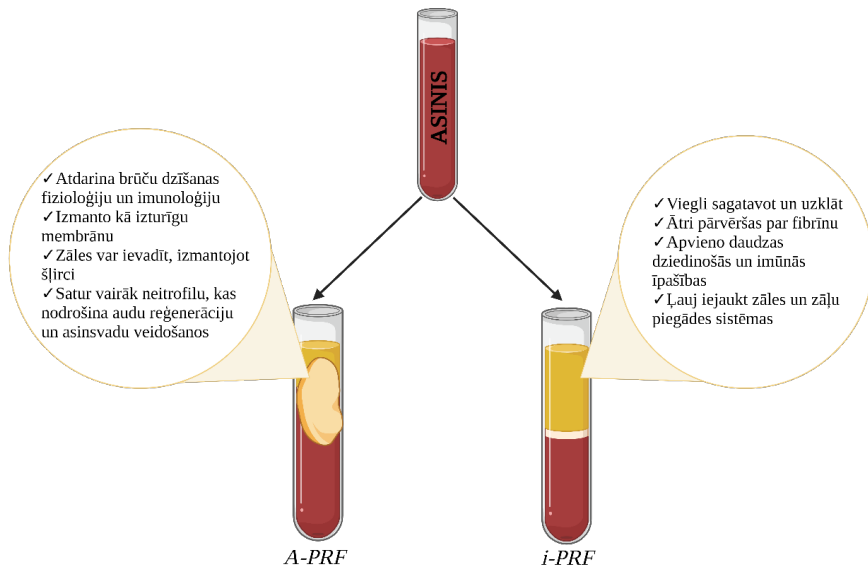
1. Micko, L., Salma, I., Skadins, I., **Egle, K.**, Salms, G., Dubnika, A. Can Our Blood Help Ensure Antimicrobial and Anti-Inflammatory Properties in Oral and Maxillofacial Surgery? *International Journal of Molecular Sciences*, **2023**, 24 (2), 1073. doi: 10.3390/ijms24021073 (Scopus, Open Access).
2. Grava, A., **Egle, K.**, Dubnika, A. Enzymatically Crosslinked In Situ Synthesized Silk/Gelatin/Calcium Phosphate Hydrogels for Drug Delivery. *Materials*, **2021**, 14 (23), 7191. doi: 10.3390/ma14237191 (Scopus, Open Access).

# PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI

## Ceļš no pacienta asins paraugiem līdz injicējamam *PRF*

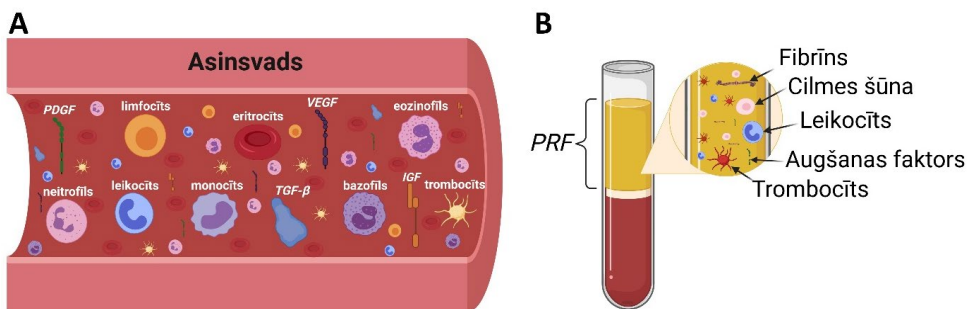
Asinis ir plazmas, trombocītu, sarkano un balto asins šūnu maisījums, kas cirkulē pa visu ķermeni. Pacienta asinis tiek savāktas, un, pakļaujot tās centrālās spēkam, sastāvā esošie komponenti, tostarp trombocīti un fibrīns, tiek dabiski atdalīti atkarībā no to blīvuma [30]. Līdz ar to *PRF* tiek iegūts no asinīm, izmantojot vienkāršu centrifugēšanas procesu. Mūsdienās *PRF* plaši izmanto, lai paātrinātu mīksto un cieto audu atjaunošanos. 2001. gadā Francijā pirmo reizi pētnieks *Choukroun et al.* aprakstīja *PRF*. *PRF* ir ar trombocītiem bagātinātas plazmas (*PRP*) modifikācija, autologa fibrīna matrica, ko medicīniski izmanto kaulu reģenerācijas uzlabošanai un mīksto audu paplašināšanai un stiprināšanai. Salīdzinot ar citiem trombocītu koncentrātiem, *PRF* ir ar trombocītiem bagātināts fibrīna receklis, kura iegūšanai nav nepieciešams izmantot trombinu (prokoagulantu, kas paātrinātu koagulāciju). To iegūst, centrifugējot asinis bez jebkādiem piemaisījumiem. *PRF* ir jauns biomateriāls, kas līdzinās autologai rētu matricai, bet tajā pašā laikā nav ne fibrīna līme, ne klasisks trombocītu koncentrāts. Turklāt *PRF* satur augstu saimniekorganismā esošo imūnšūnu koncentrāciju, kas nepieciešama brūču dzīšanai un infekciju samazināšanai [5].

Mūsdienās tiek izmantoti dažādi *PRF* atvasinājumi atkarībā no to lietojuma un vēlamajām īpašībām. Kā minēts *Wend et al.* pētījumos, papildus blīvajam *PRF* (*A-PRF*) pastāv klīniska nepieciešamība izstrādāt injicējamu *PRF* (*i-PRF*) dažādām medicīniskām procedūrām, kā arī, lai uzlabotu angiogēno potenciālu, balstoties iespējā kombinēt *i-PRF* ar dažādiem biomateriāliem [5, 31]. 1. attēlā parādītas *i-PRF* un *A-PRF* priekšrocības.



1. att. Divu autologo trombocītiem bagātināto koncentrātu *i-PRF* un *A-PRF* priekšrocību salīdzinājums. Attēls izveidots ar *Biorender.com* [5].

*i-PRF* ir šķidrums injicējams *PRF*, kas nodrošina iespēju iekļaut zāles un zāļu piegādes sistēmas pirms koagulācijas. *i-PRF* ir nesens klīnikā ieviests trombocītu koncentrāts, ko var viegli kombinēt ar dažādiem biomateriāliem, lai uzlabotu biomateriālu īpašības. *i-PRF* satur ne tikai asinīs esošos autologos augšanas faktoros, bet arī šūnas, kas iesaistītas brūču dzīšanas procesā (2. att.). 2. attēla B pusē redzams, ka ne visi elementi, kas ir asinīs, pēc centrifugēšanas nonāk *PRF* slānī.



2. att. Galvenie asins (A) un *PRF* (B) elementi. Attēls izveidots ar *Biorender.com* [5].

*PRF* piemīt antibakteriāla aktivitāte, taču tā ir salīdzinoši maz pētīta, un nav pietiekami daudz datu par to, kas to ietekmē. Antimikrobiālo aktivitāti var definēt kā mikroorganismu (baktēriju, sēnīšu un vīrusu) iznīcināšanu vai augšanas kavēšanu [32]. Cilvēka organismā ir apgrūtināta brūču dzīšana iespējamo infekciju dēļ, īpaši brūcēm, kas atrodas mutes dobumā. Tādējādi *PRF* izmantošanas panākumi varētu būt saistīti ar tā pretmikrobu īpašībām. Pilnībā autologs otrās paaudzes *PRF* bez piedevām, kas sagatavots, vienreiz centrifugējot, var visprecīzāk atspoguļot no asinīm iegūta materiāla pretmikrobu potenciālu. Vēl viena būtiska *PRF* īpašība ir tā spēja atbrīvot dažādus augšanas faktoros un citokīnus suprafizioloģiskās koncentrācijās, padarot to par nozīmīgu medicīnisko līdzekli, īpaši audu reģenerācijā [4]. Augšanas faktoriem ir īss bioloģiskais pussabrukšanas periods, tie ātri tiek izvadīti no asinsrites un darbojas galvenokārt lokāli. Tos kā neviendabīgu olbaltumvielu grupu izdala leikocīti un trombocīti. Trombocīti ir iesaistīti hemostāzē un aiztur augšanas faktoros alfa granulas, kas tiek aktivizētas, lai atbrīvotu šos faktoros traumas vietā [33].

Literatūrā minētie pētījumi liecina, ka *PRF* bieži lieto kombinācijā ar tādām zālēm kā metronidazols, klindamicīns, penicilīns [34], *VANKA*, teikoplanīns, gentamicīns vai amikacīns, lai izskaustu baktērijas un paātrinātu dzīšanas procesu [35]. Mūsdienās mutes, sejas un žokļu ķirurģijā novērota pastiprināta klindamicīna kā farmaceitiskā līdzekļa nepieciešamība. Klindamicīnu un *VANKA* parasti izskata kā alternatīvos līdzekļus pacientiem, kuriem ir alerģiska reakcija pret penicilīnu [36]. Pēdējā desmitgadē dažos pētījumos *PRF* apvieno ar antibiotikām antibakteriālā efekta nodrošināšanai. Pamatojoties uz apkopoto literatūru par *PRF* piemītošajām antibakteriālajām īpašībām, optimāla pieeja būtu *PRF* apvienošana ar zālēm pirms lietošanas klīniski, lai izveidotu vienotu sistēmu, nevis atsevišķu zāļu un *PRF* ievadīšanu [4]. Jāņem vērā arī tas, ka *PRF* var kalpot ne tikai kā zāļu piegādes sistēma, bet arī kā citu materiālu matrica. Zinātnieki ir pārbaudījuši iespējas apvienot *Bombyx mori* zīda fibroīna

pulveri ar *PRF*, kas iegūts pēc *Choukroun* izstrādātās metodikas. Izstrādātais materiāls uzrādīja spēju novērst periimplanta audu defektus [37]. Izskatot literatūru par periodontīta ārstēšanu, tika konstatēts, ka *PRF* kombinācijās ar citiem materiāliem var izmantot arī intraalveolāru defektu ārstēšanai. Apkopojot visus pieejamos pētījumus, novērots, ka, izmantojot *PRF* kā matricas vai iekļaujot to citā nesēju sistēmā, nav nepieciešams papildus pievienot augšanas faktorus, jo pats *PRF* ietver noteiktus augšanas faktorus. Vienīgais, kas jāņem vērā, ir vēlamā medikamenta iekapsulēšanas process un tā mijiedarbība ar citiem nesējiem, kas tiks iekļauti *PRF*. Svarīgi ir arī izpētīt, vai izmantotā nesējsistēma spēs nodrošināt kontrolētu *PRF* sastāvā esošo augšanas faktoru izdalīšanos [5].

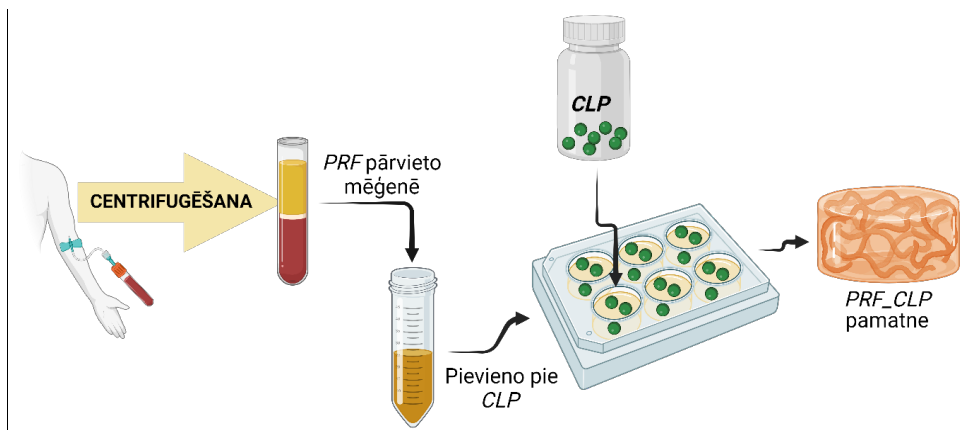
Šis promocijas darbs izceļ ar trombocītiem bagātinātā fibrīna (*PRF*) daudzpusīgo potenciālu biomedicīnas lietojumam. Nākamajās nodaļās padziļināti aplūkoti konkrēti aspekti, tostarp: 1) *PRF* spēja uzlabot klindamicīna fosfāta antibakteriālo jutību; 2) piegādes sistēmu ietekme uz zāļu izdalīšanos no *PRF* matricas; 3) nesējsistēmu ietekme uz *PRF* sastāvā esošo bioaktīvo molekulu izdalīšanos. Šo nodaļu mērķis ir sniegt visaptverošu izpratni par to, kā *PRF* var izmantot un optimizēt mērķtiecīgām un efektīvām ārstnieciskām manipulācijām.

### ***PRF* potenciāls stimulēt *CLP* antibakteriālo jutību**

Viens no visbiežāk sastopamajiem pēcoperāciju riskiem ir infekcijas, ko izraisa patogēnas un oportūnistiskas baktērijas. *S. aureus* un *S. epidermidis* ir grampozitīvas oportūnistiskas baktērijas, kas atrodas normālā cilvēka mikrobiomā [2]. Oportūnistiskās baktērijas parasti ir nekaitīgas, ja tās uzturas cilvēka vai dzīvnieka ķermenī, bet var izraisīt slimību vai infekciju, ja apstākļi to atļauj, piemēram, ja ir novājināta imūnsistēma [38].

Klindamicīnu jau daudzus gadus iesaka, lai ārstētu sabiedrībā iegūtas, pret meticilīnu rezistentas un pret meticilīnu jutīgas *S. aureus* infekcijas, un tas var arī samazināt izturību pret meticilīnu rezistentu *S. aureus* klīnisko izolātu jutību [39, 40]. Patlaban pieaug nepieciešamība izmantot klindamicīnu mutēs, sejas un žokļu ķirurģijā, īpaši žokļa osteonekrozes profilaksei un ārstēšanai [41]. To plaši izskata kā alternatīvu pacientiem ar alerģisku reakciju pret penicilīnu [36]. Klindamicīna fosfāts (*CLP*) ir klindamicīna zāļvielu prekursors, kam nav antibakteriālas aktivitātes [42]. Literatūrā aprakstīts, ka *CLP* asinīs ātri hidrolizējas par aktīvo formu (klindamicīnu) [43]. Pētījuma mērķis bija izpētīt *CLP* antibakteriālo īpašību izmaiņas pret *S. aureus* un *S. epidermidis* references kultūrām un klīniskajiem izolātiem, izmantojot *PRF* kā nesēja matricu. Viens no galvenajiem veidiem, kā novērtēt antibakteriālās īpašības, ir minimālās inhibējošās koncentrācijas (MIK) un minimālās baktericīdās koncentrācijas (MBK) noteikšana. *PRF*\_ *CLP* paraugu sagatavošanas shēma parādīta 3. attēlā.

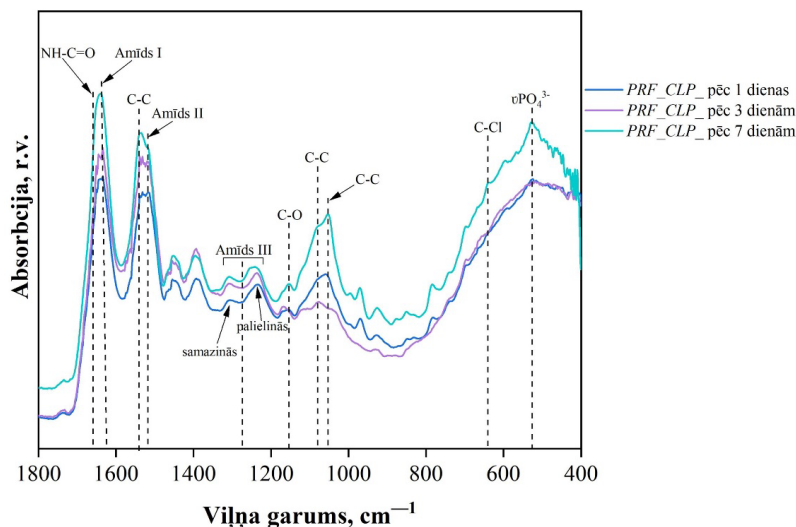
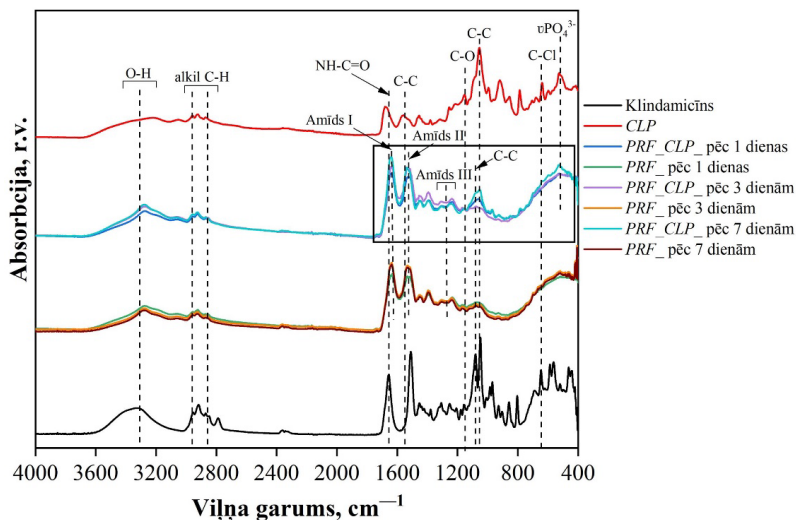




3. att. *PRF\_CLP* paraugu sagatavošanas shēma. Attēls izveidots ar *Biorender.com*.

Furjē transformācijas infrasarkanā spektrometrija (*FTIR*) darbā izmantota, lai pētītu strukturālās izmaiņas pēc klindamicīna fosfāta (*CLP*) apvienošanas ar *PRF* (4. att.). *CLP* un *PRF* kombināciju antibakteriālā efekta noteikšanai izmantoti antibakteriālie testi, paralēli apstiprinot teoriju, ka *PRF* klātbūtnē nepieciešama zemāka *CLP* koncentrācija, lai izskaustu un novērstu baktēriju augšanu (5. att.).

*FTIR* spektros attēlota *CLP* mijiedarbība ar *PRF* septiņu dienu inkubācijas periodā, novērota daļēja hidrolīze un *CLP* pārvēršanās par klindamicīnu. Pēc septiņām inkubācijas dienām tika novērota jaunas saites veidošanās ( $C-C$  pie  $1080\text{ cm}^{-1}$ ) un maksimālais fosfātu grupas absorbcijas pieaugums laika gaitā, liecinot par strukturālām izmaiņām, kas, iespējams, ir *CLP* pārvēršanās aktīvās zālēs – klindamicīnā.

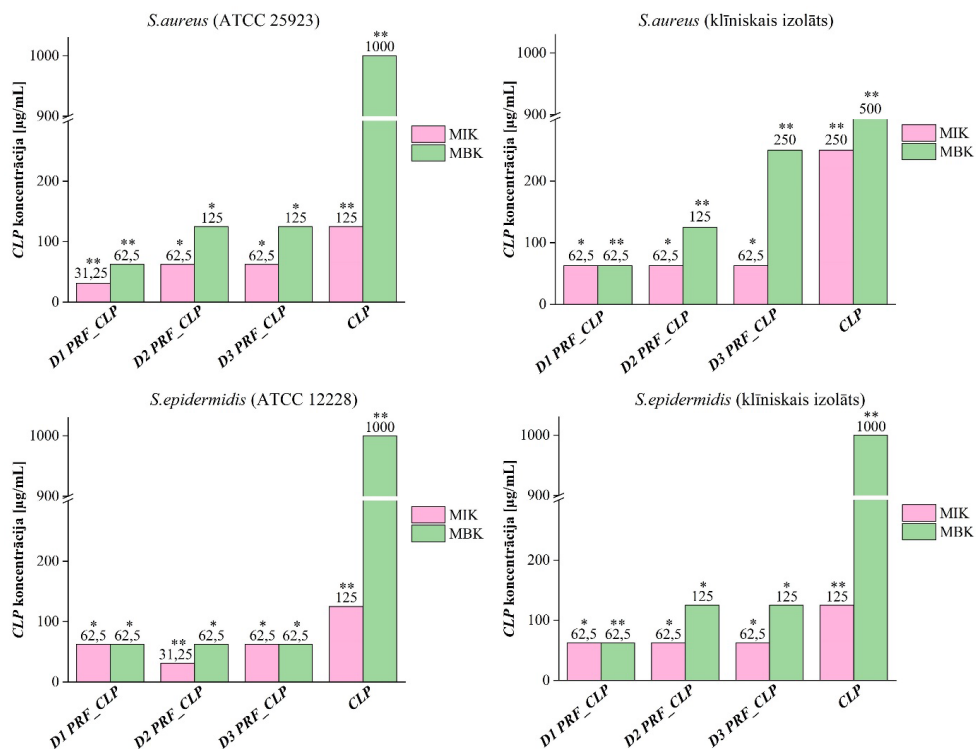


4. att. FTIR spektri: (A) PRF, PRF\_CLP, CLP un klindamicīna paraugi pilnā spektra apgabalā; (B) PRF\_CLP paraugi inkubācijas laika punktos 1800–400  $\text{cm}^{-1}$  apgabalā [2].

Katra donora asins sastāvs ietekmē parauga antibakteriālās īpašības, specifiski – arī CLP daudzumu, kas nepieciešams, lai sasniegtu antibakteriālo aktivitāti.

Salīdzinot PRF\_CLP paraugu MIK un MBK vērtības ar CLP paraugiem, novērota šo vērtību samazināšanās pret visiem analizētajiem baktēriju celmiem PRF\_CLP paraugiem. Antibakteriālie testi parādīja, ka PRF pievienošana CLP uzlabo antibakteriālo aktivitāti ne tikai pret stafilokoku references kultūrām, bet arī pret klīniskajiem izolātiem, salīdzinot ar tīru CLP paraugu. Noteikts, ka pret *S. aureus* un *S. epidermidis* baktēriju klīniskajiem izolātiem PRF\_CLP paraugos ir nepieciešama augstāka CLP koncentrācija, lai nodrošinātu zemāku MBK vērtību, salīdzinot ar abām baktēriju references kultūrām. Katram donoram asins īpašības ir

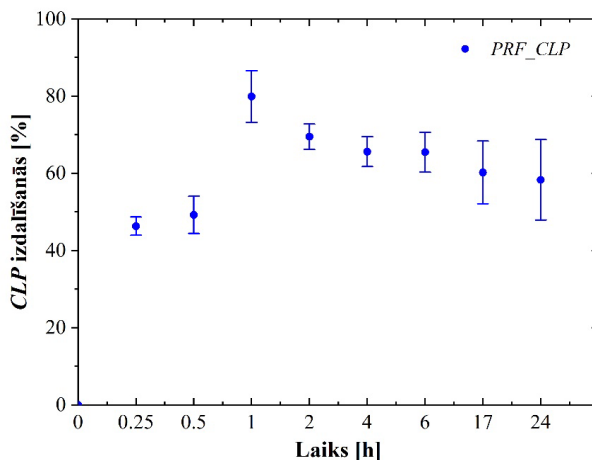
atšķirīgas (piemēram, atšķirīgs balto asins šūnu skaits vai D vitamīna līmenis), kas krasi var ietekmēt arī antibakteriālo iedarbību. Literatūrā aprakstītie *Schilcher* [44, 45] un *Kuriyama* [46] grupu pētījumi parādīja, ka tīra klindamicīna MIK vērtības klīniskajos izolātos pret meticilīnu rezistentu *S. aureus* (MRSA) var sasniegt > 256 µg/mL. Savukārt, apkopojot iegūtos datus, redzams, ka *CLP* ar *PRF* nodrošina labākas antibakteriālās īpašības nekā tīrs *CLP*, un, salīdzinot ar literatūru, ir iegūts materiāls, kas nodrošina zemākas MIK vērtības (svārstās no 62,5 µg/mL līdz 145,8 µg/mL atkarībā no baktēriju celma) nekā nepieciešams klindamicīnam (> 256 mg/mL). Atkarībā no baktēriju celma ir jāpielāgo izmantotā zāļu koncentrācija (5. att.).



5. att. MIK un MBK vērtību atšķirības starp *CLP* un *PRF\_CLP* paraugiem pret četriem baktēriju celmiem (*S. aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. aureus* (klīniskais izolāts), *S. epidermidis* (klīniskais izolāts)) visiem trim donoriem. Paraugi sagatavoti no 1. donora asinīm (D1 *PRF\_CLP*); paraugi sagatavoti no 2. donora asinīm (D2 *PRF\_CLP*); paraugi sagatavoti no 3. donora asinīm (D3 *PRF\_CLP*).

\* $p > 0,05$ ; \*\* $p < 0,05$  [2].

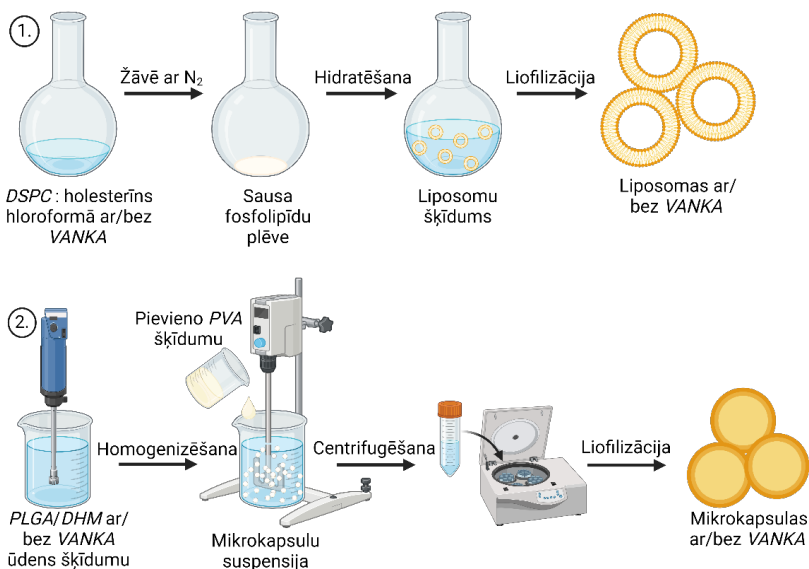
*PRF* spēja dabiski noārdīties tiek uzskatīta par priekšrocību, izmantojot to kā kontrolētu zāļu atbrīvošanas sistēmu “noliktavu”. *CLP* izdalīšanās dati liecina, ka *PRF\_CLP* paraugu var izmantot vienas dienas lokālai terapijai, nodrošinot maksimālo *CLP* izdalīšanos (80 %) vienas stundas laikā (6. att.).



6. att. *CLP* izdalīšanās no *PRF* matricām Dulbeko modificētā Īgla vidē (*DMEM*); vidējie *CLP* izdalīšanās dati no trīs donoru *CLP-PRF* paraugiem [2].

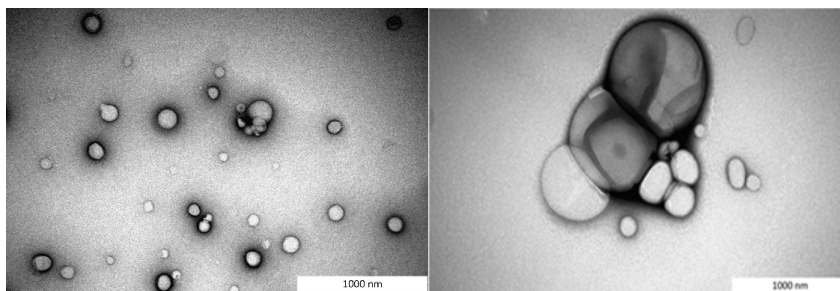
### Ievadīto piegādes sistēmu īpašību ietekme uz zāļu izdalīšanos no *PRF* matricas

Sistemātiski lietojot zāles bez noteikta nesēja, tās izplatās pa visu organismu, un bieži vien zāļu noārdīšanās ātrums ir salīdzinoši īss. Tas nodrošina ne tikai pozitīvu ietekmi uz bojātajiem audiem, bet var izraisīt arī nelabvēlīgas blakusparādības veselajiem audiem [47]. Kā novērots iepriekš aprakstītajā pētījumā [2], iejaucot zāles *PRF*, tiek uzlabotas to antibakteriālās īpašības; tomēr zāles izdalās ļoti ātri. Zāļu piegādes sistēmu mērķis ir sasniegt augstāko terapeitisko efektu ar zemāko zāļu koncentrāciju [48]. Šajā pētījumā tika izmantotas antibiotikas *VANKA*, kas iekapsulētas *PLGA* mikro kapsulās (*PLGA- $\mu$ C-VANKA*) un liposomās. 7. attēlā redzamas abu veidu piegādes sistēmu sagatavošanas shēmas. Abas izstrādātās *VANKA* piegādes metodes iekļautas *PRF* matricā, pārbaudot *PRF* spēju kontrolēti atbrīvot zāles no šādām zāļu piegādes sistēmām.



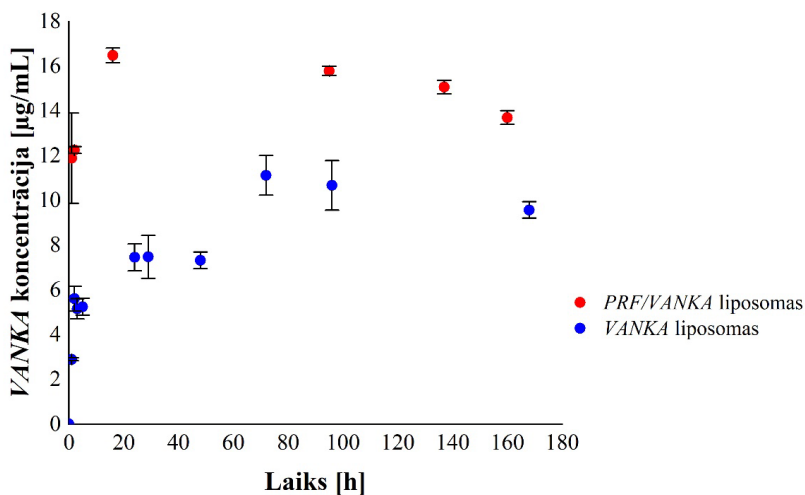
7. att. Paraugu sagatavošanas shēma: 1) liposomas ar/bez VANKA; 2) mikrokapulas ar/bez VANKA. Attēls izveidots ar Biorender.com.

Transmisijas elektronu mikroskopijas (TEM) analīze parādīja, ka sagatavotajām VANKA saturošajām liposomām ir nevienmīga izmēru variācija, turklāt novērojama liposomu divslāņu struktūra. Arī 8. attēlā redzams, ka lielākā daļa liposomu ir sfēriskas daļiņas.



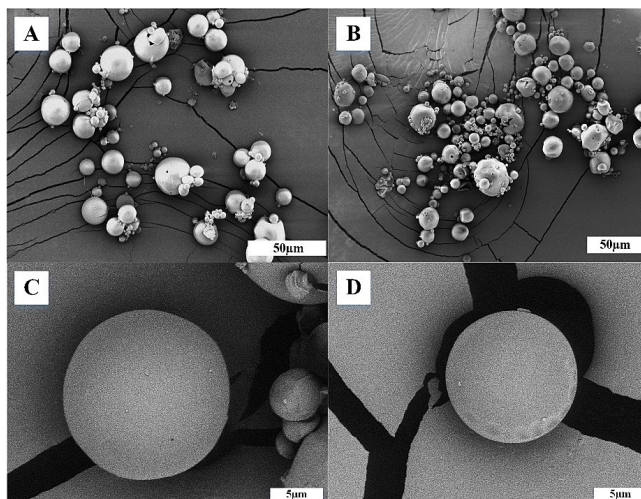
8. att. VANKA saturošu liposomu TEM attēli [13].

VANKA izdalīšanās kinētika no PRF/VANKA liposomām liecina par VANKA straujāku izdalīšanos, salīdzinot ar VANKA liposomām bez PRF matricas (9. att.). Paaugstināta VANKA koncentrācija ir skaidrojama ar to, ka PRF sastāvā esošie Ca<sup>2+</sup> joni veido čaulu ap lipīdiem, tos saspiežot un tādējādi sagraujot liposomas [49, 50]. Pamatojoties uz iegūtajiem rezultātiem, var secināt, ka Ca<sup>2+</sup> joni nelabvēlīgi ietekmē liposomas, tāpēc VANKA izdalās ātrāk un lielākā koncentrācijā.



9. att. Zāļu izdalīšanās kinētika no *PRF/VANKA* liposomām un *VANKA* liposomām [13].

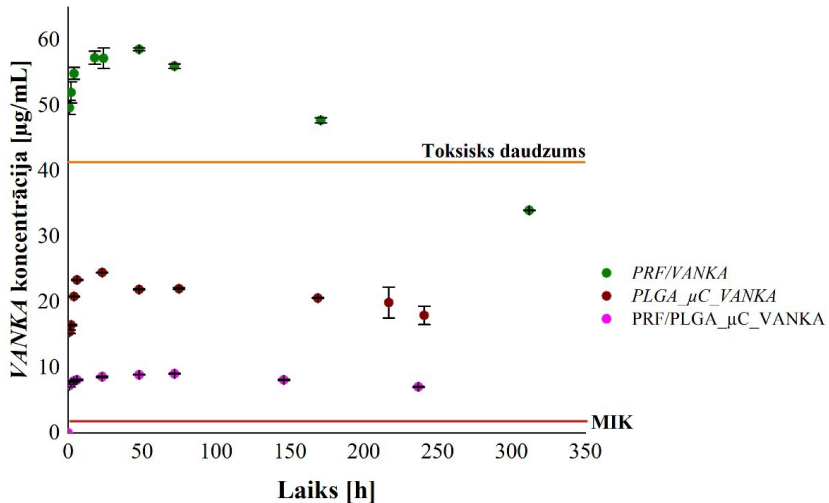
Savukārt *VANKA* saturošu *PLGA* mikro kapsulu skenējošās elektronu mikroskopijas (SEM) attēlos bija redzamas sfēriskas daļiņas ar gludu virsmu, kas liecināja par zāļu kristālu neesamību uz virsmas un apstiprināja vienmērīgu zāļu sadalījumu polimēru matricā (10. B att.).



10. att. *PLGA* mikro kapsulu virsmas SEM attēli bez (A, C) un ar (B, D) *VANKA* [13].

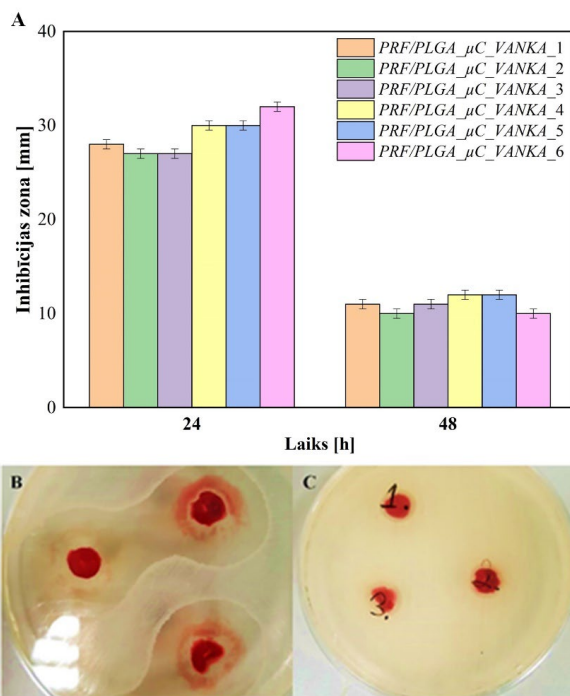
Pamatojoties uz *VANKA* izdalīšanās pētījumiem no *PLGA* mikro kapsulām (11. att.), *VANKA* izdalīšanās kinētika no *PRF* ar *VANKA* saturošām *PLGA* mikro kapsulām (*PRF/PLGA\_µC\_VANKA*) ir piecas reizes zemāka, salīdzinot ar *PRF*, kam *VANKA* pievienots neapstrādāta pulvera formā (*PRF/VANKA* paraugi), nodrošinot kontrolētu *VANKA* izdalīšanos (no sešām līdz 10 dienām) un novēršot strauju izdalīšanos. Savukārt, salīdzinot *PLGA\_µC\_VANKA* ar *PRF/PLGA\_µC\_VANKA* matricām, var novērot, ka *VANKA* izdalīšanās

koncentrācija samazinās divas reizes. Tas liecina par to, ka *PRF* matrica aizkavē *VANKA* strauju izdalīšanos. Turklāt, *PRF* matricās ienesot *VANKA* bez nesējsistēmas, netiek nodrošināta kontrolēta aktīvās *VANKA* formas piegāde terapeitiskā efekta līmenī.



11. att. Zāļu izdalīšanās no *PRF/VANKA*, *PLGA\_µC\_VANKA* un *PRF/PLGA\_µC\_VANKA* matricām [13].

Maksimālais antibakteriālās iedarbības ilgums paraugiem, kas satur *VANKA* (*PLGA\_µC\_VANKA*), tika novērots līdz 48 stundām. Pirmajās 24 stundās sterilās zonas vidējais diametrs ap paraugiem bija 30 mm. Nākamo 24 stundu laikā sterilās zonas diametrs samazinājās par 50 % (12. att.). Kā viena no risinājuma iespējām turpmākiem pētījumiem varētu būt iegūto paraugu ievietošana baktēriju suspensijā un inkubēšana, novēršot paraugu izžūšanu.



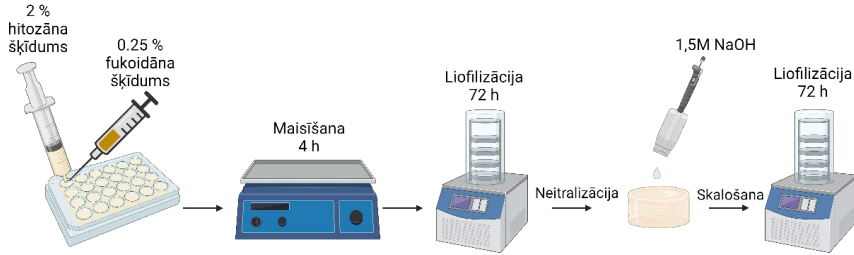
12. att. *PRF/PLGA\_μC\_VANKA* paraugu antibakteriālās īpašības: (A) inhibīcijas zonas mm; (B) sterilas zonas ap *PRF/PLGA\_μC\_VANKA* paraugiem pēc 24 stundu inkubācijas; (C) sterilas zonas ap *PRF/PLGA\_μC\_VANKA* paraugiem pēc 48 stundu inkubācijas. Petri trauciņu diametrs ir 8,5 cm [13].

Papildus spējai nodrošināt kontrolētu zāļu izdalīšanos *PRF* piemīt vēl viena būtiska īpašība – tā loma audu reģenerācijas veicināšanā, kas saistīta ar autologu augšanas faktoru un citokīnu esamību *PRF* sastāvā.

### Nesējsistēmu ietekme uz *PRF* sastāvā esošo bioaktīvo molekulu izdalīšanos

Turpmākajā pētījumā tika izstrādāti hidrogēli, kas sastāv no fukoidāna (FU) un hitozāna (CS), balstoties to bioloģiskajā saderībā un spējā veidot polielektrolītu kompleksus pašsavienšanās ceļā [28], kā arī fukoidāna spēju piesaistīt augšanas faktorus [24]. FU\_CS hidrogēla sagatavošanas shēma redzama 13. attēlā. Lai noteiktu optimālo *PRF* daudzumu un tajā esošo bioaktīvo molekulu izdalīšanās kinētiku, hidrogēliem tika pētīti šādi parametri: 1) stabilitāte, deformācija un plūsmas īpašības; 2) bioaktīvo molekulu izdalīšanās kinētika.

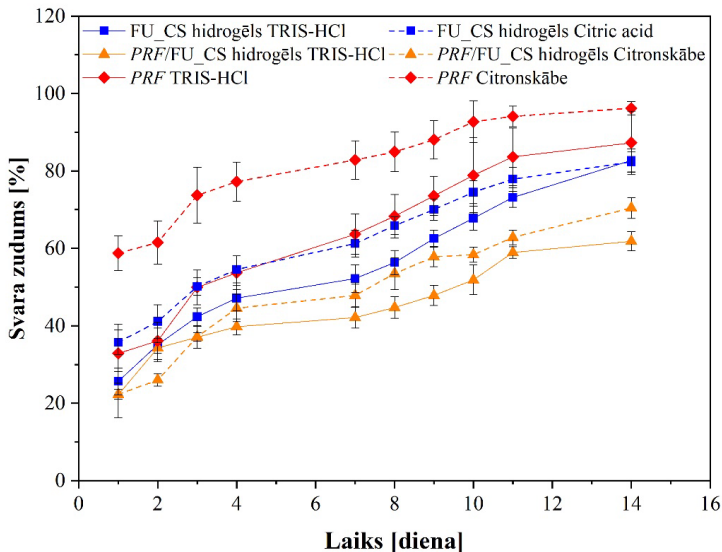




13. att. FU\_CS hidrogēlu sagatavošanas shēma. Attēls izveidots ar *Biorender.com* [51].

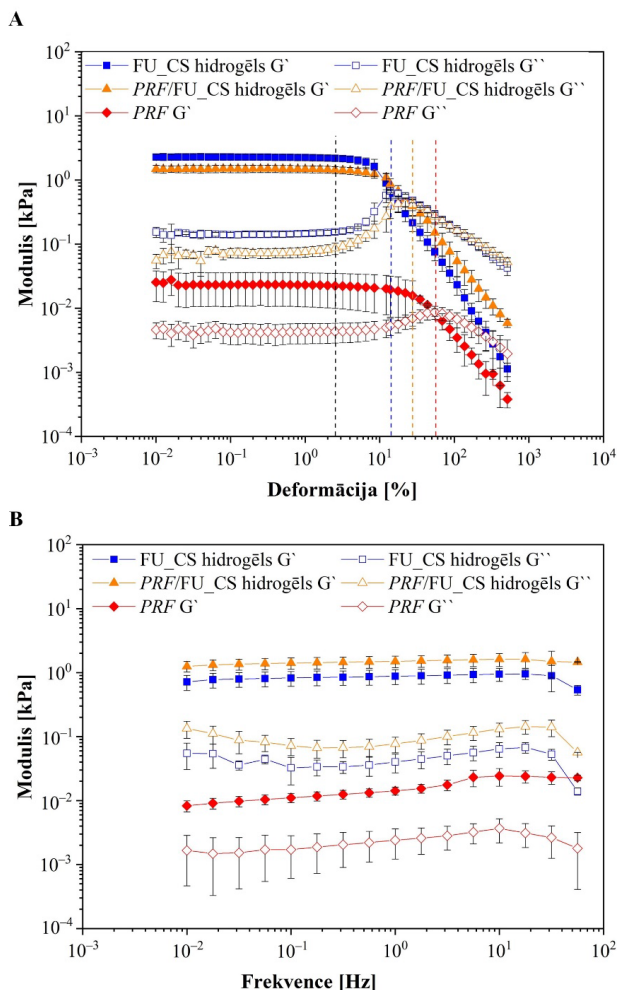
Hidrogēlu degradēšanās un reoloģiskās īpašības tika analizētas kā galvenie faktori, kas nosaka to mehānisko uzvedību un jutīgumu pret sadalīšanos, tādējādi noskaidrojot, vai *PRF* pievienošana spēj uzlabot izstrādāto hidrogēlu īpašības (14. un 15. att.). Kā nākamais solis bija izdalīto bioaktīvo molekulu (*TGF-1*, *PDGF-BB*, *VEGF*, *EGF* un *IL-8*) daudzuma noteikšana no nemodificētas *PRF* matricas un *PRF* apvienojumā ar hidrogēlu (16. att.).

Darbā noteikta FU\_CS hidrogēlu ar/bez *PRF* un tūra *PRF* degradēšanās kinētika divu nedēļu laikā TRIS-HCl un citronskābē, un iegūtie dati redzami 14. attēlā. Pamatojoties uz rezultātiem, *PRF* pievienošana FU\_CS hidrogēliem palēnināja izveidotā kompozīta hidrogēla degradēšanās ātrumu. Statistiskā analīze neatklāja būtisku atšķirību inkubācijas vides ietekmei uz FU\_CS un *PRF*/FU\_CS hidrogēlu paraugu degradēšanās kinētiku. Taču pastāv ievērojama atšķirība *PRF* degradācijas kinētikai – 14 dienu laikā *PRF* svara zudums novērots  $87,26 \pm 8,21$  % TRIS-HCl un  $96,21 \pm 1,71$  % citronskābes vidē.



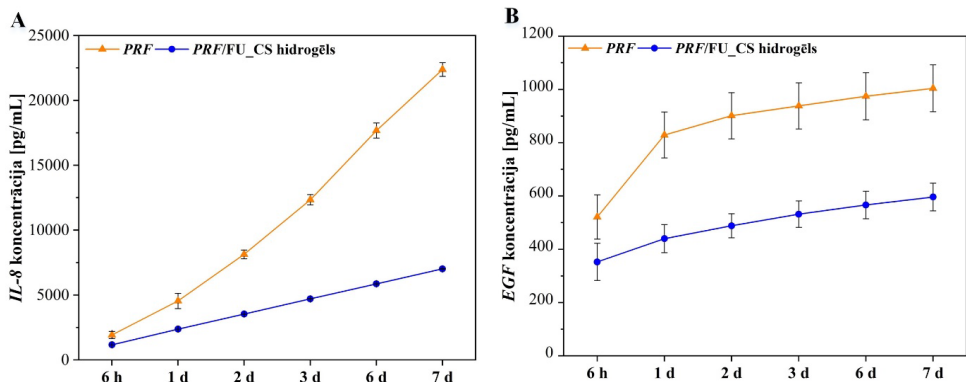
14. att. *PRF*, FU\_CS un *PRF*/FU\_CS hidrogēlu degradēšanās kinētika TRIS-HCl (ar nepārtrauktu līniju) un citronskābē (ar punktētu līniju) 37 °C temperatūrā. Visi dati ir attēloti kā vidējais  $\pm$  SD,  $n = 3$  [51].

Reoloģiskie eksperimenti izmantoti, lai izpētītu *PRF*, *FU\_CS* un *PRF/FU\_CS* hidroģēlu deformācijas un plūsmas īpašības. Visiem paraugiem raksturīga želejveida uzvedība, krājuma modulim ( $G'$ ) ievērojami pārsniedzot zuduma moduli ( $G''$ ) (15. att.). Izmantojot amplitūdas maiņas testu oscilācijas režīmā, tika noteikts konsekvents lineārais viskoelastiskais reģions (*LVER*) līdz  $\varepsilon \approx 2,5\%$  visiem paraugiem (atzīmēts ar melnu līniju 15. A attēlā),  $G'-G''$  krustošanās punkts novērots pie  $\varepsilon \approx 14\%$  *FU\_CS* hidroģēlam,  $\varepsilon \approx 28\%$  *PRF/FU\_CS* hidroģēlam un pie  $\varepsilon \approx 55\%$  *PRF* (atzīmēts ar krāsainām līnijām). Reoloģijā “ $\varepsilon$ ” apzīmē deformāciju, cik daudz materiāls ir deformējies noteikta sprieguma vai spēka ietekmē. Visos frekvenču diapazonos  $G'$  palika nemainīgs visiem paraugiem (15. B att.), liecinot par cietai struktūrai līdzīgu un stabilu iekšējo struktūru.



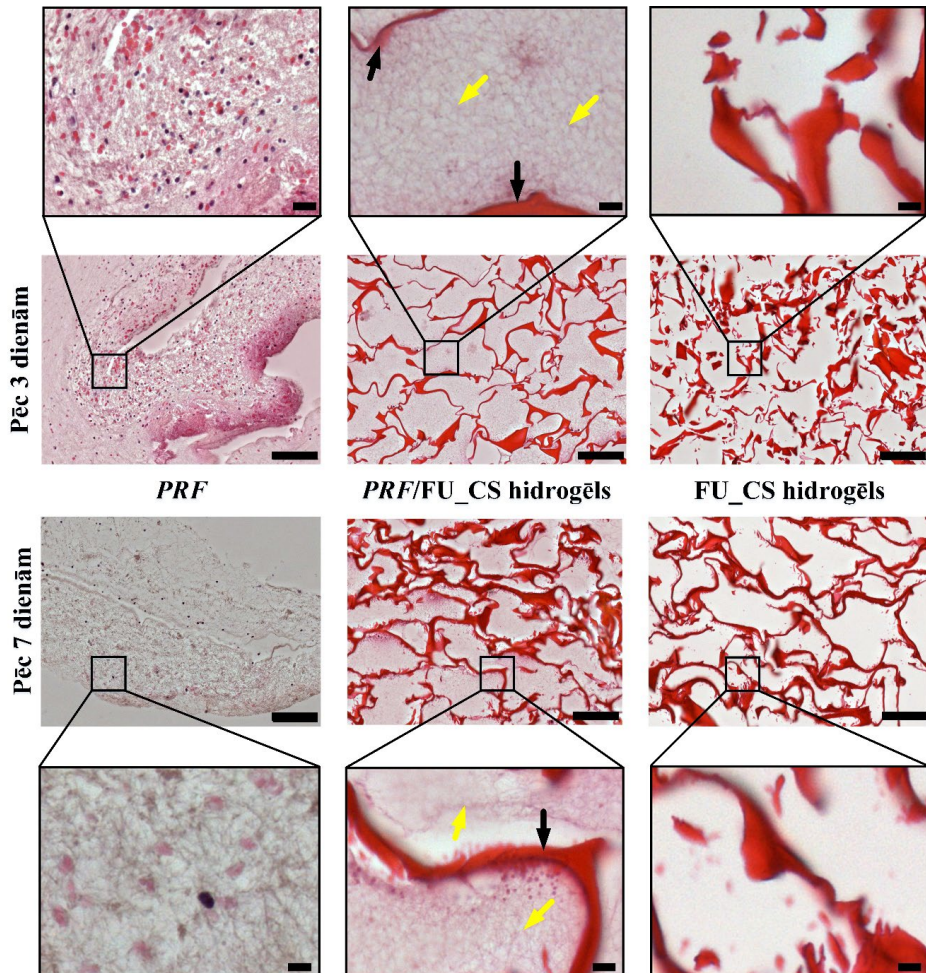
15. att. Hidrogēlu mehāniskās īpašības. **(A)** Amplitūdas maiņas tests oscilācijas režīmā FU\_CS hidrogēliem ar/bez PRF pie frekvences 1 Hz; **(B)** frekvences izmaiņas tests FU\_CS hidrogēlu ar/bez PRF pie deformācijas 0,2 %. Visi dati ir attēloti kā vidējais lielums  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) [51].

Iegūtie dati liecina, ka izstrādātais hidrogēls, kas iegūts elektrostātiskās mijiedarbības rezultātā, ļauj iekapsulēt PRF sastāvā esošos augšanas faktoros un nodrošina to pakāpenisku izdalīšanos. Novērots, ka visiem analizētajiem augšanas faktoriem un citokīniem (*TGF-1*, *PDGF-BB*, *VEGF*, *EGF* un *IL-8*) izdalīšanās koncentrācija no nemodificētiem PRF paraugiem ir augstāka nekā no PRF/FU\_CS hidrogēlu matricām. Tas liecina par to, ka FU\_CS hidrogēls var efektīvi iekļaut bioaktīvās molekulas hidrogēla matricā un ilgstoši tās izdalīt, nodrošinot to ilgtermiņa pieejamību audu inženierijas nolūkos.



16. att. Augšanas faktora un citokīna kumulatīva izdalīšanās. A–B parāda augšanas faktora un citokīna (attiecīgi *IL-8* un *EGF*) izdalīšanos katrā laika punktā [51].

Histoloģiskie pētījumi apstiprināja *PRF* iekļaušanos *FU\_CS* hidrogēla matricā, attiecīgi ļaujot atbrīvot augšanas faktoros. Pēc trīs un septiņām dienām salīdzinājums starp nemodificētu *PRF* un *PRF/FU\_CS* hidrogēlu atklāj šūnu skaita samazināšanos *PRF* matricā, tādējādi izskaidrojot bioaktīvo molekulu atbrīvošanos. Iegūtie dati arī apliecina, ka pēc septiņām dienām *PRF* joprojām ir iekļauts *FU\_CS* hidrogēla struktūrā (17. att.).



17. att. Fibrīna morfoloģija pēc trīs un septiņu dienu inkubācijas. (Mērogs = 100  $\mu\text{m}$ , palielinājumam ir mērogs – 20  $\mu\text{m}$ ; dzeltenās bultiņas norāda *PRF* klātbūtni, melnās bultiņas – hidroģēla klātbūtni) [51].

Hidroģēlu izmantošana, lai modulētu *PRF* augšanas faktoru izdalīšanās kinētiku, īpaši kombinācijās ar zālēm (potenciāli zāļu vielu prekursoriem), piedāvātu daudzsoļu iespēju uzlabot materiālu antibakteriālo aktivitāti. Turpmākajos pētījumos būtu jākoncentrējas uz zāļu un hidroģēlu īpašību mijiedarbības optimizēšanu, ilgstošas izdalīšanās modeļu izpēti un citu zāļu spēju *PRF* klātbūtnē pārveidoties aktīvākā formā, sniedzot vērtīgu ieskatu uzlabotu terapeitisko materiālu izmantošanā.

## SECINĀJUMI

1. *PRF* pievienošana ietekmē *CLP* antibakteriālo iedarbību pret *S. aureus* un *S. epidermidis* baktēriju celmiem (gan references kultūrām, gan klīniskajiem izolātiem), kā rezultātā iespējams nodrošināt zemākas MIK vērtības (no 62,5 µg/mL līdz 145,8 µg/mL atkarībā no baktērijas celms) nekā klindamicīnam (MIK > 256 µg/ml).
2. Fosfatidiholīnu liposomu kā zāļu piegādes sistēmu izmantošana *PRF* matricās nespēj nodrošināt kontrolētu *VANKA* izdalīšanos, jo to stabilitāti ietekmē *PRF* sastāvā esošie  $\text{Ca}^{2+}$  joni, tādējādi izdalot augstu zāļu koncentrāciju.
3. *PLGA* mikrokapsulu izmantošana kā zāļu piegādes sistēma *PRF* matricā var nodrošināt kontrolētu *VANKA* izdalīšanos no sešām līdz 10 dienām.
4. *FU\_CS* hidrogēls, kas izveidots elektrostatiskās mijiedarbības rezultātā, ļauj iekapsulēt *PRF* bioaktīvās molekulas (*TGF-1*, *PDGF-BB*, *VEGF*, *EGF* un *IL-8*) un nodrošināt to pakāpenisku izdalīšanos septiņu dienu laikā.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Garraud, O.; Cognasse, F. Are Platelets Cells? And if Yes, are They Immune Cells? *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 1–8, doi:10.3389/fimmu.2015.00070.
2. Egle, K.; Skadins, I.; Grava, A.; Micko, L.; Dubniks, V.; Salma, I.; Dubnika, A. Injectable Platelet-Rich Fibrin as a Drug Carrier Increases the Antibacterial Susceptibility of Antibiotic – Clindamycin Phosphate. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7407, doi: 10.3390/ijms23137407.
3. Jasmine, S.; A., T.; Janarthanan, K.; Krishnamoorthy, R.; Alshatwi, A. A. Antimicrobial and antibiofilm potential of injectable platelet rich fibrin – a second-generation platelet concentrate – against biofilm producing oral staphylococcus isolates. *Saudi J. Biol. Sci.* **2020**, *27*, 41–46, doi: 10.1016/j.sjbs.2019.04.012.
4. Micko, L.; Salma, I.; Skadins, I.; Egle, K.; Salms, G.; Dubnika, A. Can Our Blood Help Ensure Antimicrobial and Anti-Inflammatory Properties in Oral and Maxillofacial Surgery? *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1073, doi: 10.3390/ijms24021073.
5. Egle, K.; Salma, I.; Dubnika, A. From Blood to Regenerative Tissue: How Autologous Platelet-Rich Fibrin Can Be Combined with Other Materials to Ensure Controlled Drug and Growth Factor Release. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11553, doi: 10.3390/ijms22111553.
6. Sancho-Puchades, M.; Herráez-Vilas, J.M.; Berini-Aytés, L.; Gay-Escoda, C. Antibiotic prophylaxis to prevent local infection in Oral Surgery: use or abuse? *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* **2009**, *14*, E28-33.
7. Yang, Z.; Liu, J.; Gao, J.; Chen, S.; Huang, G. Chitosan coated vancomycin hydrochloride liposomes: Characterizations and evaluation. *Int. J. Pharm.* **2015**, *495*, 508–515, doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.08.085.
8. Liu, J.; Wang, Z.; Li, F.; Gao, J.; Wang, L.; Huang, G. Liposomes for systematic delivery of vancomycin hydrochloride to decrease nephrotoxicity: Characterization and evaluation. *Asian J. Pharm. Sci.* **2015**, *10*, 212–222, doi: 10.1016/j.ajps.2014.12.004.
9. Pumerantz, A.; Muppidi, K.; Agnihotri, S.; Guerra, C.; Venketaraman, V.; Wang, J.; Betageri, G. Preparation of liposomal vancomycin and intracellular killing of meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Int. J. Antimicrob. Agents* **2011**, *37*, 140–144, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.10.011.
10. Upputuri, R. T. P.; Kulandaivelu, K.; Mandal, A. K. A. Nanotechnology-Based Approach for Enhanced Bioavailability and Stability of Tea Polyphenols – A Review. In *Studies in Natural Products Chemistry*; 2016; pp. 399–410.
11. Tyle, P. *Drug Delivery*; Hillery, A., Park, K., Eds.; CRC Press, 2016; Vol. 77; ISBN 9781482217728.
12. Saeed Jan, M.; Alam, W.; Shabnam, M. Fundamentals Applications of Controlled Release Drug Delivery. In *Drug Development and Safety [Working Title]*; IntechOpen, 2023.
13. Dubnika, A.; Egle, K.; Skrinda-Melne, M.; Skadins, I.; Rajadas, J.; Salma, I. Development of Vancomycin Delivery Systems Based on Autologous 3D Platelet-Rich Fibrin Matrices for Bone Tissue Engineering. *Biomedicines* **2021**, *9*, 814, doi: 10.3390/biomedicines9070814.

14. Micko, L.; Salma, I.; Skadins, I.; Egle, K.; Salms, G.; Dubnika, A. Can Our Blood Help Ensure Antimicrobial and Anti-Inflammatory Properties in Oral and Maxillofacial Surgery? *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1073, doi: 10.3390/ijms24021073.
15. Mirjalili, F.; Mahmoodi, M. Controlled release of protein from gelatin/chitosan hydrogel containing platelet-rich fibrin encapsulated in chitosan nanoparticles for accelerated wound healing in an animal model. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, *225*, 588–604, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.11.117.
16. Rao, S. S.; Venkatesan, J.; Yuvarajan, S.; Rekha, P. D. Self-assembled polyelectrolyte complexes of chitosan and fucoidan for sustained growth factor release from PRP enhance proliferation and collagen deposition in diabetic mice. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2022**, *12*, 2838–2855, doi: 10.1007/s13346-022-01144-3.
17. Rastegar, A.; Mahmoodi, M.; Mirjalili, M.; Nasirizadeh, N. Platelet-rich fibrin-loaded PCL/chitosan core-shell fibers scaffold for enhanced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *269*, 118351, doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118351.
18. Xu, F.; Zou, D.; Dai, T.; Xu, H.; An, R.; Liu, Y.; Liu, B. Effects of incorporation of granule-lyophilised platelet-rich fibrin into polyvinyl alcohol hydrogel on wound healing. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14042, doi: 10.1038/s41598-018-32208-5.
19. Al-Maawi, S.; Herrera-Vizcaino, C.; Orlowska, A.; Willershausen, I.; Sader, R.; Miron, R. J.; Choukroun, J.; Ghanaati, S. Biologization of Collagen-Based Biomaterials Using Liquid-Platelet-Rich Fibrin: New Insights into Clinically Applicable Tissue Engineering. *Materials (Basel)*. **2019**, *12*, 3993, doi: 10.3390/ma12233993.
20. Lu, H.-T.; Lu, T.-W.; Chen, C.-H.; Lu, K.-Y.; Mi, F.-L. Development of nanocomposite scaffolds based on biomineralization of N,O-carboxymethyl chitosan/fucoidan conjugates for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *120*, 2335–2345, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.179.
21. V. K., A. D.; Udduttula, A.; Jaiswal, A. K. Unveiling the secrets of marine – derived fucoidan for bone tissue engineering – A review. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2023**, *10*, 1100164, doi: 10.3389/fbioe.2022.1100164.
22. Park, S.; Lee, K. W.; Lim, D.-S.; Lee, S. The Sulfated Polysaccharide Fucoidan Stimulates Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells Dev.* **2012**, *21*, 2204–2211, doi: 10.1089/scd.2011.0521.
23. Purnama, A.; Aid-Launais, R.; Haddad, O.; Maire, M.; Mantovani, D.; Letourneur, D.; Hlawaty, H.; Le Visage, C. Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2015**, *5*, 187–197, doi: 10.1007/s13346-013-0177-4.
24. Zeng, H.-Y.; Huang, Y.-C. Basic fibroblast growth factor released from fucoidan-modified chitosan/alginate scaffolds for promoting fibroblasts migration. *J. Polym. Res.* **2018**, *25*, 83, doi: 10.1007/s10965-018-1476-8.
25. Domalik-Pyzik, P.; Chłopek, J.; Pielichowska, K. Chitosan-Based Hydrogels: Preparation, Properties, and Applications. *Int. J. Biol. Macromol.*; 2019; pp. 1665–1693.
26. Ahmadi, F.; Oveisi, Z.; Samani, S. M.; Amoozgar, Z. Chitosan based hydrogels:



- characteristics and pharmaceutical applications. *Res. Pharm. Sci.* **2015**, *10*, 1–16.
27. Levengood, S.K.L.; Zhang, M. Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 3161, doi: 10.1039/c4tb00027g.
  28. Venkatesan, J.; Singh, S.; Anil, S.; Kim, S.-K.; Shim, M. Preparation, Characterization and Biological Applications of Biosynthesized Silver Nanoparticles with Chitosan-Fucoidan Coating. *Molecules* **2018**, *23*, 1429, doi: 10.3390/molecules23061429.
  29. Chitosan-based polyelectrolyte complexes as pharmaceutical excipients. In *Controlled Drug Delivery*; M.A. Mateescu, P. I.-S. and E.A., Ed.; Elsevier, 2015; pp. 127–161.
  30. Theodoridis, T.; Kraemer, J. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*; 2020; ISBN 9783131450715.
  31. Wend, S.; Kubesch, A.; Orłowska, A.; Al-Maawi, S.; Zender, N.; Dias, A.; Miron, R. J.; Sader, R.; Booms, P.; Kirkpatrick, C. J.; et al. Reduction of the relative centrifugal force influences cell number and growth factor release within injectable PRF-based matrices. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2017**, *28*, 188, doi: 10.1007/s10856-017-5992-6.
  32. No Title Available online: <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/antimicrobial>.
  33. Leong, D. K. C.; Benedict, B. C. T.; Chew, K. T. L. Autologous Growth Factors: A Biological Treatment in Sports Medicine. *Proc. Singapore Healthc.* **2010**, *19*, 229–236, doi: 10.1177/201010581001900309.
  34. Polak, D.; Clemer-Shamai, N.; Shapira, L. Incorporating antibiotics into platelet-rich fibrin: A novel antibiotics slow-release biological device. *J. Clin. Periodontol.* **2019**, *46*, 241–247, doi: 10.1111/jcpe.13063.
  35. Knafl, D.; Thalhammer, F.; Vossen, M. G. In-vitro release pharmacokinetics of amikacin, teicoplanin and polyhexanide in a platelet rich fibrin – layer (PRF) – a laboratory evaluation of a modern, autologous wound treatment. *PLoS One* **2017**, *12*, e0181090, doi: 10.1371/journal.pone.0181090.
  36. Maestre-Vera, J. R. Treatment options in odontogenic infection. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* **2004**, *9 Suppl*, 25–31; 19–24.
  37. Jang, E.-S.; Park, J.-W.; Kweon, H.; Lee, K.-G.; Kang, S.-W.; Baek, D.-H.; Choi, J.-Y.; Kim, S.-G. Restoration of peri-implant defects in immediate implant installations by Choukroun platelet-rich fibrin and silk fibroin powder combination graft. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology* **2010**, *109*, 831–836, doi: 10.1016/j.tripleo.2009.10.038.
  38. Schmidt, T. *Encyclopedia of Microbiology 4th ed.*; Faculty Bookshelf. 260, 2019; ISBN 9780128117378.
  39. Martinez-Aguilar, G.; Hammerman, W. A.; Mason, E. O.; Kaplan, S. L. Clindamycin treatment of invasive infections caused by community-acquired, methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2003**, *22*, 593–599, doi: 10.1097/01.inf.0000073163.37519.ee.
  40. Mohamed, M. A.; Nasr, M.; Elkhatib, W. F.; Eltayeb, W. N.; Elshamy, A. A.; El-Sayyad, G. S. Nanobiotic formulations as promising advances for combating MRSA resistance: susceptibilities and post-antibiotic effects of clindamycin, doxycycline, and linezolid. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 39696–39706, doi: 10.1039/D1RA08639A.

41. Fortunato, L.; Bennardo, F.; Buffone, C.; Giudice, A. Is the application of platelet concentrates effective in the prevention and treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw? A systematic review. *J. Cranio-Maxillofacial Surg.* **2020**, *48*, 268–285, doi: 10.1016/j.jcms.2020.01.014.
42. Li, H.; Deng, J.; Yue, Z.; Zhang, Y.; Sun, H.; Ren, X. Clindamycin hydrochloride and clindamycin phosphate: two drugs or one? A retrospective analysis of a spontaneous reporting system. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2017**, *73*, 251–253, doi: 10.1007/s00228-016-2161-7.
43. Borin, M. T.; Powley, G. W.; Tackwell, K. R.; Batts, D. H. Absorption of clindamycin after intravaginal application of clindamycin phosphate 2 % cream. *J. Antimicrob. Chemother.* **1995**, *35*, 833–841, doi: 10.1093/jac/35.6.833.
44. Schilcher, K.; Andreoni, F.; Uchiyama, S.; Ogawa, T.; Schuepbach, R. A.; Zinkernagel, A.S. Increased Neutrophil Extracellular Trap–Mediated Staphylococcus aureus Clearance Through Inhibition of Nuclease Activity by Clindamycin and Immunoglobulin. *J. Infect. Dis.* **2014**, *210*, 473–482, doi: 10.1093/infdis/jiu091.
45. Schilcher, K.; Andreoni, F.; Dengler Haunreiter, V.; Seidl, K.; Hasse, B.; Zinkernagel, A. S. Modulation of Staphylococcus aureus Biofilm Matrix by Subinhibitory Concentrations of Clindamycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 5957–5967, doi: 10.1128/AAC.00463-16.
46. Kuriyama, T.; Karasawa, T.; Nakagawa, K.; Saiki, Y.; Yamamoto, E.; Nakamura, S. Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic infections. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology* **2000**, *90*, 600–608, doi: 10.1067/moe.2000.109639.
47. Safari, J.; Zarnegar, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. *J. Saudi Chem. Soc.* **2014**, *18*, 85–99, doi: 10.1016/j.jscs.2012.12.009.
48. Li, J.; Wang, X.; Zhang, T.; Wang, C.; Huang, Z.; Luo, X.; Deng, Y. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J. Pharm. Sci.* **2015**, *10*, 81–98, doi: 10.1016/j.ajps.2014.09.004.
49. Hinch, D. K. Effects of calcium-induced aggregation on the physical stability of liposomes containing plant glycolipids. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* **2003**, *1611*, 180–186, doi: 10.1016/S0005-2736(03)00053-1.
50. Melcrová, A.; Pokorna, S.; Pullanchery, S.; Kohagen, M.; Jurkiewicz, P.; Hof, M.; Jungwirth, P.; Cremer, P. S.; Cwiklik, L. The complex nature of calcium cation interactions with phospholipid bilayers. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–12, doi: 10.1038/srep38035.
51. Egle, K.; Dohle, E.; Hoffmann, V.; Salma, I.; Al-Maawi, S.; Ghanaati, S.; Dubnika, A. Fucoidan/chitosan hydrogels as carrier for sustained delivery of platelet-rich fibrin containing bioactive molecules. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *262*, 129651, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.129651.



**Karina Egle** dzimusi 1995. gadā Daugavpilī. Rīgas Tehniskajā universitātē (RTU) ieguvusi inženierzinātņu bakalaura (2018) un inženierzinātņu maģistra (2020) grādu ķīmijas tehnoloģijā. Kopš 2018. gada strādā RTU. Patlaban ir RTU Dabaszinātņu un tehnoloģiju fakultātes Biomateriālu un bioinženierijas institūta pētniece.

Zinātniskās intereses saistītas ar trombocītiem bagātināta fibrīna pētījumiem to lietojumam mutes, sejas un žokļu ķirurģijā. Piedalās zinātnisko projektu rakstīšanā un izstrādē.