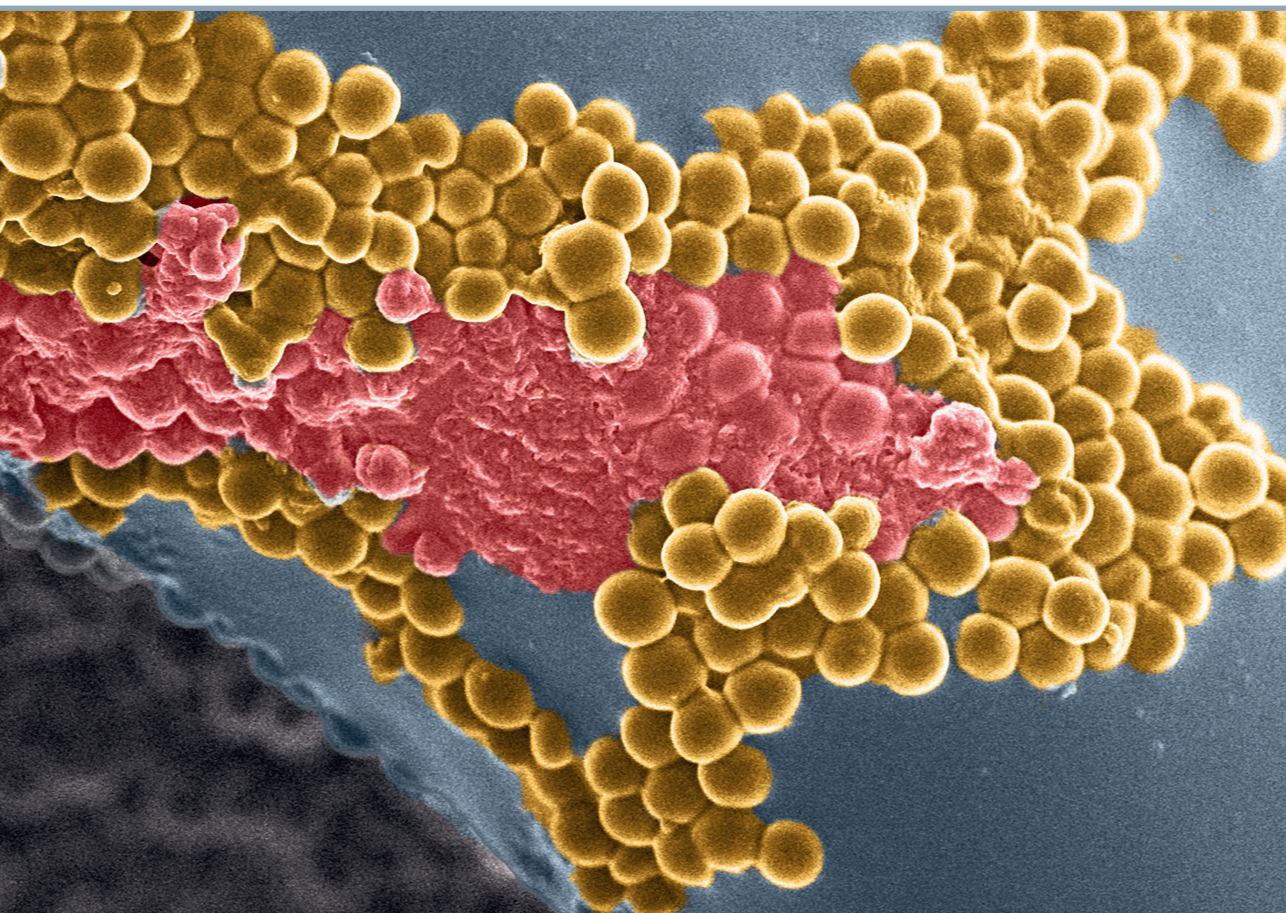


Artemijs Ščeglovs

INJICĒJAMO ANTIBAKTERIĀLO HIDROGELU IZSTRĀDE AUDU INŽENIERIJAI

Promocijas darba kopsavilkums



RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE

Dabaszinātņu un tehnoloģiju fakultāte
Biomateriālu un bioinženierijas institūts

Artemijs Ščeglovs

Doktora studiju programmas “Ķīmija, materiālzinātne un tehnoloģijas” doktorants

INJICĒJAMU ANTIBAKTERIĀLU HIDROGELU IZSTRĀDE AUDU INŽENIERIJAI

Promocijas darba kopsavilkums

Zinātniskās vadītājas

profesore *Dr. sc. ing.*

KRISTĪNE ŠALMA-ANCĀNE

profesore *Dr. med.*

JUTA KROIČA

RTU Izdevniecība

Rīga 2026

Ščeglovs, A. Injicējamo antibakteriālo hidrogelu izstrāde audu inženierijai. Promocijas darba kopsavilkums. Rīga: RTU Izdevniecība, 2026. 45 lpp.

Publicēts saskaņā ar promocijas padomes "RTU P-02" 2025. gada 13. oktobra lēmumu, protokols Nr. 04030-9.2/8.

Promocijas darba pētījumi izstrādāti, pateicoties Latvijas Zinātnes padomes pētniecības projektam Nr. lzp-2020/1-0072 "Injicējami bioaktīvi biokompozītmateriāli osteoporotisku kaulaudu reģenerācijai (*inBioBone*)" un Eiropas Savienības pētniecības un inovāciju programmai "Apvārsnis 2020", grantu līgums Nr. 857287. Baltijas Biomateriālu ekselences centrs (*BBCE*). Promocijas darbu atbalstīja arī Eiropas Savienības pētniecības un inovāciju programma "Apvārsnis 2020", grantu līgums Nr. 952347 (*RISEus2*), kā arī Konsolidācijas un pārvaldības izmaiņu ieviešana Rīgas Tehniskajā universitātē, LiepU, RTA, LJA un LJK virzībai uz izcilību augstākajā izglītībā, zinātnē un inovācijās C4835.Dok.1025 Projekta Nr. 5.2.1.1.i.0/2/24/I/CFLA/003.



Vāka attēla autors *Dr. phys.* Krišjānis Šmits.

<https://doi.org/10.7250/9789934372506>

ISBN 978-9934-37-250-6 (pdf)

PATEICĪBAS

Liels paldies visai manai ģimenei un draugiem, kuru saraksts ir tik liels, ka bezgalība nestāv blakus, par atbalstu! Jūs vienmēr esat mana galvenā motivācija, laime un mīlestība, pozitīvo emociju avots un veids, kā uz mirkli aizmirst par visu, kas notiek apkārt! Pateicos arī par to, ka vienmēr esat blakus jebkuros dzīves momentos!

Paldies arī manam vecajam labajam kolektīvam – Sofjai, Karīnai, Elīzai, Kristīnei A., Kristīnei I., Andai, Signei, Janai, Līgai, Kristapam R., Agnesei, Lāsmai, Valentīnai un Vītai, kā arī jaunajam labajam kolektīvam – Annai R., Anastasijai T., Iljanai, Terezai, Laumai, *Jingzhi*, *Oznur*, Viktoram par palīdzību darbā, idejām un sarunām, kad vajadzēja atpūsties no darba rutīnas!

Pateicos visiem, ar kuriem man bija iespēja strādāt/mācīties kopā un par ieguldījumu šī darba izstrādē un paveikto promocijas darba aizstāvēšanai – *Jacek K. Wychowaniec*, *Claudia Siverino*, *Marco Chitto*, Ingus Skadiņš, Inese Čakstiņa-Dzērve, Valdis Pirsko, *Matteo D'Este*, *Fintan T. Moriarty* un *Charlotte Edwards-Gayle*!

Pieredzējušie zinātnieki un mani mentori – profesors Jānis Ločs, profesore Dagnija Loča, asociētā profesore Arita Dubņika un mana promocijas darba vadītāja profesore Juta Kroiča – milzīgs paldies jums par ieteikumiem, par kopā pavadīto laiku, par spēju atrast momentu, kad uzslavēt un kad aizrādīt, kad palīdzēt un kad ļaut patstāvīgi tikt galā!

No visa sirds vēlētos pateikties manai darba vadītājai profesorei *Dr. sc. ing.* Kristīnei Šalmai-Ancānei par kopā pastrādāto un pārdzīvoto, kā arī par spēju tajā vai citā mērā apvienot visu to, kas iepriekš tika minēts!

“.....*Where there is desire, there is gonna be a flame
Where there is a flame, someone's bound to get burned
But just because it burns doesn't mean you're gonna die
You've gotta get up and try, try, try.....*”

(Alecia Beth Moore, also known as Pink)

PROMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS ZINĀTNES DOKTORA GRĀDA IEGUŠANAI RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ

Promocijas darbs zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2026. gada 20.februārī plkst. 11 Rīgas Tehniskās universitātes Dabaszinātņu un tehnoloģiju fakultātē, Paula Valdena ielā 3, 272. auditorijā.

OFICIĀLIE RECENZENTI

Tenūrprofesors *Dr. sc. ing.* Sergejs Gaidukovs,
Rīgas Tehniskā universitāte

MD Ph. D. nefrologs Kārlis Rāčenis,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Ph. D. Nihal Engin Vrana,
uzņēmums “*SPARTHA MEDICAL*”, Francija

APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājis 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.

Artemijs Ščeglovs (paraksts)

Datums:

Promocijas darbs sagatavots kā tematiski vienota zinātnisko publikāciju kopa. Tajā ir kopsavilkums latviešu un angļu valodā un piecas *SCI* publikācijas. Publikācijas uzrakstītas angļu valodā, to kopējais apjoms ir 174 lpp.

ANOTĀCIJA

Šajā promocijas darbā tika veikta jaunu ķīmiski šķērssaistītu hidrogeļu sintēze uz divu dabiskas izcelsmes biopolimēru, antimikrobiālā polipeptīda – ϵ -polilizīna (ϵ -PL) – un bioloģiski aktīvas hialuronskābes (HA), bāzes un šo hidrogeļu visaptverošs raksturojums. Šī pētījuma galvenais mērķis bija izstrādāt antibiotikas nesaturošus, dabiski antibakteriālus biomateriālus uz hidrogeļu bāzes inficēto audu atjaunošanai un dzīšanai. Šis darbs tika sadalīts divos galvenajos posmos, kas ietvēra kovalenti šķērssaistītas hidrogeļa matricas sintēzi ar turpmāku fizikālķīmisko īpašību, tādu kā molekulārās struktūras, morfoloģijas, gela frakcijas, uzbriešanas pakāpes, reoloģisko īpašību raksturošanu un analīzi. Pirmajā posmā tika pētīta arī tvaika sterilizācijas ietekme uz izstrādāto hidrogeļu fizikālķīmiskajām īpašībām. Turklāt tika novērtēta tīra antimikrobiālā polipeptīda ϵ -PL, kā arī sintezēto ϵ -PL/HA hidrogeļu antibakteriālā aktivitāte un citotoksicitātes profils *in vitro*. Minimālās inhibējošās koncentrācijas (MIC), minimālās baktericīdās koncentrācijas (MBC) vērtības un rezistences veidošanās pētījumi tīram ϵ -polilizīnam (ϵ -PL), kā arī sintezēto hidrogeļu antibakteriālā aktivitāte tika novērtēta gan īstermiņā (pēc 24 stundām), gan ilgtermiņā (līdz pat 168 stundām) pret plaši pazīstamiem gramnegatīviem un grampozitīviem patogēno baktēriju celmiem, tostarp ATCC references *Escherichia coli* un *Staphylococcus aureus* (*E. coli* un *S. aureus*), klīniski izolētām *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), kā arī multirezistentām, grūti ārstējamām meticilīna rezistentām *S. aureus* (MRSA) un paplašināta spektra β -laktamāzes producējošo *E. coli* (ESBL *E. coli*) baktērijām. Citotoksicitātes profils tika novērtēts, izmantojot Balb/c 3T3 peļu fibroblastu (tiešais kontakta tests) un cilvēka ādas fibroblastu (netiešais/ekstrakta tests) šūnu līnijas. Otrajā posmā antibakteriālā ϵ -PL/HA hidrogeļa matrica tika funkcionalizēta ar bioaktīvām stroncija aizvietotām hidroksilapatīta (Sr-HAp) nanodaļiņām, lai izstrādātu antibakteriālus un bioaktīvos injicējamus hidrogelus kaulaudu reģenerācijai. Lai izvērtētu lietojumam specifisko veikspēju, tika novērtētas fizikālķīmiskās un bioloģiskās īpašības, tostarp ilgstoša (līdz 168 h) antibakteriālā aktivitāte pret *E. coli*, *S. aureus*, MRSA un ESBL *E. coli* baktērijām.

Promocijas darbs ir izstrādāts kā zinātnisko rakstu kopa. Zinātnisko rakstu kopsavilkums uzrakstīts latviešu un angļu valodā. Tas ietver četras zinātniskās oriģinālpublikācijas un vienu apskatrakstu. Katrs kopsavilkums ietver 10 attēlus un vienu tabulu, tā apjoms – 45 lappuses.

IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI

3D	trīsdimensionāls
AMP	antimikrobiālie peptīdi
AMR	antimikrobiālā rezistence
ATCC	Amerikas Kultūru tipa kolekcija
Balb/c 3T3	fibroblastu šūnas, izolētas no BALB/c peļu embrijiem
BSA	liellopu seruma albumīns
CLSI	Klīnisko un laboratorijas standartu institūts
CaP	kalcija fosfāti
CDC	Slimību kontroles un profilakses centrs
CRAB	pret karbapenēmu rezistents <i>Acinetobacter baumannii</i>
CRPA	pret karbapenēmu rezistents <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
E/E"	saspiešanas krājuma/zuduma modulis
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	ekstracelulāra matrice
EDC	1-etil-3-(3-dimetilamīnpropil) karbodiimīds
ε-PL	ε-polilizīns
EPS	eksopolisaharīdi
ESBL	paplašināta spektra β-laktamāzi producējošs baktēriju celms
ES MDR	Eiropas Savienības Medicīnisko ierīču regula
EU-CAST	Eiropas Antimikrobiālās jutības noteikšanas komiteja
FDA	ASV Pārtikas un zāļu pārvalde
FTIR	Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija
G'/G"	krājuma/zuduma modulis
GAG	glikozaminoglikāni
GEN	gentamicīns
HA	hialuronskābe
HAp	hidroksilapatīts
HCl	sālsskābe
HDF	cilvēka ādas fibroblasti
<i>in vitro</i>	eksperimentāli pētījumi ārpus dzīvā organisma
LVR	lineārais viskoelastības reģions
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MBC	minimālā baktericīdā koncentrācija
MIC	minimālā inhibējošā koncentrācija

MRSA	pret meticilīnu rezistents <i>Staphylococcus aureus</i> .
NaCl	nātrija hlorīds
NaOH	nātrija hidroksīds
NDB	dabiskas izcelsmes biopolimērs
aNDB	antibakteriāls dabiskas izcelsmes biopolimērs
NHS	N-hidroksisukcinimīds
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PRSP	pret penicilīnu rezistents <i>Streptococcus pneumoniae</i>
PVA	polivinilspirts
RGD	arginīna-glicīna-asparagīnskābe
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SAXS	mazo leņķu rentgenstaru izkliedēšanas analīze
SCI	recenzēti zinātniski žurnāli
SEM	skenējošā elektronu mikroskopija
Sr-HAp	stroncija aizvietots hidroksilapatīts
USD	Amerikas Savienoto Valstu dolārs
VAN	vankomicīns
VRE	pret vankomicīnu rezistenti <i>enterokoki</i>
PVO	Pasaules Veselības organizācija

SATURS

PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS	9
Ievads un literatūras apskats	9
Mērķis un uzdevumi	12
Aizstāvēšanai izvirzītas tēzes	13
Zinātniskā novitāte	13
Praktiskā nozīme	13
Darba struktūra un apjoms	14
Publikācijas un promocijas darba aprobācija	14
PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI	18
Dabiskas izcelsmes biopolimēru (<i>NDB</i>) potenciāls kā alternatīvi antibakteriālie līdzekļi audu inženierijas pielietojumam (1. Publikācija)	18
Jaunas antibakteriālās ķīmiski šķērssaistītas hidroģēlu matricas izstrāde (2. Publikācija) ...	19
Ķīmiski šķērssaistītu ϵ -PL/HA hidroģēlu sintēzes metodes optimizācija, topoloģijas novērtēšana un tvaika sterilizācijas ietekme uz fizikālķīmiskajām un antibakteriālajām īpašībām (3. Publikācija)	24
ϵ -PL/HA hidroģēlu antibakteriālā potenciāla un citotoksicitātes novērtēšana <i>in vitro</i> (4. Publikācija)	29
Antibakteriālu Sr-HAp funkcionalizētu ϵ -PL/HA hidroģēlu sintēze un raksturojums (5. Publikācija)	33
SECINĀJUMI	37
ATSAUCES	38

PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

Ievads un literatūras apskats

Saskaņā ar Pasaules Veselības organizācijas (PVO) datiem bakteriālas infekcijas izraisa 13,6 % no cilvēku mirstības, kas ir aptuveni katrs astotais nāves gadījums pasaulē [1]. Vienīgā stratēģija bakteriālo infekciju ārstēšanai un profilaksei veselības aprūpē joprojām ir antibiotikas, jo alternatīvas neantibiotiskas ārstēšanas iespējas ir ierobežotas, izņemot “pēdējās izvēles” baktēriofāgu terapiju. Šādi “pēdējās izvēles” apstākļi ir cieši saistīti ar baktēriju rezistences pret antibiotikām pieaugumu. PVO un Slimību kontroles un profilakses centrs (CDC) atzīst, ka antimikrobiālā rezistence (AMR) ir globāla krīze, ko veicina pret “pēdējās izvēles” antibiotikām rezistentu patogēnu pieaugošā izplatība. Jau gadu desmitiem pieaug ar AMR saistīto patogēnu saraksts, kas ir izraisījuši simtiem tūkstošu nāves gadījumu. To vidū ir pret penicilīnu rezistentās *Streptococcus pneumoniae* (PRSP), pret karbapenēmiem rezistentās *Pseudomonas aeruginosa* un *Acinetobacter baumannii* (CRPA un CRAB), pret meticilīnu rezistentās *Staphylococcus aureus* (MRSA), pret vankomicīnu rezistentās *enterokoki* (VRE) un paplašināta spektra β -laktamāzes (ESBL) producējošas *Escherichia coli* (*E. coli*) baktērijas. Turklāt tiek lēsts, ka līdz 2050. gadam ar AMR saistīto nāves gadījumu skaits varētu pārsniegt 10 miljonus gadā. Lai cīnītos ar šo pieaugošo krīzi, PVO Globālajā rīcības plānā ir uzsvērtā steidzama nepieciešamība izstrādāt alternatīvas antibiotikas nesaturošas stratēģijas [2].

Lai gan antibakteriālie dabiskas izcelsmes biopolimēri (*aNDB*) [3]–[5] jau sen tiek izmantoti biomedicīnā, to pētniecība pēdējā desmitgadē ir strauji attīstījusies. Atšķirībā no citiem biomedicīnā izmantotajiem biopolimēriem, kas var būt gan dabiskas (hialuronskābe, želatīns utt.), gan sintētiskas (polivinilspirts (*PVA*), polietilēnglikols (PEG) u. c.) izcelsmes, *aNDB* iegūst no dabiskiem avotiem (augiem, sēnēm, mikroorganismiem, aļģēm un dzīvniekiem), un tiem piemīt biosaderība un dabiska antibakteriāla aktivitāte bez papildu ķīmiskās modifikācijas [4]. Interese par *aNDB* kā antibakteriāliem līdzekļiem biomateriālu izstrādē ir strauji pieaugusi, un kopš 2015. gada publikāciju skaits par to izmantošanu ir palielinājies par gandrīz 400 %. Šo pieaugošo tendenci galvenokārt nosaka *aNDB* atzīšana par daudzsoļām antibakteriālām molekulām lokālas piegādes lietojumiem, kas piedāvā gan biosaderību, gan antibakteriālo iedarbību pret patogēnajām baktērijām. Turklāt tiek uzsvērts, ka baktēriju spēja attīstīt rezistenci pret šādām vielām ir ievērojami mazāka, jo *aNDB* antibakteriālās aktivitātes mehānisms un mērķa specifiskums būtiski atšķiras no tradicionālajām antibiotikām [4]. Vairāki pētījumi apliecina, ka ir izstrādāti dažādi biomateriāli ar ievērojamu antibakteriālo aktivitāti, kuru pamatā ir dabīgas izcelsmes antibakteriālie biopolimēri (*aNDB*), tostarp zāļu piegādes sistēmas, oftalmoloģiskās kontaktlēcas, injicējami kaulu cementi, medicīnisko ierīču un implantu pārklājumi, mikrošķiedru plāksteri, brūču pārsēji, nanodaļiņas, nanošķiedras un hidrogeļi [2], [6]–[8]. Šādi *aNDB* ir hitozāns, κ -karagīnāns, algināts, pektīns, o-pullulāns, fukoidāns, hondroitīna sulfāts, baktēriju ražotie eksopolisaharīdi, kā arī antimikrobiālie peptīdi (AMP) [2], [6]–[12].

Hidrogeļi ir kļuvuši par daudzsoļošu biomateriālu klasi biomedicīnā, pateicoties to augstajai biosaderībai, pielāgojamām mehāniskajām īpašībām un spējai imitēt cilvēka audu ekstracelulāro matricu (ECM). Šīs īpašības padara hidrogeļus īpaši piemērotus audu inženierijā

un reģeneratīvajā medicīnā, jo tie spēj atbalstīt šūnu adhēziju, proliferāciju un diferencēšanu, tādējādi veicinot audu reģenerāciju. Pēdējās desmitgades laikā pētījumi arvien vairāk koncentrējas uz hidroģelu izstrādi ar antibakteriālo funkcionalitāti, lai risinātu kritisko klīnisko problēmu, kas saistīta ar inficētu audu atjaunošanu un dzīšanu. Viena no visefektīvākajām stratēģijām ietver antibakteriālu hidroģelu izstrādi uz *aNDB* bāzes. Šiem dabiski antibakteriālajiem hidroģeliem piemīt vairākas priekšrocības, tostarp pārmērīgas antibakteriālo līdzekļu vai antibiotiku lietošanas riska mazināšana, vienkāršots sastāvs, augsta biosaderība un ilgstoša antibakteriālā efektivitāte [13]. Papildus audu infekciju kontrolei tiek pētītas arī hidroģelu lietošanas iespējas kaulaudu reģenerācijā. Kaulu defekti un lūzumi, ko izraisa tādas slimības kā osteoporoze, osteosarkoma un smagu traumu izraisīti kaulu lūzumi, ir nozīmīgs globāls slogs veselībai, kas skar vairāk nekā 200 miljonus cilvēku visā pasaulē un rada ekonomiskas izmaksas, kas pārsniedz 100 miljonus ASV dolāru gadā [14], [15]. Šos stāvokļus bieži vien sarežģī paaugstināts infekcijas risks, īpaši atvērtu lūzumu, ķirurģisku iejaukšanos un imūnsupresētu pacientu gadījumos. Posttraumatiskais osteomielīts, periprostētisko locītavu infekcijas un ar implantiem saistītās infekcijas joprojām ir būtiskas klīniskās problēmas, kas bieži izraisa aizkavētu kaulu dzīšanu, implantu atgrūšanu un pat letālu iznākumu. Tāpēc daudzfunkcionālu, uz kaulaudiem vērstu antibakteriālu biomateriālu ar reģeneratīvu potenciālu izstrāde ir kļuvusi par vienu no vadošajiem pētniecības virzieniem ar mērķi uzlabot ārstēšanas efektivitāti un novērst ar infekcijām saistītās komplikācijas kaulu dzīšanas un reģenerācijas procesā.

Daudzsološa pieeja šajā jomā ir hidroģela matricas biofunkcionalizēšana ar bioaktīvām un osteogēnām neorganiskām sastāvdaļām, piemēram, kalcija fosfāta (CaP) savienojumiem. CaP biomateriāli, piemēram, hidroksilapatīts (HAp), uzrāda augstu biosaderību un bioaktivitāti fizioloģiskos apstākļos, jo tie strukturāli un ķīmiski līdzinās kaula ECM galvenajai minerālajai sastāvdaļai [16], [17]. Šī strukturālā līdzība ļauj šiem biomateriāliem veidot ciešas funkcionālas saites ar kaulaudiem, tādējādi veicinot osteointegrāciju un kaulaudu remodelēšanos. Tomēr, neskatoties uz šīm priekšrocībām, CaP biomateriāliem raksturīgi vairāki ierobežojumi, tādi kā zema mehāniskā izturība, nenoteikts biodegradācijas ātrums un nepietiekama strukturālā integritāte. Turklāt komerciāli pieejamie kaulu biomateriāli joprojām nespēj pilnībā atdarināt dabisko kaulaudu hierarhisko kompozītstruktūru, kas savukārt būtiski ierobežo to reģeneratīvo potenciālu kaulaudu defektu un lūzumu ārstēšanā [18]. Hidroģela matricas funkcionālizēšana ar CaP ļauj izstrādāt kompozīthidroģelus ar uzlabotām funkcionālajām īpašībām, tostarp paaugstinātu biosaderību un bioloģisko aktivitāti, uzlabotu strukturālo integritāti, optimizētu porainību, regulējamu mehānisko stingrību un bioloģiskās noārdīšanās ātrumu. Šīs īpašības padara ar CaP-funkcionalizētus hidroģelus par daudzsoļiem biomateriāliem kaulaudu reģenerācijai, nodrošinot bioaktīvu un mehāniski atbalstošu vidi šūnu augšanai un audu integrācijai [17]. Pašreizējais klīniskais “zelta standarts” inficēto kaulaudu ārstēšanā ietver sistēmisku vai lokālu antibiotiku lietošanu, kā arī atsevišķu ķirurģisku iejaukšanos, lai implantētu kaula biomateriālu kaulaudu atjaunošanai [19]. Vietējai antibiotiku piegādei bieži tiek izmantotas sintētiskā poli(metilmetakrilāta) (PMMA) kaulu cementa lodītes un starplikas, kas ļauj lokāli piegādāt augstu antibiotiku koncentrāciju, piemēram, vankomicīnu (VAN) vai gentamicīnu (GENTA) [20]. Tomēr PMMA biomateriāliem kā bioinertiem un bioloģiski nenoārdāmiem antibiotiku nesējiem ir būtiski trūkumi, tostarp slikta zāļu izdalīšanās kinētika [20], kas var veicināt rezistences attīstību pret antibiotikām, patogēnu kolonizāciju un biofilmu veidošanos, kā arī izraisīt toksicitāti un nepieciešamību pēc papildu ķirurģiskas operācijas

biomateriāla izņemšanai. Viena soļa pieeju demonstrē bioaktīvie GENTA vai VAN saturošie hidroksilapatīta (HAP)/kalcija sulfāta biomateriāli, kas ir jauni komerciāli pieejami injicējami sintētiskie kaulu implanti *CERAMENT® G* un *CERAMENT® V (BONESUPPORT, Zviedrija)*. Šiem komerciālajiem produktiem ir būtiska priekšrocība, jo tie vienlaikus nodrošina lokālu antibiotiku terapiju un veicina jaunu kaulaudu veidošanos [21]. Tomēr hroniska osteomielīta ārstēšanas laikā ir ziņots par lokālām brūču komplikācijām, noturīgām infekcijām un noturīgu bioplēves klātbūtni. Tāpēc dabiskas izcelsmes, ar CaP uzlādēti, dabiski antibakteriāli kompozīthidrogeli ir ārkārtīgi nozīmīgs pētniecības virziens, kas var piedāvāt potenciālu risinājumu divām izplatītām veselības aprūpes problēmām – bakteriālām infekcijām un kaulu slimībām. Lai risinātu AMR krīzi, kā arī uzlabotu bakteriālu infekciju ārstēšanu un kaulu rekonstrukcijas efektivitāti, šajā promocijas darbā ir izstrādāti un pētīti antibakteriāli hidrogeli, uz antimikrobiāla polipeptīda ϵ -polilizīns (ϵ -PL) un bioloģiski aktīvās hialuronskābes (HA) bāzes, kā arī ϵ -PL/HA kompozīthidrogeli. ϵ -PL/HA kompozīthidrogeli ir izstrādāti, funkcionalizējot antibakteriālo hidrogela matricu ar bioaktīvām Sr-HAP nanodaļiņām. Šīs pieejas mērķis bija piešķirt specializētas funkcionālās īpašības, piemēram, veicināt mezenhimālo cilmes šūnu diferenciāciju, ietekmēt ECM proteīnu adsorbciju, kā arī uzlabot šūnu adhēziju un audu veidošanos, vienlaikus imitējot dabisko kaulaudu nanostruktūru un sastāvu, lai uzlabotu kaulaudu reģenerācijas spēju.

Pirmkārt, svarīgākie parametri antibakteriālo hidrogelu izstrādē ir piemērotu komponentu izvēle un piemērota šķērssaistīšanas stratēģija. Šajā pētījumā tika izvēlētas ϵ -PL un HA, pamatojoties uz šo komponentu izcilām funkcionālajām īpašībām, vienlaikus nodrošinot antibakteriālo aktivitāti un spēju imitēt dabisko ECM. HA ir nozīmīgs vairāku audu ECM polisaharīds, kam piemīt lieliska biosaderība un kam ir svarīga bioķīmiska nozīme dažādos fizioloģiskos procesos [22], [23]. Turklāt HA ir vairākas funkcionālās grupas, kas ļauj veikt daudzveidīgas turpmākas ķīmiskas modifikācijas [13], [24]. Starp tipiskiem īsas ķēdes antimikrobiālajiem peptīdiem (AMP), ϵ -PL tiek klasificēts kā garas ķēdes antimikrobiāls polipeptīds, kas pazīstams arī kā poliaminoskābe. ϵ -PL piemīt vairākas unikālas īpašības, to ir atzinusi par drošu lietošanai (*GRAS – Generally Recognized As Safe*) ASV Pārtikas un zāļu pārvalde (FDA). Salīdzinot ar citiem AMP, tam ir vairākas priekšrocības, tostarp dabiska izcelsme, vienkārša struktūra, zema imunogenitāte, zema toksicitāte, biosaderība, antibakteriāls darbības mehānisms caur šūnu membrānas bojāšanu, stabilitāte dažādos pH un temperatūras apstākļos, kā arī izmaksu efektivitāte. Līdz šim tikai dažos pētījumos ir aprakstīta ϵ -PL saturošu antibakteriālu hidrogelu pagatavošana un antibakteriālās aktivitātes novērtēšana, tostarp ķīmiski šķērssaistītu poliglutamīnskābes/ ϵ -PL kompozīthidrogeli, ϵ -PL saturoši liellopu seruma albumīna (BSA) un polivinilspirta (PVA) divu tīklu hidrogeli, fotopolimerizēti zīda fibrīna/ ϵ -PL hidrogeli, poliakrilamīda, želatīna un ϵ -PL hidrogeli, ϵ -PL stabilizēti agarozes/polidopamīna hidrogeli un dinamiski arginīna-glicīna-asparagīnskābes (RGD)/ ϵ -PL hidrogeli [2], [24].

Lai saglabātu abu komponentu īpašības, tos apvienojot vienā vienotā hidrogela matricā, tika izvēlēta ķīmiskā šķērssaistīšana metode, izmantojot 1-etil-3-(3-dimetilamīnpropil) karbodiimīdu (EDC)/ N-hidroksisukcinimīda (NHS). EDC/NHS šķērssaistīšana nodrošina maigus reakcijas apstākļus, abu reaģentu šķīdību ūdenī, zemāku toksiskumu, salīdzinot ar citiem šķērssaistītājiem, kā arī nodrošina uzlabotas iegūtas hidrogela matricas mehāniskās īpašības, pateicoties stabili kovalento saišu izveidei [25].

Otrkārt, lai izstrādātu kompozīthidrogelus, ir būtiski izvēlēties atbilstošu un zinātniski pamatotu *CaP* atvasinājumu. Kaulu ECM galvenā neorganiskā sastāvdaļa ir nanoizmēra

karbonātus saturošs kalcija deficīta apatīts, kas satur tādus mikroelementus kā Mg, Zn, Sr u. c. Sintētiskās hidroksilapatīta (HAp) nanodaļiņas ir līdzīgas dabiskajam kaula apatītam gan pēc ķīmiskā sastāva, gan struktūras, gan izmēra. Tāpēc sintētiskajam nanokristāliskajam HAp piemīt izcila osteokonduktīvās īpašības. Dažādi materiāli uz HAp bāzes ir plaši pētīti kā nesēji bioloģiski aktīvu savienojumu piegādei, jo tiem ir liels īpatnējais virsmas laukums, unikāla bioaktivitāte un adsorbcijas kapacitāte pāri bioloģiskajām barjerām [26]. Nesēni ir pētīti nesēji uz HAp bāzes mērķtiecīgai pretosteoporotisko zāļu, pretvēža zāļu, antibiotiku, proteīnu, gēnu, radionuklīdu un neorganisko jonu, piemēram, Mg^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} u. c., piegādei. Ar joniem aizvietoti HAp biomateriāli tiek uzskatīti par daudzsoļām sistēmām biomimetisko kaulu ECM mikroelementu ilgtspējīgai, lokālai piegādei [27]–[29]. Šādas funkcionalizētus HAp biomateriālus var izmantot, lai izstrādātu nākamās paaudzes biomateriālus kaulu slimību (tostarp osteoporotisku kaulu lūzumu) ārstēšanai un rekonstrukcijai, kontrolēti piegādājot bioloģiski aktīvus neorganiskos jonus vai zāles tieši kaulu defektu vietās [30]. No dažādiem kandidātiem ar joniem aizvietotu HAp izstrādei plašu interesi ir izraisījuši Sr^{2+} joni, jo tie darbojas kā kaulu terapeitiskie aģenti ar unikālu divējāda iedarbības mehānismu, t. i., vienlaikus veicinot kaulaudu veidošanos, aktivizējot Ca jutīgos receptorus un kavējot kaulaudu noārdīšanos [31], [32]. Sr^{2+} joni tiek iekļauti kaulaudos, izmantojot divus galvenos mehānismus: 1) ātras uzsūkšanās mehānismu, kas atkarīgs no osteoblastu aktivitātes, kad Sr^{2+} joni tiek absorbēti jonu apmaiņas procesā ar Ca^{2+} joniem vai saistoties ar osteoīdu proteīniem; 2) Sr^{2+} joni tiek iekļauti kaulu minerāla kristālrežģī. Sr^{2+} joniem piemīt osteogēns potenciāls, un ir pierādīts, ka Sr-saturoši HAp biomateriāli spēj piegādāt Sr^{2+} jonus kaula defekta vietā, kur tie veicina kaulu reģenerāciju, stimulējot osteoblastu proliferāciju un diferenciāciju, vienlaikus nomācot osteoklastu aktivitāti.

Ņemot vērā izvēlēto komponentu un šķērssaistīšanas stratēģijas pierādīto potenciālu, šī promocijas darba mērķis bija izstrādāt un vispusīgi raksturot injicējamus hidrogelus, apvienojot ϵ -PL dabiskās antibakteriālās īpašības, HA ECM imitējošās un bioloģiskās saderības īpašības, kā arī Sr-HAp nanodaļiņu osteogēno iedarbību. Šī daudzfunkcionālā hidrogela sistēma izstrādāta ar mērķi vienlaikus cīnīties pret baktēriālajām infekcijām un veicināt kaulaudu reģenerāciju, tādējādi risinot iepriekš minētos kritiskos veselības aprūpes izaicinājumus.

Mērķis un uzdevumi

Promocijas darba mērķis ir izmantot antimikrobiālo polipeptīdu ϵ -PL, lai izstrādātu kovalenti šķērssaistītus antibakteriālus hidrogelus audu inženierijas lietojumiem. Lai sasniegtu definēto mērķi, promocijas darba eksperimentālais plāns tika sadalīts četrās daļās, aptverot hidrogelu un Sr-HAp funkcionalizētu hidrogelu sintēzes metodoloģijas izstrādi, un šo biomateriālu turpmāko izpēti. Šīs daļas atbilst promocijas darba uzdevumiem.

1. Izstrādāt ķīmiski šķērssaistītas ϵ -PL/HA hidrogela matricas sintēzes metodoloģiju, izmantojot EDC/NHS šķērssaistīšanas reakciju.
2. Izpētīt iegūto ϵ -PL/HA hidrogelu fizikālķīmiskās un *in vitro* bioloģiskās īpašības.
3. Izstrādāt ar Sr-HAp funkcionalizētu ϵ -PL/HA (Sr-HAp/ ϵ -PL/HA) hidrogelu sintēzes metodoloģiju.
4. Izpētīt iegūto Sr-HAp/ ϵ -PL/HA kompozīthidrogelu fizikālķīmiskās un *in vitro* bioloģiskās īpašības.

Aizstāvēšanai izvirzītas tēzes

1. EDC/NHS ierosinātas ķīmiskās šķērssaistīšanas metode ir izmantojama ϵ -PL/HA hidrogeļu izstrādei, lai sasniegtu vēlamas fizikālķīmiskās un bioloģiskās īpašības audu inženierijas jomai: stingrību, injicējamību, šļircējamību, pašatjaunošanās kapacitāti, sterilizācijas spēju, antibakteriālo aktivitāti un šūnu dzīvotspēju.
2. Kovalenti šķērssaistītus ϵ -PL/HA hidrogeļus var sterilizēt ar konvencionālu tvaika sterilizāciju, minimāli ietekmējot to fizikālķīmiskās un *in vitro* antibakteriālās īpašības.
3. ϵ -PL/HA hidrogeļi uzrāda spēcīgu antibakteriālo aktivitāti pret gramnegatīviem un grampozitīviem baktēriju celmiem, tostarp ATCC references un klīniski izolētiem grūti ārstējamiem multirezistentiem celmiem.
4. ϵ -PL/HA hidrogeļa matricas funkcionalizēšana ar Sr-HAp nanodaļiņām nemaina sākotnējās hidrogeļa matricas īpašības, saglabājot injicējamību, antibakteriālo aktivitāti, vienlaikus piešķirot regulējamu biodegradācijas profilu, kas ir būtiski kaulaudu reģenerācijas lietojumiem.

Zinātniskā novitāte

1. Pirmo reizi ir izstrādāta bioloģiski saderīga un antibakteriāla hidrogeļa matrica, izmantojot divus dabiskas izcelsmes biopolimērus ϵ -PL un HA, izmantojot EDC/NHS ierosinātu ķīmisko šķērssaistīšanu.
2. Tika sistemātiski novērtēta tvaika sterilizācijas ietekme uz izstrādāto ϵ -PL/HA hidrogeļu fizikālķīmiskajām īpašībām un antibakteriālo aktivitāti *in vitro* apstākļos, demonstrējot minimālu ietekmi uz to funkcionālajām īpašībām un potenciālu klīniskai lietošanai.
3. Tika pētīts potenciāls baktēriju rezistences attīstībai pret ϵ -PL, izmantojot gan ATCC references celmus, gan klīniski izolētus multirezistentiem grampozitīvos un gramnegatīvos baktēriju celmus.
4. Ir izstrādāti injicējami ϵ -PL/HA hidrogeļi, funkcionalizēti ar Sr-HAp nanodaļiņām, un novērtēta to dubultā funkcionalitāte – antibakteriālā aktivitāte un osteogēnais potenciāls, uzsverot to lietojuma potenciālu kaulu infekciju ārstēšanā.
5. Tika pētīta ϵ -PL/HA hidrogeļu un ar Sr-HAp funkcionalizētu ϵ -PL/HA hidrogeļu antibakteriālā aktivitāte gan ātras iedarbības (24 h), gan ilgstošas iedarbības (168 h) režimos pret plašu baktēriju celmu spektru, apstiprinot izstrādāto hidrogeļu sistēmu ilgstošo un plaša spektra antibakteriālo efektivitāti.

Praktiskā nozīme

Šī promocijas darba ietvaros tika sasniegti šādi praktiskie rezultāti:

- 1) izstrādāta efektīva un reproducējama sintēzes metodoloģija injicējamu, antibakteriālu un autoklāvējamu hidrogeļu iegūšanai uz ϵ -PL un HA bāzes, izmantojot EDC/NHS ierosinātu ķīmisko šķērssaistīšanu biomedicīniskiem lietojumiem;
- 2) izstrādāti standartizēti darbības protokoli, lai novērtētu izstrādāto hidrogeļu viskoelastīgās īpašības, antibakteriālo aktivitāti *in vitro* un citotoksicitāti, tostarp detalizētas paraugu sagatavošanas procedūras pēc sintēzes un testēšanas reproducējamības validācija;

- 3) izstrādāta *in situ* funkcionalizācijas metodoloģija, lai iegūtu ar Sr-HAp funkcionalizētus ϵ -PL/HA hidrogelus kā dubultas funkcionalitātes biomateriālus, apvienojot antibakteriālo aktivitāti ar osteogēnu potenciālu inficētu kaulu defektu ārstēšanai;
- 4) izstrādātās hidrogela matricas sintēzes, sterilizācijas un funkcionalizācijas vienkāršība liecina par augstu translācijas potenciālu mērķtiecīgai antibakteriālai terapijai, nākamās paaudzes implantu pārklājumu, zāļu piegādes sistēmu vai kompozīthidrogelu izstrādē.

Darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs izstrādāts kā zinātnisko publikāciju kopa, tas veltīts ķīmiski šķērssaistītas ϵ -PL/HA hidrogela matricas un ar Sr-HAp funkcionalizētu ϵ -PL/HA hidrogelu izstrādei un visaptverošai izpētei. Darbs ietver četras oriģinālās zinātniskās publikācijas, publicētas recenzētos zinātniskos (*SCI*) žurnālos, kā arī vienu apskatrakstu.

Publikācijas un promocijas darba aprobācija

Promocijas darbā iegūtie rezultāti un sasniegumi publicēti četrās oriģinālās zinātniskās publikācijās. Turklāt tika publicēts arī apskatraksts, kurā aplūkota ar promocijas darbu saistīta tēma. Promocijas darba izstrādes laikā galvenie rezultāti tika prezentēti 16 zinātniskās konferencēs.

SCI publikācijas

1. **A. Sceglovs**, I. Skadins, M. Chitto, J. Kroica, K. Salma-Ancane. Failure or future? Exploring alternative antibacterials: a comparative analysis of antibiotics and naturally-derived biopolymers, *Front. Microbiol.*, 2025, 16: 1526250. doi: 10.3389/fmicb.2025.1526250 (*IF* 4,5, *Q1*, *CiteScore* 7,7).
A. Ščeglova ieguldījums (85/100 %): konceptualizācija, resursi, rakstīšana – sākotnējā versija, rakstīšana – pārskatīšana un rediģēšana.
2. K. Salma-Ancane, **A. Sceglovs**, E. Tracuma, J. K. Wychowanec, K. Aunina, A. Ramata-Stunda, V. Nikolajeva, D. Loca. Effect of crosslinking strategy on the biological, antibacterial and physicochemical performance of hyaluronic acid and ϵ -polylysine based hydrogels, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2022, 208, 995–1008. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.03.207> (*IF* 8,5, *Q1*, *CiteScore* 13,7).
A. Ščeglova ieguldījums (35/100 %): metodoloģija, validācija, formālā analīze, izpēte.
3. **A. Sceglovs**, J. K. Wychowanec, I. Skadins, A. Reinis, C. J. C. Edwards-Gayle, M. D'Este, K. Salma-Ancane, Effect of steam sterilisation on physico-chemical properties of antibacterial covalently cross-linked ϵ -polylysine/hyaluronic acid hydrogels, *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.*, 2023, 6: 100363. <https://doi.org/10.1016/J.CARPTA.2023.100363> (*IF* 6,5, *Q1*, *CiteScore* 8,7).
A. Ščeglova ieguldījums (70/100 %): konceptualizācija, resursi, rakstīšana – sākotnējais variants, metodoloģija, validācija, rakstīšana – pārskatīšana un rediģēšana.
4. **A. Sceglovs**, C. Siverino, I. Skadins, V. Pirsko, M. Sceglova, J. Kroica, F. T. Moriarty, K. Salma-Ancane. Injectable ϵ -polylysine/hyaluronic acid hydrogels with resistance-

preventing antibacterial activity for treating wound infections, *ACS Appl. Bio Mater.*, 2025, 8 (11), 9916–9930. <https://doi.org/10.1021/acsabm.5c01252>.

A. Ščeglova ieguldījums (75/100 %): konceptualizācija, resursi, metodoloģija, validācija, rakstīšana – pārskatīšana un rediģēšana.

5. A. Rubina, **A. Sčeglovs**, A. Ramata-Stunda, I. Pugajeva, A. R. Boyd, A. Tumilovica, L. Stipniece and K. Salma-Ancane. Injectable mineralized Sr-hydroxyapatite nanoparticles-loaded ϵ -polylysine-hyaluronic acid composite hydrogels for bone regeneration, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2024, 280: 135703. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135703> (IF 8,57, Q1, CiteScore 13,7).

A. Ščeglova ieguldījums (35/100 %): rakstīšana – pārskatīšana un rediģēšana, rakstīšana – sākotnējā versija, vizualizācija, izpēte, formālā analīze, konceptualizācija.

Zinātniskās konferences

1. **A. Sčeglovs**, A. Reinis, K. Salma-Ancane. Natural biopolymer-based antibacterial hydrogels for tissue engineering. *European Society for biomaterials (ESB 2021)*, 5–9 September 2021, virtual event, virtual poster presentation.
2. **A. Sčeglovs**, A. Reinis, K. Salma-Ancane. Synthesis and characterization of chemically cross-linked hydrogels based on ϵ -polylysine and hyaluronic acid. *Materials Science and Applied Chemistry conference of RTU (MSAC 2021)*, 22nd of October 2021, virtual event, virtual poster presentation.
3. **A. Sčeglovs**, C. Siverino, F. T. Moriarty, K. Salma-Ancane. Covalently bonded ϵ -polylysine/hyaluronic acid hydrogels with enhanced antibacterial action. *Scandinavian Society for biomaterials conference (ScSB 2022)*, 13–15 June 2022, Jurmala, Latvia, poster presentation.
4. **A. Sčeglovs**, C. Siverino, J. K. Wychowanec, F. T. Moriarty, M. D'Este, K. Salma-Ancane. Functional ϵ -polylysine/hyaluronic acid hydrogels with antibacterial activity. *Tissue engineering and Regenerative Medicine International Society conference (TERMIS EU 22)*, 28th of June – 1st of July 2022, Krakow, Poland, poster presentation.
5. **A. Sčeglovs**, K. Salma-Ancane. Effect of Steam Sterilization Strategy on ϵ -Polylysine/Hyaluronic Acid Hydrogel Properties. *European Society for biomaterials (ESB 2022)*, 4–8 September 2022, Bordo, France, poster presentation.
6. A. Rubina, I. Kreicberga, **A. Sčeglovs**, K. Salma-Ancane. Development of Functional Composite Hydrogels for Bone Regeneration. *European Society for biomaterials (ESB 2022)*, 4–8 September 2022, Bordo, France, poster presentation.
7. **A. Sčeglovs**, K. Salma-Ancane. Investigation of Impact of Steam Sterilization on ϵ -Polylysine/Hyaluronic Acid Hydrogel Properties. *Materials Science and Applied Chemistry conference of RTU (MSAC 2022)*, 21st of October 2022, Riga, Latvia, poster presentation.
8. A. Rubina, I. Kreicberga, **A. Sčeglovs**, K. Salma-Ancane. Development of Functional Composite Hydrogels for Bone Regeneration. *Materials Science and Applied Chemistry conference of RTU (MSAC 2022)*, 21st of October 2022, Riga, Latvia, poster presentation.
9. **A. Sčeglovs**, I. Skadins, V. Pirsko, J. Kroica, K. Salma-Ancane. Injectable Polypeptide-Based Hydrogels for Local Antibacterial Therapy. *European Society for biomaterials (ESB 2023)*, 4–8 September 2023, Davos, Switzerland, poster presentation.

10. A. Rubina, A. Tumilovica, **A. Sceglavs**, L. Stipniece, K. Salma-Ancane. Injectable Hyaluronic Acid/ ϵ -Polylysine Hydrogels Loaded with Strontium Hydroxyapatite Nanoparticles For Osteoporotic Bone Fracture Healing. *European Society for biomaterials (ESB 2023)*, 4–8 September 2023, Davos, Switzerland, poster presentation.
11. **A. Sceglavs**, I. Skadins, V. Pirsko, J. Kroica, K. Salma-Ancane. Revealing Physicochemical and Antibacterial Properties of Chemically Coupled ϵ -Polylysine/Hyaluronic Acid Hydrogel. *Materials Science and Applied Chemistry conference of RTU (MSAC 2023)*, 6th of October 2023, Riga, Latvia, oral presentation.
12. A. Rubina, A. Tumilovica, **A. Sceglavs**, L. Stipniece, K. Salma-Ancane. Injectable nanoparticle-hydrogel composites for bone regeneration. *Materials Science and Applied Chemistry conference of RTU (MSAC 2023)*, 6th of October 2023, Riga, Latvia, oral presentation.
13. **A. Sceglavs**, I. Skadins, J. Kroica, K. Salma-Ancane. Injectable hydrogels based on antimicrobial polypeptide exhibit enhanced in vitro antibacterial activity. *4th International Biennial BioMaH Conference*, 15–18 October 2024, Rome, Italy, poster presentation.
14. A. Rubina, **A. Sceglavs**, A. Ramata-Stunda, A. Tumilovica, L. Stipniece, K. Salma-Ancane. Injectable mineralized Sr-hydroxyapatite nanoparticles-loaded composite hydrogels for bone regeneration. *4th International Biennial BioMaH Conference*, 15–18 October 2024, Rome, Italy, oral presentation.
15. **A. Sceglavs**, I. Skadins, J. Kroica, K. Salma-Ancane. Advanced hydrogel platforms: cross-linked polypeptide for non-antibiotic antibacterial applications. *RSU Research Week Biennial conference (RW 2025)*, 24–28 March 2025, Riga, Latvia, oral presentation.
16. **A. Sceglavs**, A. Rubina, I. Skadins, J. K. Wychowaniec, A. Ramata-Stunda, J. Kroica, K. Salma-Ancane. Attaining non-antibiotic antibacterial hydrogels: from ϵ -polylysine networks to composite platforms. *Tissue engineering and Regenerative Medicine International Society conference (TERMIS EU 25)*, 19–23 May 2025, Freiburg, Germany, oral presentation.

Citas zinātniskās publikācijas, kas tapušas promocijas darba izstrādes laikā

1. M. Mosina, C. Severino, L. Stipniece, **A. Sceglavs**, R. Vasiļjevs, F. T. Moriarty, J. Locs. Gallium-Doped Hydroxyapatite Shows Antibacterial Activity against *Pseudomonas aeruginosa* without Affecting Cell Metabolic Activity. *J. Funct Biomater.*, 2023, 14 (51). <https://doi.org/10.3390/jfb14020051>.
2. L. Stipniece, A. Ramata-Stunda, J. Vecstaudza, I. Kreicberga, D. Livkisa, A. Rubina, **A. Sceglavs**, K. Salma-Ancane. A Comparative Study on Physicochemical Properties and In Vitro Biocompatibility of Sr-Substituted and Sr Ranelate-Loaded Hydroxyapatite Nanoparticles. *ACS Appl. Bio Mater.*, 2023, 6, 5264–5281. <https://doi.org/10.1021/acsabm.3c00539>.

Citas zinātnisko konferenču prezentācijas

1. A. Tumilovica, A. Rubina, **A. Sceglavs**, L. Stipniece, K. Salma-Ancane. Development of injectable composite hydrogels containing hydroxyapatite nanoparticles and hyaluronic acid, *Materials Science and Applied Chemistry conference of RTU (MSAC 2023)*, 6th of October 2023, Riga, Latvia, poster presentation.

2. A. Tumilovica, A. Rubina, **A. Sceglovs**, K. Klavins, L. Stipniece, K. Salma-Ancane. Development of injectable bioactive composite hydrogels for bone regeneration. *4th International Biennial BioMaH Conference*, 15–18 October 2024, Rome, Italy, poster presentation.

PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI

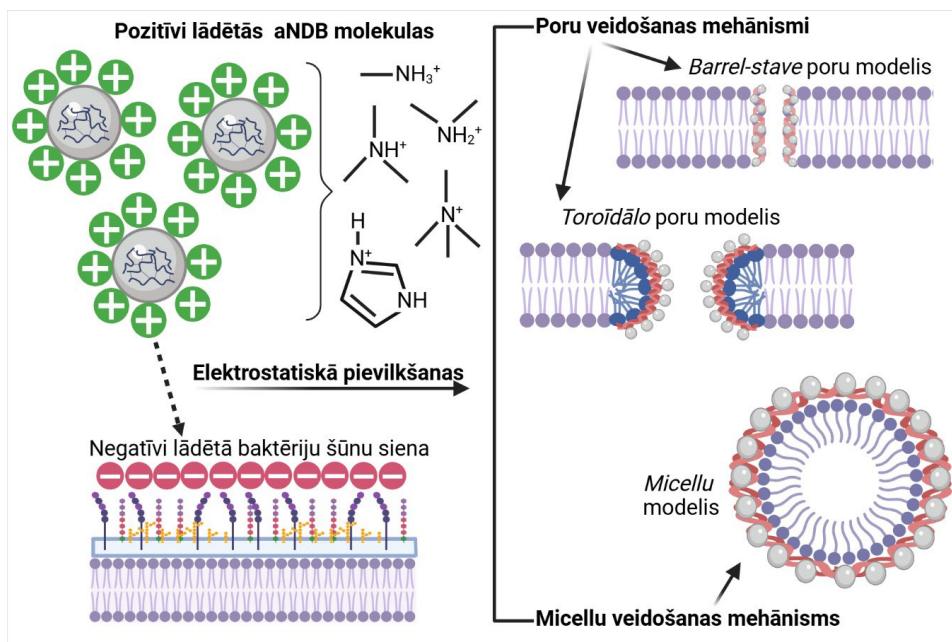
Dabiskas izcelsmes biopolimēru (*NDB*) potenciāls kā alternatīva antibakteriāliem līdzekļiem audu inženierijas lietojumiem (1. publikācija)

Bakteriālās infekcijas ir bijušas nozīmīga problēma visā cilvēces vēsturē. Lai gan antibiotiku izstrāde 20. gadsimtā radīja revolūciju infekciju ārstēšanā, tā vienlaikus aizsāka arī nepārtrauktu evolūcijas cīņu ar patogēnajiem mikroorganismiem. Šo dzīvību glābjošo antibiotiku pārmērīga un nepareiza lietošana ir veicinājusi globālas sabiedrības veselības krīzes, ko dēvē par antimikrobiālo rezistenci (AMR), izplatību visā pasaulē [33]. PVO dramatiskais ziņojums liecina, ka līdz 2050. gadam rezistence pret antibiotikām var kļūt tikpat nāvējoša kā vēzis un radīt ievērojamus ekonomiskos zaudējumus, ja netiks veikti preventīvi pasākumi [34]. Antibiotiku efektivitātes samazināšanās un alternatīvu ārstēšanas līdzekļu ierobežotā pieejamība uzsver steidzamu nepieciešamību ieviest jaunas antibakteriālās terapijas klases. Ideālajām alternatīvām būtu jādarbības kā mehānismiem, kas mazina rezistences attīstības risku.

Šajā kontekstā **antibakteriāli dabiskas izcelsmes biopolimēri (*aNDB*)** ir piesaistījuši ievērojamu uzmanību to unikālo antibakteriālo īpašību dēļ. Aptuveni pirms 20 gadiem *aNDB* ar pierādītu antibakteriālo aktivitāti pirmo reizi tika ierosināti kā alternatīva antibiotikām bakteriālu infekciju ārstēšanai [35]. Mūsdienās *aNDB* balstītas stratēģijas tiek uzskatītas par perspektīvu risinājumu lokālai, antibiotiku nesaturošai antibakteriālai terapijai, kas vienlaikus atbalsta imūnsistēmas darbību un samazina ietekmi uz dabisko mikrobiotu. Šādas pieejas varētu kļūt par ilgtspējīgas inovācijas pamatu mūsdienu veselības aprūpē.

Saistībā ar *aNDB* ir būtiski izprast to antibakteriālās darbības mehānismu pret baktērijām (1. att.). Pirmkārt, jāņem vērā tas, ka baktēriju šūnu sienas ārējās struktūras (adhēzijas un patogenitātes faktori) ir negatīvi lādētas. Pie šādām struktūrām pieder gramnegatīvo baktēriju lipopolisaharīdi un fosfolipīdi, kā arī grampozitīvo baktēriju teihonskābes un lipoteihonskābes. Otrkārt, *aNDB* sastāv no molekulām (hondroitīnsulfāts, o-pullulāns, ε-polilizīns, hitozāns, antimikrobiālie peptīdi, piemēram, magainīns-2 u. c.), kas satur katjonu grupas, piemēram, primārās amīnu, kvartārās amonija, kvartārās fosfonija, guanidīnija vai terciārās sulfonija grupas [36], kas nodrošina to kopējo pozitīvo lādiņu fizioloģiska pH apstākļos. Rezultātā *aNDB* un baktēriju mijiedarbība sākas ar savstarpēju pieķeršanos, ko izraisa elektrostatiskie spēki [37] (1. att.). Elektrostatiskā mijiedarbība ir pirmais solis ceļā uz *aNDB* baktericīdo iedarbību. Treškārt, lai panāktu multivalences efektu, ir jāsasniedz noteikta *aNDB* katjonu koncentrācija [38], kas nodrošina *aNDB* molekulu vienlaikus piesaisti baktēriju šūnu struktūrām. Turpmākie mehānismi ietver poru vai micelu veidošanās posmus (1. att.), kas raksturo baktēriju strukturālās integritātes izjaukšanu, kā rezultātā palielinās caurlaidība, rodas fizikāli bojājumi, notiek tālāka iekļūšana citoplazmā un baktēriju līze.

Turklāt vairāki pētījumi ir pierādījuši, ka dažādiem *aNDB* piemīt arī antibioplēves aktivitāte. Antibioplēves darbības mehānismi ir saistīti ar bioplēves eksopolisaharīdu (EPS), būtiska komponente bioplēves stabilitātei, izjaukšanu, kas izraisa baktēriju šūnu atdalīšanos, vai baktēriju adhēzijas novēršanu jau sākotnējā stadijā [39], [40]. Turklāt ir konstatēts, ka dažādi *aNDB*, piemēram, laktoferīna atvasinātie peptīdi, neitrofilu peptīdi, antimikrobiālie peptīdi (protegrīns-1), uzrāda antibakteriālu aktivitāti pret intracelulārajām baktērijām – *M. tuberculosis*. Antibakteriālās darbības mehānisms ir balstīts mikobaktēriju šūnas sienīgas izjaukšanā un membrānas caurlaidības pastiprināšanā [9–11].



1. att. Biopolimēru (*aNDB*) – baktēriju šūnu mijiedarbība (pa kreisi) un baktericīdie mehānismi (pa labi) (Izveidots ar *Biorender* palīdzību).

Vēl viens būtisks aspekts ir iespējamība, ka baktērijas varētu attīstīt rezistenci pret *aNDB*. Rezistences mehānismi ir dažādi un parasti specifiski konkrētai antibiotiku klasei un tās darbības mehānismam. Tomēr biežākie mehānismi ietver specifisku enzīmu ražošanu, mērķmolekulu zudumu vai modifikāciju, efluksa sūkņu aktivizēšanu, izmaiņas mērķa vietās mutāciju rezultātā, kā arī izmaiņas šūnu membrānas caurlaidībā [12], [41]–[43]. Tradicionāli tiek uzskatīts, ka rezistences attīstība ir raksturīga tikai antibiotikām un ka – teorētiski – baktērijas nevar attīstīt rezistenci pret *aNDB*. No vienas puses, elektrostatiskā pievilkšanās starp *aNDB* un baktēriju ārējām struktūrām šķiet neizbēgama. Turklāt *aNDB* iedarbības mehānisms nav stingri mērķēts. Pat pēc nokļūšanas intracelulārā vidē *aNDB* var traucēt vairākus vielmaiņas norisus [44]–[46]. Ņemot vērā minēto, tiek uzskatīts, ka baktērijām ir grūti traucēt elektrostatisko mijiedarbību un attīstīt rezistenci, jo šāds process bioloģiski ir ļoti resursietilpīgs.

Jaunas dabiski antibakteriālās ķīmiski šķērssaistītas hidrogela matricas izstrāde (2. publikācija)

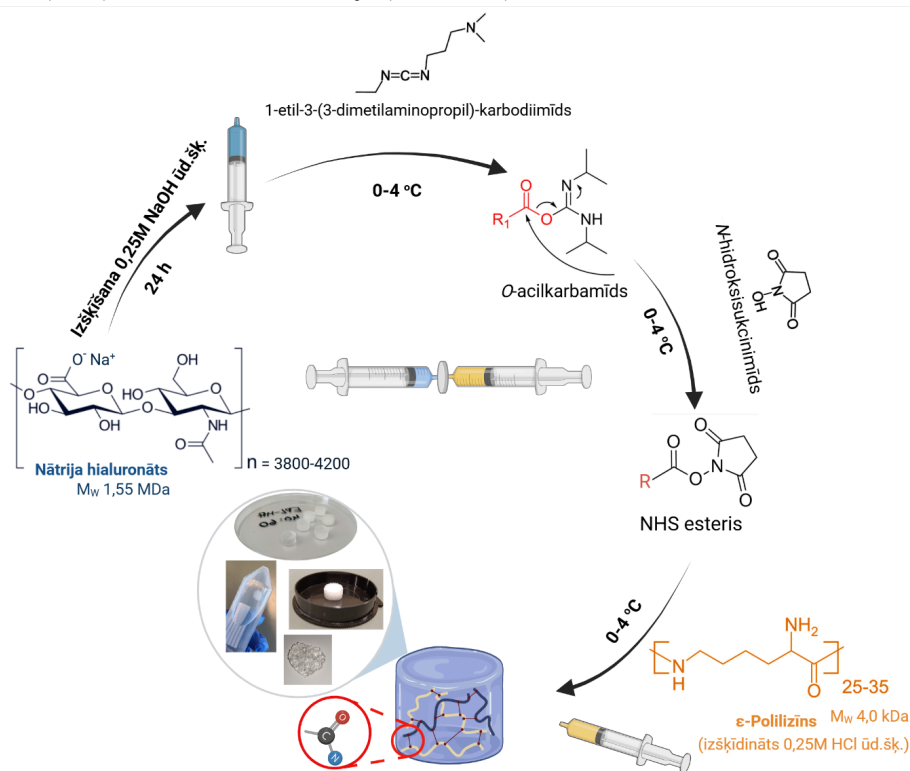
Hidrogeli ir inovatīvi biomateriāli audu inženierijas, reģeneratīvās medicīnas un zāļu piegādes lietojumiem, pateicoties to unikālajām īpašībām, tādām kā spējai iekapsulēt un kontrolēti pēc pieprasījuma izdalīt bioaktīvos savienojumus (piemēram, zāles vai augšanas faktorus), kā arī atbalstīt šūnu proliferāciju un augšanu [47]–[49]. Pēdējos gados īpašu interesi ir izraisījuši hidrogeli uz dabiskas izcelsmes antibakteriālu biopolimēru (*aNDB*) bāzes ar dabisku antibakteriālu aktivitāti, kas tiek pētīti kā daudzsoļi antibiotikas nesaturoši antibakteriāli līdzekļi infekciju ārstēšanai dažādos biomedicīnas lietojumos, piemēram, brūču dzīšanā un audu infekciju profilaksē [24], [50], [51]. Īsās ķēdes antimikrobiālo peptīdu (AMP)

vidū īpašu uzmanību ir ieguvuši garās ķēdes AMP vai poli(aminoskābes), piemēram, **ε-polilizīns (ε-PL)**, kas ir augstas veiktspējas *aNDB* ar lielu potenciālu antibakteriālu biomateriālu izstrādē [2], [52]–[55]. ε-PL ir dabā sastopams, lineārs katjonu polipeptīds, ko producē *Streptomyces albulus*. Tas ir iekļauts ASV Pārtikas un zāļu pārvalde klasifikatorā kā “*Generally Recognised as Safe*” (GRAS Nr. 000135) un nodrošina plaša spektra antimikrobiālo iedarbību gan pret grampozitīvām, gan gramnegatīvām baktērijām. Papildus tā antibakteriālajam mehānismam ar membrānas izjaukšanu ε-PL ir vairākas priekšrocības, salīdzinot ar citiem *aNDB*, tostarp augsta brīvo ε-aminogrupu ($-NH_2$) koncentrācija ε pozīcijā, vienkārša struktūra, zema imunogenitāte, zems toksiskuma profils, vienkārša ražošana un zemas izmaksas [2], [45], [55]–[57]. Līdz šim tikai nedaudzi pētījumi ir veikti antibakteriālu ε-PL saturošu hidrogelu izstrādei un antibakteriālo īpašību novērtējumam. Savukārt **hialuronskābe (HA)** ir anjonu, nesulfatēts glikozaminoglikāns (GAG) ar unikālām fizikālķīmiskām īpašībām un specifiskām bioloģiskām funkcijām. HA ir būtiska dabiskā ekstracelulāra matricas (ECM) sastāvdaļa, tāpēc tā ir pievilcīga izejviela biomimetisku, šūnu funkciju atbalstošu hidrogelu izstrādei audu inženierijas lietojumiem [58]–[60]. Hidrogelus galvenokārt izstrādā, izmantojot fizikālo vai ķīmisko šķērssaistīšanu vai kombinējot abas pieejas, lai izveidotu trīsdimensionālu (3D) šķērssaistītu polimēru tīklu [61]. Lai gan fizikāli šķērssaistītiem hidrogeļiem raksturīga biomedicīniskā drošība un vienkārša izgatavošana, tiem piemīt zemas mehāniskās īpašības un ierobežota regulējama bionoārdīšanās, kas saistīta ar atgriezenisku starpmolekulāru mijiedarbību un vāju sekundāro spēku, piemēram, jonu/elektrostatisko mijiedarbību, ūdeņraža saišu u. c., veidošanos [61]–[63]. Tomēr ķīmiski šķērssaistītie hidrogeļi parasti tiek veidoti ar ķīmiski stabili kovalento šķērssaistīšanos, kas nodrošina labākas mehāniskās īpašības, stabilitāti fizioloģiskā vidē un regulējamu bioloģisko noārdīšanās dinamiku, salīdzinot ar fizikāli šķērssaistītiem hidrogeļiem.

Promocijas darba pirmajā daļā tika sagatavoti jauni ķīmiski šķērssaistītie hidrogeļi uz ε-PL un HA bāzes, izmantojot ūdenī šķīstošus 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimīdu (EDC)/N-hidroksisukcinimīdu (NHS) šķērssaistīšanas aģentus, nodrošinot ķīmisko reakciju starp HA karboksilgrupām ($-COOH$) un ε-PL primārām ε-amino ($-NH_2$) grupām izmantojot nemainīgu EDC/NHS aģentu molāro attiecību (1 : 1). Šajā pētījumā izmantotā EDC/NHS koncentrācija (0,24 M) tika izvēlēta, pamatojoties uz literatūras datiem, kas liecina par tās efektivitāti hidrogelu šķērssaistīšanā, vienlaikus saglabājot biosaderību šūnu kultūru pētījumos [64]. Hidrogeļi tika sintezēti ar dažādu ε-PL un HA masas attiecību 40 : 60, 50 : 50 un 60 : 40 masas%, tādējādi nodrošinot ε-PL nešķērssaistīto primāro ε-amino grupu klātbūtni (2. att.). Kā aprakstīts iepriekš, nešķērssaistītas brīvas ε-amino grupas galvenokārt ir atbildīgas par ε-PL antibakteriālo aktivitāti, pateicoties to elektrostatiskai mijiedarbībai ar baktēriju ārējo virsmu. Tomēr pārāk augsta brīvā ε-PL koncentrācija var palielināt citotoksicitātes risku. Tādēļ galvenā izstrādes stratēģija bija apvienot antibakteriālo polipeptīdu ε-PL ar bioloģiski aktīvo HA, lai iegūtu kovalenti saistītu hidrogeļa matricu, kas nodrošina ne tikai strukturālo stabilitāti, labas mehāniskās īpašības un viskoelastīgās īpašības, bet arī dabisku antibakteriālo aktivitāti, vienlaikus saglabājot šūnu dzīvotspēju [24]. Lai novērstu priekšlaicīgu želēšanu un nodrošinātu efektīvu EDC/NHS ierosinātu šķērssaistīšanu, visi reaģenti pirms sintēzes tika atdzesēti līdz 0–4 °C (2. att.).

Sākotnējie rezultāti par izstrādāto ε-PL/HA hidrogelu fizikālķīmiskajām īpašībām, *in vitro* citotoksicitāti un antibakteriālo aktivitāti tika publicēti *Salma-Ancane et al.* (2022) [24] kopīgajā pētījumā. Šī pētījuma mērķis bija izpētīt mainīgās ε-PL masas attiecības ietekmi ε-

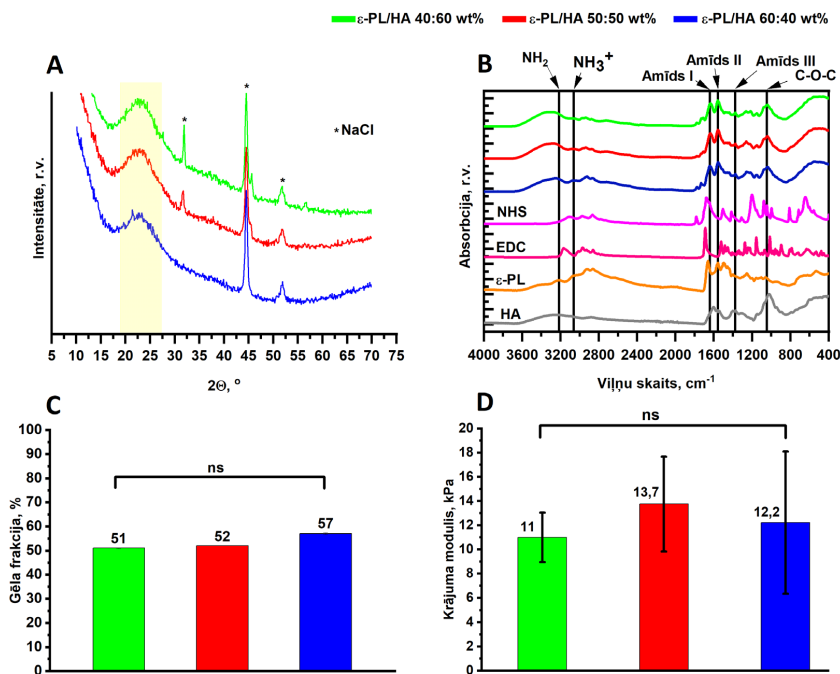
PL/HA hidrogelos uz to fizikālķīmiskajām (3. att.) un *in vitro* bioloģiskajām īpašībām. Tas ietvēra arī antibakteriālās aktivitātes novērtējumu pret gramnegatīvo *E. coli* MSCL 332 (4. A att.), kā arī un tiešā kontakta citotoksitātes testu, lai noteiktu tīra ϵ -PL citotoksitātes profilu (IC50) ar Balb/c 3T3 šūnu līniju (4. B–C att.).



2. att. Ķīmiski šķērssaistītu ϵ -PL/HA hidrogelu sintēzes shēma.

Tika veikta fizikālķīmiskā raksturošana, lai novērtētu izstrādāto ķīmiski saistīto ϵ -PL/HA hidrogelu strukturālās un funkcionālās īpašības (3. A–D att.). Rentgenstaru difrakcijas (*XRD*) ainas (3. A att.) atklāja visu sagatavoto ϵ -PL/HA hidrogelu sēriju amorfu struktūru ar raksturīgu amorfās difrakcijas maksimumu 20–23° robežās. Papildus tika novēroti difrakcijas maksimumi pie 20 32°, 45° un 52°, kas raksturīgi NaCl kristāliskās fāzes maksimumiem. NaCl veidojās neutralizācijas reakcijas laikā starp 0,25M NaOH un 0,25M HCl, kas tika izmantoti sintēzē (2. att.). Sagatavoto ϵ -PL/HA hidrogelu Furjē transformācijas infrasarkanās spektroskopijas (*FTIR*) spektros (3. B att.) tika konstatēti raksturīgi absorbcijas maksimumi, kas atbilst tīro komponentu ϵ -PL un HA funkcionālajām grupām. Tādējādi absorbcijas maksimumi pie 1633 cm⁻¹, 1555 cm⁻¹ un 1377 cm⁻¹ tika attiecināti uz C=O stiepes vibrāciju (Amīds I), C=O-NH saites vibrāciju (Amīds II) un C-N saites vibrāciju (Amīds II). Salīdzinot ar tīra ϵ -PL un HA *FTIR* spektriem, neliela Amīda I, Amīda II un Amīda III joslu nobīde varētu liecināt par sintēzes laikā notikušo mijiedarbību starp ϵ -PL brīvajām aminogrupām un HA karboksilgrupām, kā rezultātā veidojas jaunas kovalentās amīdu saites. Turklāt arī aprēķinātā Amīda I/Amīda II attiecība, kas iegūta no normalizētajiem ϵ -PL/HA hidrogela un tīrās komponentes spektriem, atklāja, ka šīs attiecības vērtības ir augstākas, salīdzinot ar tīro ϵ -PL, jo trīs hidrogela sastāviem šī vērtība bija aptuveni 0,87, savukārt ϵ -PL tā pati joslu attiecība bija

0,69. Absorbcijas joslas pie 3246 cm^{-1} un 3081 cm^{-1} atbilst neprotonētām -NH_2 un protonētām -NH_3^+ grupām. Kā iepriekš aprēķināts, $\text{NH}_3^+/\text{NH}_2$ attiecību vērtības tika iegūtas kā 0,65, 0,73 un 0,89, kas attiecīgi atbilst 40 : 60, 50 : 50 un 60 : 40 masas% sastāviem. Tās liecina par pieejamām brīvām aminogrupām, kas nodrošina antibakteriālo aktivitāti. Analizējot gela frakciju testa rezultātus (3. C att.), redzams, ka līdzīgās gela frakcijas vērtības (51–57 %, statistiski nenoīmīgas, $p > 0,05$) sagatavotajos hidrogeļos liecina par matricas nemainīgu šķērssaistes blīvumu pie nemainīgiem parametriem: HA masa un EDC/NHS molārās koncentrācijas.



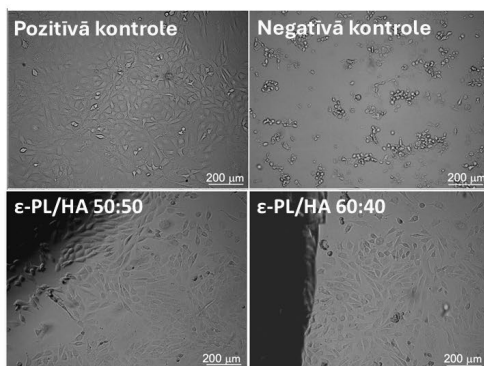
3. att. Sintezēto ϵ -PL/HA hidrogeļu fizikālķīmisko īpašību pētījumu galveno rezultātu kopsavilkums [24]. (A) Sagatavoto ϵ -PL/HA hidrogeļu rentgenstaru difrakcijas (XRD) ainas, kas iegūtas 2θ diapazonā no 10 līdz 70. (B) Sagatavoto ϵ -PL/HA hidrogeļu un to sagatavošanā izmantoto tiro komponentu – ϵ -PL, HA, EDC un NHS – Furjē transformācijas infrasarkanās spektroskopijas (FTIR) spektri $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ diapazonā. (C) Gela frakcijas vērtības trīs dažādām ϵ -PL/HA hidrogeļu sērijām, vērtības attēlotas kā vidējā vērtība $\pm$ SD. (D) ϵ -PL/HA hidrogeļu sēriju mehāniskā stingrība, kas iegūta no amplitūdas svārstību līkņiem pie 1 Hz un 0,2 % deformācijas (LVR). No katras eksperimentālās grupas tika izmantoti trīs atkārtojumi.

No *in vitro* antibakteriālās aktivitātes pētījumiem tika konstatēts, ka sagatavotie ķīmiski šķērssaistītie ϵ -PL/HA hidrogeļi nodrošina antibakteriālu iedarbību pret gramnegatīvo *E. coli* MSCL 332 (4. A att.). Antibakteriālā aktivitāte tika izvērtēta, izmantojot gan inhibīcijas zonas testu (24 h kontakta laiks), gan buljona atšķaidījuma testu (1 h kontakta laiks), liecinot gan par ātru antibakteriālu aktivitāti tiešā kontaktā, gan par noteiktu daudzumu nešķērssaistītu ϵ -PL molekulu izdalīšanos agara vidē, kā novērots difūzijas pētījumā. Turklāt *in vitro* tiešie pētījumi uz fibroblastu šūnām parādīja, ka pēc 24 h iedarbības saglabājas šūnu dzīvotspēja un šūnu saplūšanu (4. B–C att.).

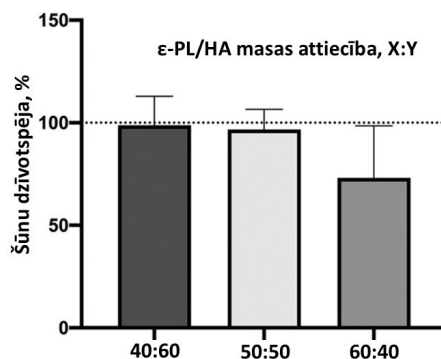
A

Kompozīcija	Inhibīcijas zonas diametrs* ± SD [mm]	Log10 baktēriju reducēšana**
ε-PL/HA 40:60 wt%	11,5 ± 0,6	1,8
ε-PL/HA 50:50 wt%	13,0 ± 1,2	2,7
ε-PL/HA 60:40 wt%	15,0 ± 0,0	3,3
Gentamicīns, 10 mg/mL	30,7 ± 0,6	-

B



C



4. att. (A) Kvantitatīvie rezultāti, kas iegūti, veicot inhibīcijas zonas pētījumus pēc 24 h ilgas iedarbības pret gramnegatīvo *E. coli* MSCL 332 celmu, un buljona atšķaidījuma pētījumi pēc 1 h ilgas iedarbības ar to pašu baktēriju celmu. (B) Mikroskopiskie šūnu dzīvotspējas attēli pēc tieša kontakta (24 h) ar BALB/c 3T3 šūnu līniju. (C) Kvantitatīvie rezultāti par šūnu dzīvotspēju, kas atspoguļoti %, sagatavotajiem ε-PL/HA hidrogelu sērijām pēc tieša kontakta ar BALB/c 3T3 šūnām.

Promocijas darba pirmajā daļā tika pierādīts, ka *in situ* veidojošos, ķīmiski šķērssaistītus ε-PL/HA hidrogelus var veiksmīgi izstrādāt, izmantojot EDC/NHS mediētu polimerizācijas mehānismu. Jaunu kovalento saišu veidošanos starp ε-PL un HA atklāja raksturīgie FTIR spektri, salīdzinot absorbcijas maksimumus, nobīdes un Amīda I, Amīda II un Amīda III joslu attiecības ar tīrām sastāvdaļām ε-PL un HA. Aprēķinātās $\text{NH}_3^+/\text{NH}_2$ attiecības vērtības palielinājās ar augstāku ε-PL saturu hidrogelos, liecinot par augstāku protonētu ε-amino grupu klātbūtni, kas saistītas ar antibakteriālo aktivitāti. Šo tendenci papildus apstiprināja antibakteriālie testi. Tīra ε-PL citotoksicitātes profils uzrādīja IC_{50} koncentrāciju 4,21 mg/mL, liecinot par potenciālu citotoksicitāti augstākās koncentrācijās. Tomēr visi trīs hidrogela sastāvi neuzrādīja citotoksisku iedarbību, tieši iedarbojoties uz BALB/c 3T3 šūnu līniju fibroblastiem, kas uzsver izstrādāto hidrogelu bioloģisko drošību. Ķīmiskā šķērssaistīšana izrādījās piemērota stratēģija, kā rezultātā tika iegūti ε-PL/HA hidrogeli ar uzlabotu strukturālo integritāti un stabilu stingrības moduli diapazonā no 10 kPa līdz 15 kPa, kas ir piemērots muskuļu un skeleta reģenerācijas lietojumiem (3. D att.) [63]. Stabils kovalento saišu tīklojums arī veicināja ilgstošu antibakteriālu iedarbību, vienlaikus saglabājot zemu citotoksicitāti. Turklāt provizoriski tika atklāts, ka ķīmiski šķērssaistītus ε-PL/HA hidrogelus var sterilizēt ar tvaika sterilizāciju (121 °C 20 min), neietekmējot to integritāti.

Promocijas darba otrajā daļā tika īstenoti šādi pētījumu uzdevumi: (a) sintēzes optimizācija, lai samazinātu HA degradācijas risku; (b) ϵ -PL un HA masas attiecības optimizācija, lai panāktu optimālas mehāniskās īpašības, augstu antibakteriālo aktivitāti, vienlaikus nodrošinot šūnu dzīvotspēju; (c) hidrogelu topoloģijas novērtēšana; (d) hidrogelu viskoelastīgo īpašību novērtēšana; (e) tvaika sterilizācijas ietekmes izpēte uz hidrogelu fizikālķīmiskajām īpašībām; (f) *in vitro* antibakteriālās aktivitātes un šūnu dzīvotspējas novērtēšana.

Ķīmiski šķērssaistītu ϵ -PL/HA hidrogelu sintēzes metodes optimizācija, topoloģijas novērtēšana un tvaika sterilizācijas ietekme uz fizikālķīmiskajām un antibakteriālajām īpašībām (3. publikācija)

Pirmkārt, tika modificēta ϵ -PL/HA hidrogelu sintēzes metode *in situ*, izmantojot EDC/NHS mediētu karboksil-amīna šķērssaiti, aizstājot 0,25M NaOH (HA gadījumā) un 0,25M HCl (ϵ -PL gadījumā) ūdens šķīdumus ar dejonizētu ūdeni (2. att.). Šīs modifikācijas mērķis bija novērst HA degradācijas risku sārmainos apstākļos sintēzes laikā. Paplašinot eksperimenta dizainu, tika sagatavoti ϵ -PL/HA hidrogeļi ar ϵ -PL un HA masas attiecību 40 : 60, 50 : 50, 60 : 40, 70 : 30 un 80 : 20 masas%.

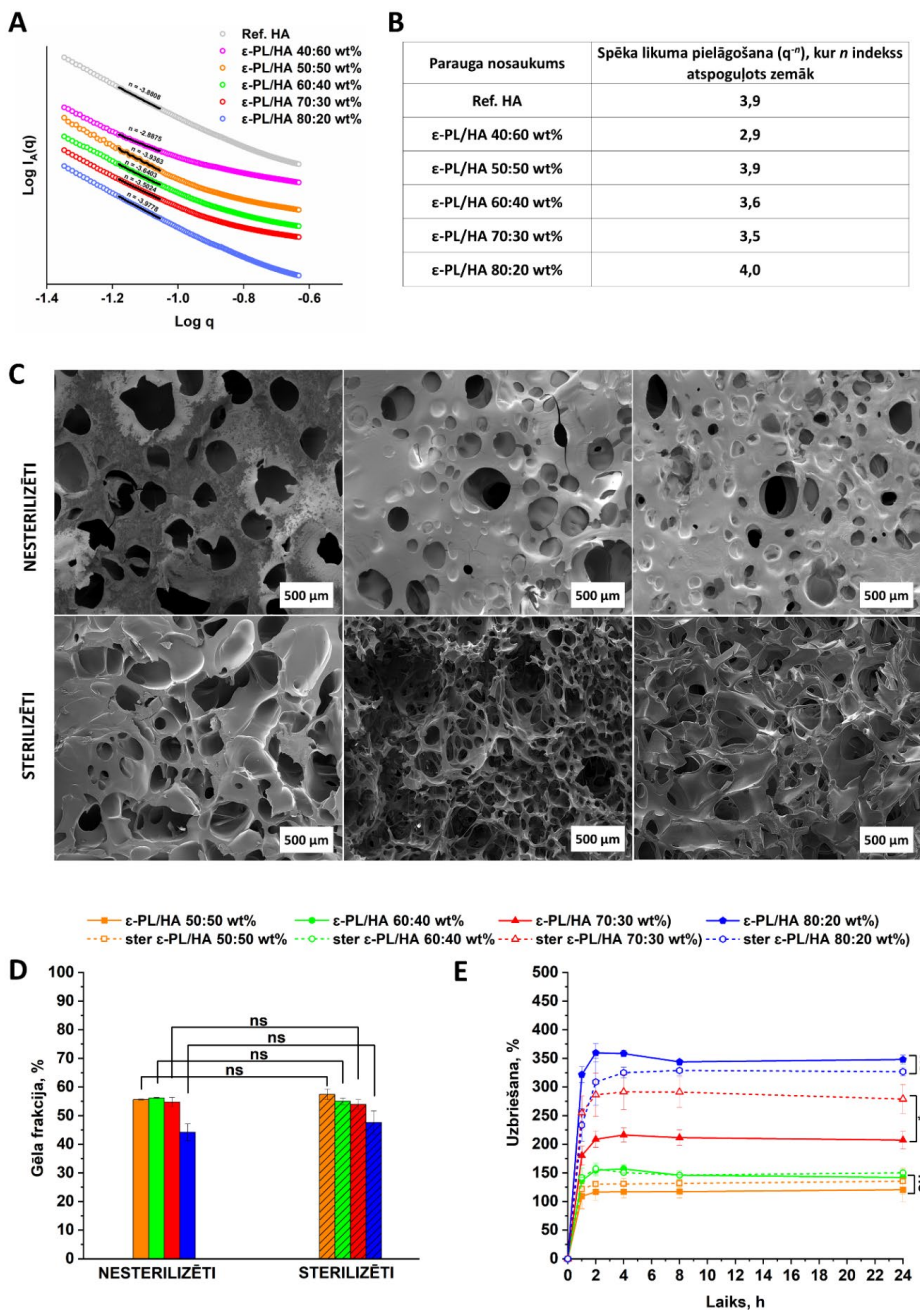
Otrkārt, tika veikta mazo leņķu rentgenstaru izkliedes (SAXS) analīze, lai izpētītu visu izgatavoto hidrogelu iekšējo struktūru un tīkla topoloģiju [13]. Topoloģiskajām īpašībām ir būtiska nozīme biomedicīniskos lietojumos, jo tās ietekmē hidrogelu viskoelastīgo uzvedību, mehānisko integritāti, uzbriecšanu un bioloģisko mijiedarbību. Īpaši būtiska ir hidrogeļa iekšējā virsmas struktūra, jo tā ietekmē biomateriāla mijiedarbību ar dzīvajiem audiem, tostarp šūnu adhēziju, migrāciju, mehānisko transdukciju, proliferāciju un antibakteriālo aktivitāti. SAXS analīze tika veikta q diapazonā ($0,045 \text{ nm}^{-1}$ – $0,233 \text{ nm}^{-1}$), kas atbilst reālās telpas izmēriem 27–140 nm. Šis diapazons ietver hidrogelam līdzīgo struktūru *Porod* reģionu (reālajā d telpā), tādējādi sniedzot galvenokārt informāciju par hidrogeļa tīkla virsmas īpašībām, t. sk. gludumu. Iegūtie izkliedes dati tika analizēti, izmantojot spēka likumsakarību pielāgošanu, lai iegūtu novirzes eksponentu (n), kas sniedz ieskatu virsmas topoloģijā. Iegūtie ķīmiski šķērssaistīto ϵ -PL/HA hidrogelu rezultāti ir attēloti kā dubultlogaritmiskie q grafiki (5. A att.). Kā kontroles paraugs tika izmantots augsti koncentrēts HA šķīdums, kas uzrādīja samazinātu izkliedes intensitāti $\sim q^{-3,9} \approx q^{-4}$, liecinot par tipiski gludām virsmām, kas veidojušās no lieliem polielektrolītu kompleksiem (5. B att.) [65]. Ķīmiski šķērssaistītie ϵ -PL/HA hidrogeļi uzrādīja līdzīgu samazinātu izkliedes intensitāti $\sim q^{(-3,6 \pm 0,4)}$, kas liecina par gludu un izturīgu tīkla topoloģiju *Porod* reģionā (5. B att.). Šis rezultāts ir saskaņā ar sagaidāmo topoloģiju ķīmiski šķērssaistītos tīklos, kuros gludu virsmu veidošanos nodrošina robustas kovalentās saites. Vienīgais izņēmums – ϵ -PL/HA hidrogelu sērija ar masas attiecību 40 : 60 masas% uzrādīja ievērojami atšķirīgu izkliedes intensitāti $\sim q^{-2,9}$ (5. B att.), kas pārsvarā raksturīga fizikāli šķērssaistītiem agregātu klasteriem ar raupjām virsmām [13]. Līdz ar to turpmākajos pētījumos tika izmantoti ϵ -PL/HA hidrogeļi ar ϵ -PL un HA masas attiecību 50 : 50, 60 : 40, 70 : 30 un 80 : 20 masas%.

Biomateriālu, īpaši hidrogelu, spēja izturēt konvencionālu tvaika sterilizāciju ir būtiska priekšrocība agrīnās izstrādes stadijās un klīniskās translācijas procesā. Tvaika sterilizācija ir ļoti efektīva, vienkārši lietojama un plaši pieejama sterilizācijas metode. Nākamajā posmā tika

pētīta tvaika sterilizācijas ietekme uz iepriekš izvēlētajām hidrogeļu sērijām, lai atklātu padziļinātas fizikālķīmiskās īpašības. Pēc tam tika veikta topoloģiskā izvērtēšana, kam sekoja skenējošās elektronu mikroskopijas (SEM) analīze. SEM tika izmantota, lai novērotu sagatavoto liofilizēto hidrogeļu paraugu morfoloģiju (5. C att.). Gan nesterilizētie, gan sterilizētie paraugi uzrādīja homogēnu trīsdimensiju tīklu ar savstarpēji saistītu porainību, un pēc sterilizācijas visiem hidrogeļiem tika konstatēta tikai minimāla ietekme. Turklāt poru izmēru sadalījums pēc sterilizācijas katrai attiecībai saglabājās līdzīgā makroizmēru diapazonā no $66,7 \pm 34,2 \text{ } \mu\text{m}$ līdz $193,35 \pm 103,05 \text{ } \mu\text{m}$.

Nesterilizētu ϵ -PL/HA hidrogeļu paraugu gela frakcijas vērtības pie ϵ -PL un HA masas attiecības 50 : 50, 60 : 40, 70 : 30 un 80 : 20 masas% bija attiecīgi $55,6 \pm 0,1 \%$, $56,2 \pm 0,2 \%$, $54,7 \pm 1,6 \%$ un $44,2 \pm 2,9 \%$ (5. D att.). Šīs vērtības labi sakrīt ar gela frakcijas vērtībām, kas iegūtas pirmajā publikācijā ($\sim 55 \%$) [24], izņemot 80 : 20 masas% paraugu, kuram bija ievērojami mazāka gela frakcija. Šis samazinājums tika skaidrots ar mazāku šķērssaistīšanās pakāpi konkrētajā attiecībā. Acīmredzot lielāks daudzums brīvā, nešķērssaistīta ϵ -PL difundēja, iegremdējot hidrogeļu paraugu ūdenī, rezultātā samazinot gela frakciju, jo lielāka ϵ -PL daļa izšķīda, salīdzinot ar sākotnējo polimēra masu hidrogelā. Starp nesterilizētiem un sterilizētiem hidrogeļu paraugiem ar vienādu ϵ -PL un HA masas attiecību netika novērotas būtiskas atšķirības gela frakcijas vērtībās ($p > 0,05$). Tas liecina, ka tvaika sterilizācija neietekmēja kopējo šķērssaistīšanās pakāpi ϵ -PL/HA hidrogeļu paraugos, tādējādi saglabājot sintēzes gaitā izveidoto tīkla topoloģiju.

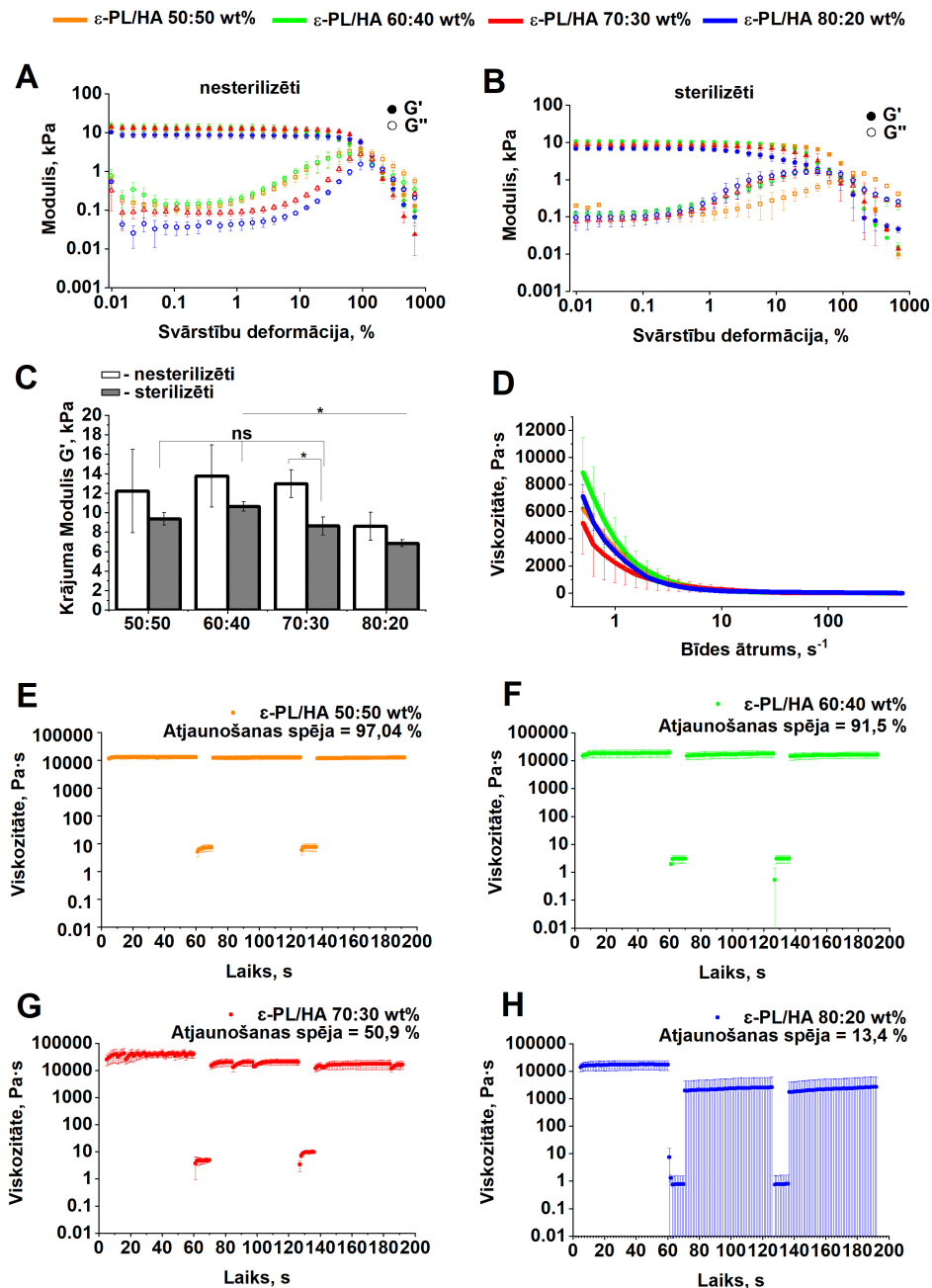
Uzbriešanas uzvedības pētījumos gan nesterilizēti (ϵ -PL/HA), gan sterilizēti (ster ϵ -PL/HA) hidrogeļi demonstrēja uzbriešanas pakāpi $> 100 \%$ pēc 2 h inkubācijas, saglabājot plato vērtības visā pētījuma laikā (24 h, 5. E att.). Nesterilizēto paraugu gadījumā uzbriešanas spēja palielinājās, palielinoties ϵ -PL masas attiecībai hidrogeļu paraugos 2 h laikā, attiecīgi 50 : 50 masas% sastāvam no 116% (50 : 50 masas% attiecība) līdz 340% (80 : 20 masas% attiecība). Visām trim sērijām ar attiecību 50 : 50, 60 : 40 un 80 : 20 masas% līdz 24 h netika novērotas būtiskas uzbriešanas spējas atšķirības ($p > 0,05$). Turpretī ster ϵ -PL/HA hidrogeļu ar ϵ -PL un HA masas attiecību 70 : 30 masas% uzbriešanas spēja palielinājās no $\sim 215 \%$ līdz $\sim 290 \%$ ($p < 0,05$), kas, iespējams, liecina par mehāniski aktīvo šķērssaišu samazināšanos. Neraugoties uz šo novēroto atšķirību, visi ster ϵ -PL/HA hidrogeļi uzbrieda 116–350 % robežās (atkarībā no ϵ -PL masas attiecības) pēc 4 h inkubācijas fizioloģiskos apstākļos (37°C), demonstrējot atbilstošu strukturālo stabilitāti un kohēzijas īpašības potenciālai lietošanai audu inženierijā.



5. att. ϵ -PL/HA hidrogelu fizikālķīmisko īpašību izpēte [13]. (A) SAXS līknes ϵ -PL/HA hidrogeliem ar masas attiecību 40 : 60, 50 : 50, 60 : 40, 70 : 30 un 80 : 20 masas%. (B) Aprēķinātās spēka likuma atbilstības indeksa n aprēķinātās vērtības no q izkliedes samazinājuma (q^{-n}). (C) SEM mikrofotogrāfijas nesterilizētiem (augšā) un sterilizētiem hidrogeliem (apakšā), no kreisās uz labo pusi: 60 : 40, 70 : 30 un 80 : 20 masas% attiecīgi. (D) Nesterilizētu un sterilizētu ϵ -PL/HA hidrogelu paraugu gēla frakcijas vērtības. (E) Nesterilizēto un sterilizēto paraugu uzbriešanas līknes. D–E) Dati attēloti kā vidējā vērtība $\pm$ SD ($n = 3$).

Tika veiktas dažādas reoloģiskās analīzes, lai izpētītu sagatavoto ϵ -PL/HA hidrogelu viskoelastīgās īpašības (6. att.). Vispirms reoloģiskās īpašības tika vērtētas atkarībā no hidrogelu masas attiecībām un sterilizācijas. Amplitūdas svārstību pētījumi (6. A–B att.) tika veikti oscilācijas režīmā deformācijas diapazonā no 0,01 % līdz 1000 % (ϵ), pie konstantas frekvences 1 Hz, kas atbilst fizioloģiskajiem apstākļiem un 25 °C. No iegūtajām nesterilizētu hidrogelu līknēm (6. A att.) tika secināts, ka hidrogeliem piemīt mīksta cietai vielai līdzīga uzvedība ar krājuma moduļa (G') pārsvaru pār zudumu moduli (G'') lineārās viskoelastības reģionā (LVR). Tomēr ϵ -PL/HA hidrogeliem tika novērots ierobežots LVR $\sim 0,1$ –1 % svārstību deformācijas diapazonā. Turklāt novērotā G'' uzvedība attiecībā pret G' uzrādīja lielāku G'/G'' attiecību pie zemākām deformācijām, bet diezgan strauji samazinājās līdz krustošanās punktam $G' = G''$. Visām kompozīcijām šis krustošanās punkts saglabājās pie $\epsilon \approx 100$ %, kas uzsvēra hidrogeļa matricas noturību pret pāreju no cietas uz šķidru fāzi galvenokārt stabilāku un elastīgāku ķīmisko šķērssaišu dēļ. Sterilizēto paraugu gadījumā (6. B att.) tika novērotas nelielas atšķirības: (i) visu kompozīciju krustošanās punkts ($G' = G''$) mainījās no iepriekš identificētā $\epsilon \approx 100$ % uz $\epsilon \approx 70$ %; (ii) G'' uzvedība pie zemākām svārstību deformācijas vērtībām ($\sim 0,01$ –1 %) kļuva identiska visām kompozīcijām, salīdzinot ar nesterilizētiem paraugiem tajā pašā svārstību deformācijas vērtību diapazonā. To varētu izskaidrot ar faktu, ka sterilizācijas rezultātā daļēji zūd fizikālās mijiedarbības hidrogeļa matricā, ko rada nesasaistītās ϵ -PL molekulas un negatīvi uzlādētās HA funkcionālās grupas. Nākamajā posmā krājuma moduļa (G') vērtības tika iegūtas no nesterilizētu un sterilizētu hidrogeļa paraugu amplitūdas svārstību līknēm pie $\epsilon = 0,2$ % LVR (6. C att.). Krājuma moduļa vērtības sniedz ieskatu par hidrogelu mehānisko stingrību. Tika secināts, ka hidrogelu kompozīcijām ar masas attiecību 50 : 50, 60 : 40 un 80 : 20 masas% stingrības modulis būtiski neatšķiras pirms un pēc sterilizācijas ($p > 0,05$). Savukārt 70 : 30 masas% hidrogeliem tika konstatēta statistiski nozīmīga atšķirība ($p < 0,05$), liecinot, ka sterilizācija būtiskāk ietekmē šīs kompozīcijas struktūru un topoloģiju. Neskatoties uz to, ϵ -PL/HA hidrogelu stingrība ar 50 : 50, 60 : 40 un 70 : 30 masas% kompozīcijām pirms un pēc sterilizācijas saglabājās ap 10 kPa, savukārt 80 : 20 masas% kompozīcijai tā bija zemāka – 8,6 kPa pirms sterilizācijas un samazinājās līdz 6,9 kPa pēc apstrādes. Apkopojot iepriekš teikto, var secināt, ka stinguma vērtības liecina, ka šie hidrogeļi pēc sterilizācijas joprojām atbilst stingruma prasībām (5–15 kPa), piemēram, kombinētiem antibakteriāliem un muskuļu un skeleta reģenerācijas lietojumiem [24].

Turpmākā reoloģiskā izpēte tika veikta plūsmas režīmā, un tās mērķis bija novērtēt sagatavoto hidrogeļa paraugu injicējamības īpašības. No bīdes ātruma atkarīgās viskozitātes līknēm (6. D att.) varēja redzēt, ka visiem sagatavotajiem paraugiem, palielinoties bīdes ātrumam, viskozitāte strauji samazinās. Šī tendence liecina, ka sagatavotajiem hidrogeliem piemīt injicējamības/šļircējamības. Lai precīzāk atbildētu uz šo jautājumu, nākamajā posmā tika veikti atjaunošanas cikla pētījumi. Atjaunošanās cikli tika veikti, lai simulētu bīdes spriegumu, kas rodas hidrogeļa ekstrūzijas laikā no šļirces/ adatas, un novērotu matricas atjaunošanos, balstoties viskozitātes vērtībās (6. E att.).



6. att. Sagatavoto ϵ -PL/HA hidroģelu reoloģiskie pētījumi [2], [13]. (A–B) Amplitūdas svārstību testa līknes nesterilizētiem (A) un sterilizētiem (B) dažāda sastāva hidroģelu paraugiem. (C) Ekstrahētais krājuma modulis (G') no amplitūdas testiem pie $\epsilon = 0,2$ % deformācijas (LVR). (D) Līknes viskozitātes atkarībai no bīdes ātruma. (E–H) Atjaunošanas cikla tests, kas veikts 5 (3 + 2) ciklu laikā, kas atbilst trīs cikliem bez stresa – $0,1$ s⁻¹ bīdes ātrums 60 s un diviem stresa izraisītiem cikliem – 10 s pie 200 s⁻¹. Visi reoloģiskie mērījumi tika veikti trīs atkārtojumos, lai nodrošinātu reproducējamību un datu ticamību.

Kopumā līknes uzrādīja izjauktu starpmolekulāro saišu atjaunošanās iezīmes pēc inducētas slodzes apstākļiem, t. i., pie augstām bīdes ātruma vērtībām. Tika konstatēts, ka 50 : 50 un 60 : 40 masas% kompozīcijas ir vispiemērotākās injicējamiem biomateriāliem, jo tām bija stabila atjaunošanās pakāpe, kas pārsniedza 90 % pēc vairākiem slodzes cikliem. Zemākas atjaunošanās vērtības tika konstatētas 70 : 30 masas% sastāvam, kas liecina par zemāku matricas integritāti un elastīgāku ķēžu klātbūtni. Savukārt ϵ -PL/HA hidrogeļi ar 80 : 20 masas% sastāvu uzrādīja ļoti zemas atjaunošanās īpašības, jo tika atjaunoti tikai 13,4 % viskozitātes, salīdzinot ar sākotnējām viskozitātes vērtībām, un, iespējams, tikai atsevišķu klasteru klātbūtnes dēļ sadalītā hidrogeļa paraugā. Rezultātā trīs sastāvi – 50 : 50, 60 : 40 un 70 : 30 masas% – spēja demonstrēt atjaunošanās īpašības. Vērtību atšķirības starp šīm kompozīcijām var skaidrot ar matricas strukturālo integritāti, jo, palielinoties ϵ -PL masas attiecībai, vairāk nešķērssaistītu ϵ -PL molekulu savienojas ar HA funkcionālajām grupām sintēzes laikā, tādējādi traucējot ķīmiskā šķērssaistīšanās tīkla veidošanos un organizāciju. Apkopojot iepriekšminēto, tika veikta fizikālķīmiskā raksturošana sēriju ϵ -PL/HA hidrogeļu sērijām ar dažādām ϵ -PL un HA masas attiecībām. Hidrogeļi uzrādīja gela frakcijas vērtības, kā arī uzbriešanas īpašības, kas raksturīgas audu inženierijas lietojumiem Turklāt tika apstiprināts, ka hidrogeļi var tikt pakļauti tvaika sterilizācijai, būtiski neietekmējot šīs galvenās īpašības. Tomēr reoloģiskā analīze atklāja, ka 80 : 20 masas% kompozīcija neatbilst vēlamajām viskoelastīgajām prasībām attiecībā uz injicējamību un mehānisko stingrību. Pamatojoties uz šiem rezultātiem, turpmākajai *in vitro* bioloģiskajai novērtēšanai šī promocijas darba ietvaros tika izvēlētas tikai ϵ -PL/HA hidrogeļi ar 50 : 50, 60 : 40 un 70 : 30 masas%.

ϵ -PL/HA hidrogeļu antibakteriālā potenciāla un citotoksicitātes novērtēšana *in vitro* (4. publikācija)

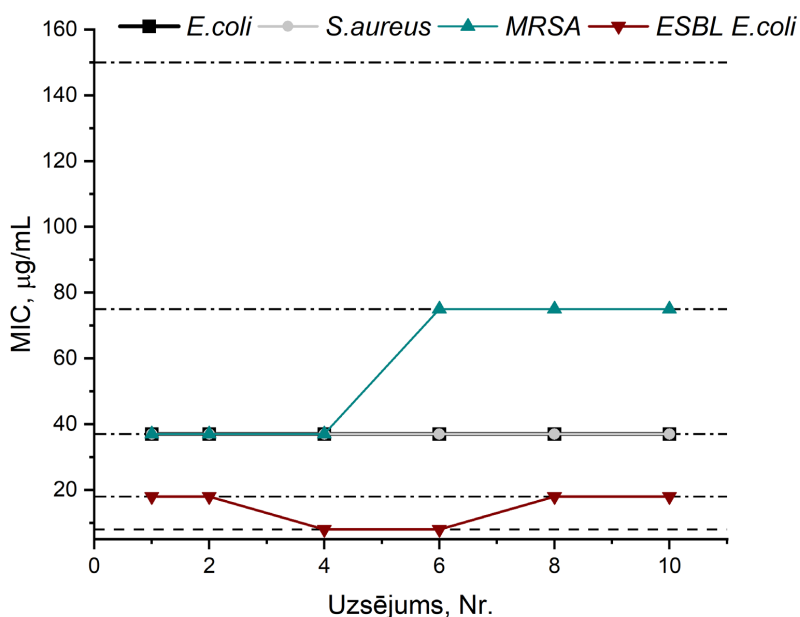
Promocijas darba pirmajā daļā aprakstītie iepriekšējie pētījumi apstiprināja izstrādāto ϵ -PL/HA hidrogeļu antibakteriālo potenciālu pret *E. coli* MSCL 332, izmantojot inhibīcijas zonas un buljona atšķaidīšanas testus gan īstermiņa (1 h), gan ilgtermiņa (24 h) ekspozīcijā. Tomēr vispirms bija būtiski izpētīt tīrā ϵ -PL antibakteriālo profilu, nosakot tā minimālo inhibējošo un baktericīdo koncentrāciju (MIC/MBC), kā arī novērtējot iespējamo rezistences attīstību kontaktā ar baktērijām. Tīrā ϵ -PL un ϵ -PL/HA hidrogeļu antibakteriālā aktivitāte tika raksturota ar buljona atšķaidīšanas metodi, izmantojot tiešu/netiešu kontaktu testus saskaņā ar modificētajiem CLSI un EU-CAST standartiem [66]. Antibakteriālie pētījumi tika veikti pret dažādiem gramnegatīviem un grampozitīviem baktēriju celmiem, tostarp ATCC references *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) un *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), klīniski izolētām *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) un grūti ārstējamām klīniski izolētām multirezistentām baktērijām – meticilīnrezistentu *Staphylococcus aureus* (MRSA), paplašinātā spektra β -laktamāzes producējošo *Escherichia coli* (ESBL *E. coli*). Tīrā ϵ -PL MIC un MBC vērtības norādītas 1. tabulā. Rezultāti uzrādīja inhibējošu (MIC) un baktericīdu (MBC) aktivitāti pret visiem iepriekš minētajiem baktēriju celmiem mikrogramu diapazonā, savukārt IC₅₀, kā iepriekš noteikts, bija 4,21 mg/mL peļu fibroblastu šūnu līnijā Balb/c 3T3. Šie rezultāti liecina, ka iespējams modulēt ϵ -PL masas attiecību hidrogeļu paraugos, lai nodrošinātu augstu antibakteriālo aktivitāti, vienlaikus saglabājot šūnu dzīvotspēju.

Iegūtās tīrā ϵ -PL MIC/MBC koncentrāciju vērtības

Baktēriju celms	ϵ -PL MIC, $\mu\text{g/ml}$	ϵ -PL MBC, $\mu\text{g/ml}$
<i>E. coli</i>	37	75
<i>P. aeruginosa</i>	75	350
<i>ESBL E. coli</i>	18	37
<i>S. aureus</i>	37	75
<i>S. epidermidis</i>	18	37
MRSA	37	75

Turklāt tika pierādīts, ka ne references celmi *E. coli* un *S. aureus*, ne arī klīniski izolētie multirezistentie celmi *ESBL E. coli* un MRSA baktēriju celmi neattīstīja rezistenci pret ϵ -PL 1 mēneša eksperimentālā perioda laikā (10 uzsējumi), kas liecina par ϵ -PL/HA hidrogelu spēcīgu potenciālu nākotnes antibakteriālajos lietojumos (7. att.).

Rezultāti ar ϵ -PL/HA hidrogeļiem uzrādīja statistiski nozīmīgu baktēriju koloniju augšanas inhibīciju pēc 24 h kontakta ($p < 0,05$), salīdzinot ar kontroles paraugiem, visos testētajos baktēriju celmos un hidrogelu kompozīcijās (8. A att.).



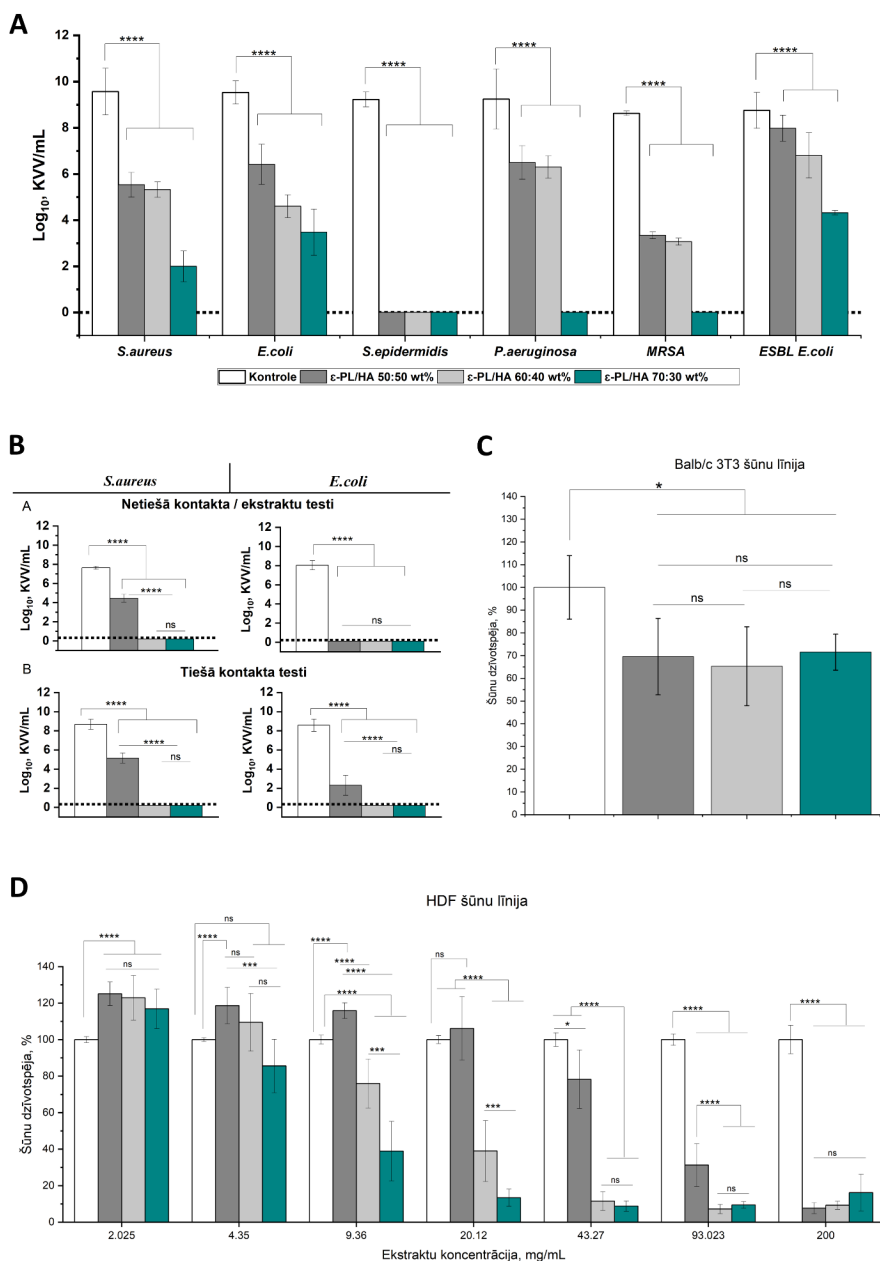
7. att. Tīru ϵ -PL rezistences attīstības pētījumi tika veikti pret *E. coli*, *S. aureus*, MRSA un *ESBL E. coli*. Eksperiments tika veikts 10 uzsējumu garumā, katrā solī pārkultivējot baktēriju kultūras no sub-MIC koncentrācijām.

Tomēr tika novēroti vairāki būtiski rezultāti: (i) inhibīcijas pakāpe, kas tika izteikta kā Log_{10} samazinājums, bija atkarīga no ϵ -PL masas attiecības hidrogeļa sastāvā, īpaši izceļas 70 : 30 masas% ϵ -PL/HA kompozīcija, kas uzrādīja visaugstāko inhibīcijas pakāpi. *S. epidermidis*,

P. aeruginosa un MRSA baktēriju celmu gadījumā tika panākta pilnīga baktēriju izskaušana; ii) hidroģelu kompozīcijām ar 50 : 50 un 60 : 40 masas% tika novērota skaidra efektīvas inhibīcijas tendence pret grampozitīviem celmiem, tostarp references *S. aureus* un *S. epidermidis*, kā arī klīniski izolēto multirezistentu MRSA. Pretēji tam zemāka inhibīcijas aktivitāte tika konstatēta pret gramnegatīviem celmiem (*E. coli*, *P. aeruginosa* un *ESBL E. coli*). Šīs atšķirības var skaidrot ar gramnegatīvo baktēriju šūnu sienas unikālajām strukturālajām īpatnībām, piemēram, ārējās membrānas klātbūtni, kas darbojas kā papildu barjera polipeptīdu molekulu iekļūšanai, un eflukss sūkņu aktivitāti, kas var samazināt antibakteriālo aģentu intracelulāro uzkrāšanos.

Tika pētīts ϵ -PL/HA hidroģelu antibakteriālais potenciāls ilgstošā laika periodā (līdz 168 h). Hidroģelu paraugi tika inkubēti vienu nedēļu, veicot barotnes nomainīšanas ciklus pēc 1 h un 24 h inkubācijas. Šāda pieeja tika izvēlēta, lai izvērtētu, vai pēc sākotnējās straujās nešķērssaistītā ϵ -PL izdalīšanās, kas sagaidāma pirmajās 24 h, ϵ -PL/HA hidroģela matrica spēj nodrošināt pakāpenisku ϵ -PL izdalīšanos saistībā ar matricas degradāciju. Pēc 168 h tika veikti gan tiešā kontakta, gan netiešā (supernatants) kontakta antibakteriālie testi, izmantojot 24 h ekspozīciju pret gramnegatīvo *E. coli* un grampozitīvo *S. aureus* (8. B att.). Rezultāti parādīja, ka visi hidroģelu sastāvi joprojām spēja veikt statistiski nozīmīgu antibakteriālo aktivitāti ($p < 0,05$) abos ekspozīcijas veidos: gan tiešā baktēriju kontaktā ar hidroģela matricu, gan netiešā kontaktā ar supernatantiem, kas iegūti pēc 168 h. Ievērojami, ka 50 : 50 masas% ϵ -PL/HA hidroģela kompozīcija uzrādīja zemāko inhibīcijas pakāpi, salīdzinot ar citām kompozīcijām abos ekspozīcijas veidos pret *S. aureus*, kas varētu tikt skaidrots ar tā blīvāku un kompaktāku matricu, kuras dēļ samazinās degradācijas ātrums un ierobežojas pozitīvi lādēto funkcionālo grupu pieejamība hidroģela virsmā.

Citotoksicitāte tika izvērtēta, izmantojot gan tiešā, gan netiešā kontakta testus (8. C–D att.). Netiešajā testā (8. D att.), izmantojot cilvēka dermas fibroblastus (HDF), visas ϵ -PL/HA hidroģelu sērijas neuzrādīja citotoksicitāti pie ekstrakta koncentrācijām līdz 4,35 mg/mL, jo šūnu dzīvotspēja pēc 48 h ekspozīcijas saglabājās virs 70 % (*ISO 10993-5:2009* [67] noteiktais sliekšnis citotoksicitātes neesamībai). Ievērojami, ka pie ekstrakta koncentrācijas 2,025 mg/mL šūnu dzīvotspēja bija būtiski augstāka nekā kontroles paraugos, kas liecina, ka ϵ -PL atbilstošās koncentrācijās var veicināt šūnu proliferāciju. Interesanti, ka 50 : 50 masas% ϵ -PL/HA kompozīcija neuzrādīja citotoksicitāti (šūnu dzīvotspēja > 70 %) HDF šūnām līdz pat 93,023 mg/mL [2]. Šis rezultāts korelē ar ilgtermiņa antibakteriālajiem pētījumiem, kuros tā pati kompozīcija demonstrēja zemāku antibakteriālo aktivitāti, iespējams, blīvākas un kompaktākas šķērssaistītās matricas dēļ, kas samazināja ϵ -PL izdalīšanos un virsmas lādiņu. Savukārt 60 : 40 masas% kompozīcijai tika novērota citotoksiskā iedarbība jau pie 20,12 mg/mL, savukārt 70 : 30 masas% kompozīcijai – pie tik zemas koncentrācijas kā 9,36 mg/mL, kas liecina par korelāciju starp pieaugošo ϵ -PL saturu hidroģelu paraugos un samazinātu šūnu dzīvotspēju. Pie koncentrācijas $\geq 93,023$ mg/mL visas kompozīcijas uzrādīja būtisku citotoksicitāti [2]. Tiešā kontakta pētījumos ar Balb/c 3T3 šūnām (8. C att.) pēc 24 h ekspozīcijas tika konstatēta viegla citotoksicitāte visās ϵ -PL/HA hidroģelu sērijās, šūnu dzīvotspējai saglabājoties tuvu pieļaujamajam sliekšnim (~ 70 %): $69,5 \pm 16,8$; $65,3 \pm 17,4$ un $71,5 \pm 7,9$ attiecīgi 50 : 50, 60 : 40 un 70 : 30 masas% hidroģelu kompozīcijām. Statistiski nozīmīgas atšķirības starp kompozīcijām netika konstatētas.



8. att. Sagatavoto ϵ -PL/HA hidrogelu *in vitro* pētījumi [2]. Visām ϵ -PL/HA hidrogelu kompozīcijām grafikos tika izmantota vienota krāsu palete, kas norādīta leģendā zem A grafika. (A) Tiešā kontakta pētījumi, izmantojot buljona atšķaidīšanas metodi pret dažādiem gramnegatīviem un grampozitīviem baktēriju celmiem. Inhibīcijas rezultāti attēloti kā Log_{10} baktēriju skaita samazinājums. (B) Tiešā kontakta un netiešie (uz supernatanta bāzes) antibakteriālie pētījumi pēc 168 h inkubācijas ar barotnes nomainīu 1 h un 24 h laikā pret *E. coli* un *S. aureus*. (C) Tiešā šūnu dzīvotspējas noteikšana, izmantojot Balb/c šūnu līniju pēc 24 h ekspozīcijas. (D) Netiešā šūnu dzīvotspējas noteikšana, izmantojot HDF šūnu līniju pēc 48 h ekspozīcijas dažādās ekstraktu koncentrācijās. Katrā eksperimentā tika veikti trīs atkārtojumi, un rezultāti attēloti kā vidējā vērtība $\pm$ SD.

Apkopojot iepriekš teikto, antibakteriālo īpašību izpēte parādīja, ka ϵ -PL/HA hidrogeliem piemīt inhibējošā aktivitāte pret plašu grampozitīvo un gramnegatīvo baktēriju spektru, tostarp klīniski nozīmīgiem un multirezistentiem celmiem. Turklāt *in vitro* netiešais citotoksicitātes tests (48 h) atklāja ϵ -PL devas atkarību no šūnu dzīvotspējas. Šie rezultāti nepārprotami liecina, ka gan antibakteriālo aktivitāti, gan šūnu dzīvotspēju ϵ -PL/HA hidrogelos iespējams modulēt, mainot ϵ -PL koncentrāciju hidrogela matricā. Starp testētajām kompozīcijām visdaudzsoļākā izrādījās ϵ -PL/HA 50 : 50 masas% kompozīcija, kas nodrošināja nozīmīgu un noturīgu antibakteriālo aktivitāti pret dažādiem baktēriju celmiem, vienlaikus saglabājot pozitīvu šūnu dzīvotspēju, tādējādi panākot labvēlīgu līdzsvaru starp antibakteriālo efektivitāti un bioloģisko saderību.

Antibakteriālu Sr-HAp funkcionalizētu ϵ -PL/HA hidrogelu sintēze un raksturošana (5. publikācija)

Iepriekš izstrādātā ϵ -PL/HA hidrogela kompozīcija ar 50 : 50 masas% masas attiecību uzrādīja ātras iedarbības (līdz 24 h) un ilgstošu (līdz 168 h) antibakteriālo aktivitāti pret plašu patogēnu spektru, vienlaikus demonstrējot labvēlīgu šūnu dzīvotspēju, piemērotību tvaika sterilizācijai, injicējamību un vienmērīgu virsmas topoloģiju. Balstoties šajās īpašībās, 50 : 50 masas% ϵ -PL/HA hidrogela kompozīcija tika izvēlēta tālākai kompozītsistēmas izstrādei, funkcionālajai modifikācijai ar stronciju aizvietota hidroksilapatīta (Sr-HAp) nanodaļiņām. Šīs funkcionālās modifikācijas mērķis bija apvienot abu komponentu priekšrocības: izstrādātās ϵ -PL/HA hidrogela matricas viskoelastīgās un dabiski antibakteriālās īpašības ar Sr-HAp nanodaļiņu kaulaudu reģenerāciju veicinošo iedarbību, izstrādājot antibakteriālus un bioaktīvus hidrogelus kaulaudu inženierijas lietojumiem. Šajā pētījumā izstrādātas vairākas kompozīcijas, tostarp tīra ϵ -PL/HA hidrogela matrica ar 50 : 50 masas% attiecību un Sr-HAp/ ϵ -PL/HA kompozīthidrogeli ar dažādām neorganiskās (Sr-HAp) un organiskās (ϵ -PL/HA 50 : 50 masas%) fāzes masas attiecību – 40 %, 50 % un 60 % (9. A att.).

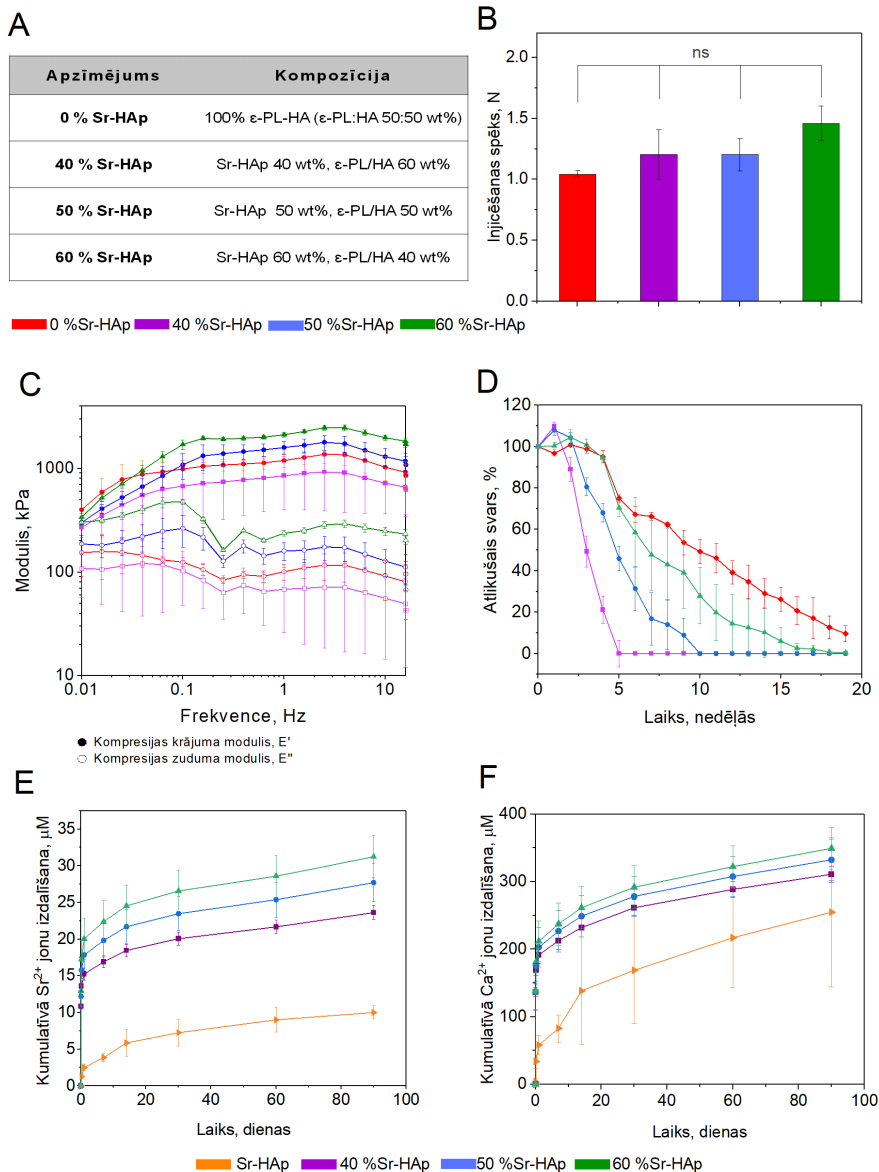
Injicējamība ir nozīmīga biomateriālu īpašība, jo īpaši kaulu reģenerācijas lietojumos, tāpēc tika pētīts sagatavoto hidrogelu injekcijas spēks (9. B att.). Rezultāti parādīja, ka visas kompozīcijas, ieskaitot tīru ϵ -PL/HA hidrogelu, var injicēt caur šļirci ar uzgaļa iekšējo diametru 1,8 mm, lietojot 3 N injekcijas spēku. Saskaņā ar literatūras datiem, adatu izmēri diapazonā no 10 mm (iekšējais diametrs 2,69 mm) līdz 16 mm (iekšējais diametrs 1,19 mm) tiek uzskatīti par piemērotiem ortopēdiskām procedūrām, piemēram, kaula defektu un plaisu aizpildīšanai [68]. Turklāt injekcijas spēkam jāpaliek zem 30 N, kas tiek definēts kā manuālās injicējamības augšējā robeža [69]. Balstoties šajos kritērijos, izstrādātie hidrogeli klasificējami kā manuāli injicējami un potenciāli piemēroti klīniskām lietojuma vajadzībām.

Lai turpmāk izvērtētu Sr-HAp/ ϵ -PL/HA hidrogelu viskoelastīgās īpašības, tika veikti spiedes testi kā daļa no to reoloģiskās raksturošanas. Spiedes testu rezultāti (9. C att.) atklāja līdzīgu uzvedību un kompresijas krājuma moduļa (E') vērtības ~ 1000 kPa visām testētajām sērijām frekvences diapazonā, kas attiecas uz fizioloģiskajiem apstākļiem (0,1–10 Hz). Saskaņā ar literatūras datiem, parasti kaulaudu reģenerācijai paredzēto kompozīthidrogelu kompresijas krājuma modulis (E') ir robežās no 100 kPa līdz vairākiem MPa [70], [71]. Tādējādi var secināt, ka izstrādāto Sr-HAp/ ϵ -PL/HA hidrogelu kompresijas krājuma moduļa vērtības atbilst šim diapazonam un tos var izmantot kā biomateriālus kaulaudu reģenerācijai. Tomēr jāatzīmē, ka

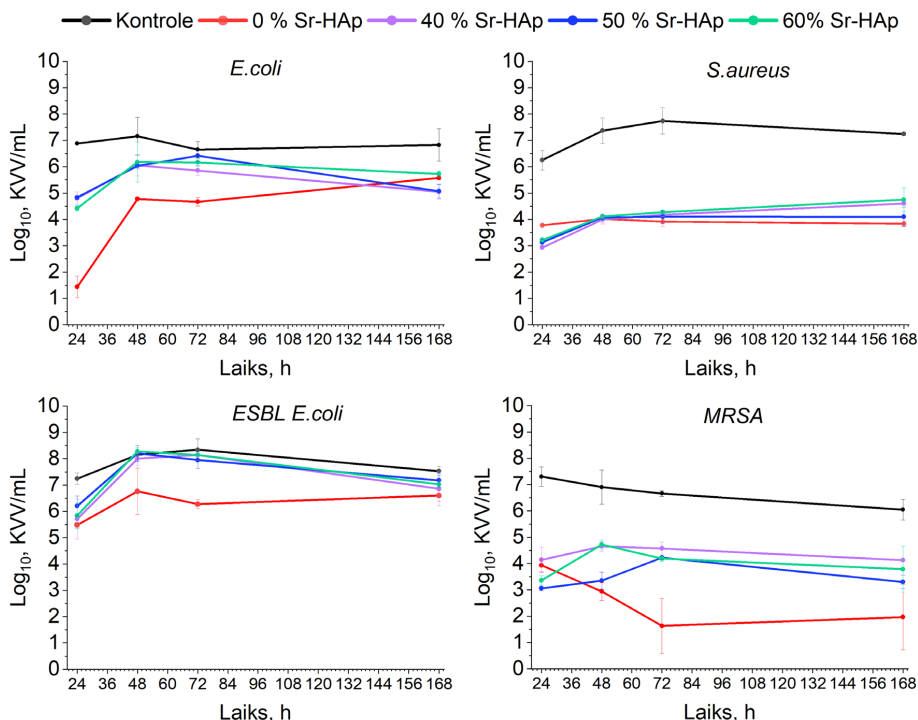
šie pētījumi nesniedz visaptverošu mehānisko īpašību novērtējumu, jo īpaši dinamiskas slodzes vai nestspējas apstākļos. Tāpēc Sr-HAp/ε-PL/HA hidroģelus nevar uzskatīt par piemērotiem lietojumslodzi nesošās vietās. Neskatoties uz to, tie var kalpot kā daudzsološi biomateriāli, kas nodrošina labvēlīgus apstākļus dabiskajam kaula pārveidošanās procesam, saglabājot barības vielu transportu, nodrošinot porainību šūnu migrācijai, strukturālo integritāti un imitējot galvenās ekstracelulāras matricas īpašības [72].

Lai papildinātu iepriekš definēto praktisko funkcionalitāti, turpmākajos pētījumos tika veikta enzīmatiskās degradācijas un jonu izdalīšanās (Ca^{2+} un Sr^{2+}) kinētisko profilu analīze. Enzīmatiskās degradācijas līknes (9. D att.) parādīja, ka Sr-HAp/ε-PL/HA hidroģeli degradējas hialuronidāzi saturošā PBS vidē 20 nedēļu laikā. Savukārt 0% Sr-HAp kompozīcijas uzrādīja pakāpenisku degradācijas gaitu, sasniedzot pilnīgu degradāciju 20 nedēļās, 40 %, 50 % un 60 % Sr-HAp kompozīcijas degradējās straujāk, attiecīgi pilnībā noārdoties jau pēc 5, 10 un 16 nedēļām. Šie rezultāti liecina, ka Sr-HAp/ε-PL/HA hidroģelu biodegradācijas profils ir atkarīgs no Sr-HAp satura un to iespējams regulēt, lai pielāgotu konkrētām kaulaudu reģenerācijas lietojuma prasībām. Attiecībā uz jonu izdalīšanās līknēm tika novērots, ka Ca^{2+} un Sr^{2+} joni no hidroģelu matricas tika izdalīti strauji (*burst release*), salīdzinot ar tīra Sr-HAp izdalīšanās profilu (9. E–F att.). Iespējamais iemesls ir ε-PL/HA hidroģelu matricas skābā daba, kas var veicināt Sr-HAp šķīšanu un izraisīt straujo jonu izdalīšanos pirmajās eksperimenta dienās. Pēc tam Ca^{2+} un Sr^{2+} jonu izdalīšanās no Sr-HAp/ε-PL/HA hidroģeliem turpinājās lēni un nepārtraukti visa trīs mēnešu eksperimentālā perioda laikā. Būtiski, ka Sr^{2+} jonu koncentrācija nepārsniedza 20–30 μM, savukārt Ca^{2+} jonu izdalīšanās bija 200–350 μM diapazonā. Iepriekšējie pētījumi ir parādījuši, ka Sr^{2+} jonu koncentrācijas līdz 40 μM veicina osteoblastu proliferāciju šūnu kultūrās [73], savukārt paaugstināta Ca^{2+} jonu koncentrācija līdz 900 μM var vēl vairāk pastiprināt Sr^{2+} jonu kaulaudu reģeneratīvo efektu [74].

Noslēgumā tika izvērtēta Sr-HAp/ε-PL/HA hidroģelu antibakteriālā aktivitāte gan īstermiņa (24 h), gan ilgtermiņa (līdz 168 h) laika periodā (10. att.). Eksperimentālie laika punkti tika noteikti 24 h, 48 h, 72 h un 168 h, un pētījumi tika veikti pret grampozitīvajiem *S. aureus* (*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923, references celms), MRSA (pret meticilīnu rezistents *Staphylococcus aureus*, klīniski izolēts multirezistents celms), kā arī pret gramnegatīvām baktērijām *E. coli* (*Escherichia coli*, ATCC 25922, references celms), *ESBL E. coli* (paplašināta spektra β-laktamāzi producējošs *Escherichia coli*, klīniski izolēts multirezistents celms). Iegūtie rezultāti atklāja, ka Sr-HAp/ε-PL/HA hidroģelu eksperimentālās sērijas spēj inhibēt gan references, gan klīniski izolētos multirezistentos gramnegatīvos un grampozitīvos baktēriju celmus. Tomēr jāuzsver vairākas tendences un nianšes. Pirmkārt, tika novērota augstāka inhibīcijas pakāpe pret grampozitīvajām baktērijām, tostarp gan references, gan rezistentajiem celmiem. Šie rezultāti saskan ar iepriekšējiem tīro ε-PL/HA hidroģelu pētījumu rezultātiem (8. A att.), un līdzīgi tika atkārtoti novēroti arī 0 % Sr-HAp gadījumā. Kopumā relatīvi augsta inhibīcijas pakāpe saglabājās visām Sr-HAp/ε-PL/HA hidroģelu sērijām visa eksperimentālā perioda laikā. Otrkārt, salīdzinoši zemāka inhibīcijas pakāpe, salīdzinot ar grampozitīvajām baktērijām, tika novērota pret gramnegatīvajām baktērijām (gan references, gan klīniskajiem izolātiem). Pie 24 h laika punkta 0 % Sr-HAp kompozīcijas antibakteriālā aktivitāte sakrita ar ε-PL/HA hidroģelu ar 50 : 50 masas% iegūtajiem rezultātiem (8. A att.). Turklāt statistiski nozīmīga *E. coli* un *ESBL E. coli* inhibīcija visām eksperimentālajām sērijām tika novērota tikai īstermiņa laika periodā (24 h).



9. att. Sr-HAp/ε-PL/HA hidrogelu fizikālķīmisko īpašību pētījumi [72]. (A) Sr-HAp/ε-PL/HA hidrogelu apzīmējumi un sastāvs, kas izmantoti turpmākajos eksperimentālajos pētījumos. (B) Injekcijas spēku pētījumi. Starp izmantotajām kompozīcijām netika konstatētas statistiski nozīmīgas injekcijas spēka vērtību atšķirības (ns, $p > 0,05$). (C) Kompresijas pētījumi hidrogelu reoloģiskās izpētes ietvaros. Spiedes testi tika veikti pie 8 N aksiālā spēka (aksiālais spēks > dinamiskais spēks = 30 %), ar 30 μm aksiālo pārvietojumu frekvenču diapazonā no 0,01 Hz līdz 16 Hz. Tika monitorēts kompresijas krājuma modulis (E') un kompresijas zuduma modulis (E''). (D) Sr-HAp/ε-PL/HA hidrogelu enzīmatiskās degradācijas līknes hialuronidāzi saturošā PBS vidē 20 nedēļu periodā. (E) Sr^{2+} jonu izdalīšanās pētījumi. (F) Ca^{2+} jonu izdalīšanās pētījumi. (E–F) Sr-HAp/ε-PL/HA hidrogelu jonu izdalīšanās pētījumi veikti 90 dienu periodā, rezultāti attēloti μM koncentrācijā. Katrā eksperimentā tika veikti trīs atkārtējumi, un rezultāti attēloti kā vidējā vērtība ± SD.



10. att. Sagatavoto Sr-HAp/ε-PL/HA hidrogelu antibakteriālā aktivitāte (24–168 h) pret *E. coli*, *S. aureus*, *ESBL E. coli* un MRSA baktēriju celmiem ($n = 3$) [72].

Kā jau iepriekš tika pieņemts, iespējams, šo rezultātu var skaidrot ar gramnegatīvo baktēriju unikālo šūnu sienīņu struktūru un efektīvāku efluksa sūkņu sistēmām. Treškārt, tika skaidri novērots, ka 0 % Sr-HAp hidrogela kompozīcija vairākos laika punktos (*E. coli*: 24 h; MRSA: 72 h) uzrāda salīdzinoši augstāku inhibīcijas līmeni un dažos gadījumos ir vienīgā, kas uzrāda statistiski nozīmīgu inhibīciju (*E. coli*: 48 h un 72 h; *ESBL E. coli*: 48 h un 72 h). Šādus rezultātus varētu izskaidrot ar Sr-HAp neorganiskās fāzes klātbūtni hidrogela matricā 40 %, 50 % un 60 % Sr-HAp hidrogelu kompozīcijās. Funkcionalizācija ar Sr-HAp nanodaļiņām palielina fizikālo saišu skaitu starp ε-PL/HA hidrogela matricu un pozitīvi lādētajiem $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ joniem, veidojot fizisku barjeru un veicinot tīkla pārkārtošanos kompaktākā konfigurācijā. Tas negatīvi ietekmē antibakteriālo ε-PL molekulu atbrīvošanās kinētiku un samazina hidrogelu antibakteriālo potenciālu [75]. Visbeidzot, starp 40 %, 50 % un 60 % Sr-HAp hidrogeliem nevienā no pārbaudītajiem laika punktiem netika novērotas statistiski nozīmīgas atšķirības ($p > 0,05$), kas liecina, ka Sr-HAp klātbūtne būtiski neietekmē izstrādāto Sr-HAp/ε-PL/HA hidrogelu antibakteriālo aktivitāti.

SECINĀJUMI

1. Izstrādāta reproducējama sintēzes metodoloģija ķīmiski šķērssaistītu, injicējamu ϵ -PL/HA hidrogeļu iegūšanai, izmantojot EDC/NHS (0,24:0,24 mol) ķīmiju, ar ϵ -PL un HA masas attiecību 40 : 60, 50 : 50, 60 : 40, 70 : 30 un 80 : 20 masas%,
2. Izstrādātie ϵ -PL/HA hidrogeļi uzrādīja īpašības, kas ir nozīmīgas antibakteriāliem lietojumiem audu inženierijā, tostarp: regulējams brīvo ϵ -grupu saturs (mainot ϵ -PL masas attiecību); stabila gela frakcija (50–60 %); (c) mehāniskā stingrība 5–15 kPa diapazonā, gluda virsmas topoloģija; injicējamība caur 19 G adatu; augsta atjaunošanās spēja pēc injekcijas (85–95 %) un autoklāvējamība 121 °C / 20 min. Šīs īpašības nodrošina ϵ -PL devas atkarīgu antibakteriālo aktivitāti, uzrādot 2–3 Log₁₀ *E. coli* MSCL 332 samazinājumu jau pēc 1 h kontakta.
3. Tvaika sterilizācija (121 °C, 20 min) būtiski neietekmēja gela frakciju ($p > 0,05$), poru izmēru sadalījumu (66–200 μ m); uzbriešanu (150–300 % pēc 2 h, līdzsvars pēc 4 h) un mehānisko stingrību, vienlaikus saglabājot antibakteriālo aktivitāti ar 4–9 Log₁₀ baktēriju samazinājumu pēc sterilizācijas.
4. ϵ -PL/HA hidrogeļi uzrādīja ϵ -PL devas atkarīgu antibakteriālo aktivitāti gan īstermiņā (līdz 24 h), gan ilgtermiņā (līdz 168 h), tiešā un netiešā kontaktā pret *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, kā arī klīniski nozīmīgiem multirezistentiem celmiem – MRSA, ESBL *E. coli*. Viena mēneša laikā (10 uzsējumi) references un multirezistentajos celmos netika novērota rezistences attīstība pret ϵ -PL.
5. Citotoksicitātes testi parādīja 70–90 % šūnu dzīvotspēju ϵ -PL/HA hidrogeļos ar peļu fibroblastu šūnu līniju Balb/c 3T3, savukārt tīra ϵ -PL IC₅₀ tika noteikts ar vērtību 4,21 mg/mL. Netiešie ekstraktu citotoksicitātes testi ar cilvēka ādas fibroblastiem (HDF) apstiprināja necitotoksisku iedarbību koncentrācijās $\leq 4,35$ mg/mL, kas atbilst ϵ -PL devas atkarīgai izstrādāto hidrogeļu bioloģiskai saderībai.
6. Sr-HAp/ ϵ -PL/HA hidrogeļi tika veiksmīgi izstrādāti un demonstrēja sinerģisku efektu starp ϵ -PL/HA hidrogeļiem un Sr-HAp nanodaļiņām, nodrošinot ilgstošu Sr²⁺ (20–30 μ M) un Ca²⁺ (200–350 μ M) jonu izdalīšanos 90 dienu laikā, saglabātu injicējamību un regulējamu enzimatisko degradāciju atkarībā no Sr-HAp satura (pilnīga degradācija 5–20 nedēļās). Kompozīthidrogeļi uzrādīja ātru antibakteriālo iedarbību (pēc 24 h) gan pret references, gan multirezistentiem baktēriju celmiem, kā arī ilgstošu antibakteriālo aktivitāti (līdz 168 h), īpaši pret *S. aureus* un klīniski izolēto multirezistentu MRSA.

ATSAUCES

- [1] 7.7 million people die from bacterial infections every year – 2022 – ReAct. <https://www.reactgroup.org/news-and-views/news-and-opinions/year-2022/7-7-million-people-die-from-bacterial-infections-every-year/> (accessed 2025-02-19).
- [2] Scegllov, A.; Skadins, I.; Siverino, C.; Pirsko, V.; Scegllova, M.; Moriarty, F. T.; Kroica, J.; Salma-Ancane, K. Injectable ϵ -Polylysine/Hyaluronic Acid Hydrogels with Resistance-Preventing Antibacterial Activity for Treating Wound Infections. *ACS Appl. Bio Mater.*, **2025**, 8 (11), 9916–9930. <https://doi.org/10.1021/acsabm.5c01252>.
- [3] Bilal, M.; Iqbal, H. M. N. Naturally-Derived Biopolymers: Potential Platforms for Enzyme Immobilization. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, 130, 462–482. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.02.152>.
- [4] Scegllov, A.; Skadins, I.; Chitto, M.; Kroica, J.; Salma-Ancane, K. Failure or Future? Exploring Alternative Antibacterials: A Comparative Analysis of Antibiotics and Naturally Derived Biopolymers. *Front. Microbiol.* **2025**, 16, 1526250. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2025.1526250>.
- [5] Sun, Y.; Bai, Y.; Yang, W.; Bu, K.; Tanveer, S. K.; Hai, J. Global Trends in Natural Biopolymers in the 21st Century: A Scientometric Review. *Front. Chem.* **2022**, 10, 915648. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2022.915648>.
- [6] Pahlevanzadeh, F.; Setayeshmehr, M.; Bakhsheshi-Rad, H. R.; Emadi, R.; Kharaziha, M.; Poursamar, S. A.; Ismail, A. F.; Sharif, S.; Chen, X.; Berto, F. A Review on Antibacterial Biomaterials in Biomedical Applications: From Materials Perspective to Bioinks Design. *Polym.* **2022**, 14 (11), 2238. <https://doi.org/10.3390/POLYM14112238>.
- [7] Sam, S.; Joseph, B.; Thomas, S. Exploring the Antimicrobial Features of Biomaterials for Biomedical Applications. *Results Eng.* **2023**, 17, 100979. <https://doi.org/10.1016/J.RINENG.2023.100979>.
- [8] Coma, V. Polysaccharide-Based Biomaterials with Antimicrobial and Antioxidant Properties. *Polimeros* **2013**, 23 (3), 287–297. <https://doi.org/10.4322/POLIMEROS020OV002>.
- [9] Khara, J. S.; Mojsoska, B.; Mukherjee, D.; Langford, P. R.; Robertson, B. D.; Jenssen, H.; Ee, P. L. R.; Newton, S. M. Ultra-Short Antimicrobial Peptoids Show Propensity for Membrane Activity Against Multi-Drug Resistant Mycobacterium Tuberculosis. *Front. Microbiol.* **2020**, 11, 515317. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00417>.
- [10] Jacobo-Delgado, Y. M.; Rodríguez-Carlos, A.; Serrano, C. J.; Rivas-Santiago, B. Mycobacterium Tuberculosis Cell-Wall and Antimicrobial Peptides: A Mission Impossible? *Front. Immunol.* **2023**, 14, 1194923.

- <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1194923>.
- [11] Intorasoot, S.; Intorasoot, A.; Tawteamwong, A.; Butr-Indr, B.; Phunpae, P.; Tharinjaroen, C. S.; Wattananandkul, U.; Sangboonruang, S.; Khantipongse, J. In Vitro Antimycobacterial Activity of Human Lactoferrin-Derived Peptide, D-HLF 1-11, against Susceptible and Drug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis and Its Synergistic Effect with Rifampicin. *Antibiot.* **2022**, *11* (12), 1785. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11121785>.
 - [12] C Reygaert, W. An Overview of the Antimicrobial Resistance Mechanisms of Bacteria. *AIMS Microbiol.* **2018**, *4* (3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2018.3.482>.
 - [13] Sceglövs, A.; Wychowaniec, J. K.; Skadins, I.; Reinis, A.; Edwards-Gayle, C. J. C.; D’Este, M.; Salma-Ancane, K. Effect of Steam Sterilisation on Physico-Chemical Properties of Antibacterial Covalently Cross-Linked ϵ -Polylysine/Hyaluronic Acid Hydrogels. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* **2023**, *6*, 100363. <https://doi.org/10.1016/J.CARPTA.2023.100363>.
 - [14] Harvey, N.; Dennison, E.; Cooper, C. Osteoporosis: Impact on Health and Economics. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2010**, *62* (2), 99–105. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2009.260>.
 - [15] Sozen, T.; Ozisik, L.; Calik Basaran, N. An Overview and Management of Osteoporosis. *Eur. J. Rheumatol.* **2017**, *4* (1), 46–56. <https://doi.org/10.5152/EURJRHEUM.2016.048>.
 - [16] Hou, X.; Zhang, L.; Zhou, Z.; Luo, X.; Wang, T.; Zhao, X.; Lu, B.; Chen, F.; Zheng, L. Calcium Phosphate-Based Biomaterials for Bone Repair. *J. Funct. Biomater.* **2022**, *Vol. 13, Page 187* **2022**, *13* (4), 187. <https://doi.org/10.3390/JFB13040187>.
 - [17] Tozzi, G.; De Mori, A.; Oliveira, A.; Roldo, M. Composite Hydrogels for Bone Regeneration. *Mater.* **2016**, *9* (4), 267. <https://doi.org/10.3390/MA9040267>.
 - [18] Zhang, Y.; Shu, T.; Wang, S.; Liu, Z.; Cheng, Y.; Li, A.; Pei, D. The Osteoinductivity of Calcium Phosphate-Based Biomaterials: A Tight Interaction With Bone Healing. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 911180. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2022.911180>.
 - [19] Inzana, J. A.; Schwarz, E. M.; Kates, S. L.; Awad, H. A. Biomaterials Approaches to Treating Implant-Associated Osteomyelitis. *Biomaterials* **2016**, *81*, 58–71. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2015.12.012>.
 - [20] van Vugt, T. A. G.; Arts, J. J.; Geurts, J. A. P. Antibiotic-Loaded Polymethylmethacrylate Beads and Spacers in Treatment of Orthopedic Infections and the Role of Biofilm Formation. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01626>.

- [21] Freischmidt, H.; Armbruster, J.; Reiter, G.; Grützner, P. A.; Helbig, L.; Guehring, T. Individualized Techniques of Implant Coating with an Antibiotic-Loaded, Hydroxyapatite/Calcium Sulphate Bone Graft Substitute. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2020**, *16*, 689–694. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S242088>.
- [22] Dovedytis, M.; Liu, Z. J.; Bartlett, S. Hyaluronic Acid and Its Biomedical Applications: A Review. *Eng. Regen.* **2020**, *1*, 102–113. <https://doi.org/10.1016/J.ENGREG.2020.10.001>.
- [23] Wang, M.; Deng, Z.; Guo, Y.; Xu, P. Designing Functional Hyaluronic Acid-Based Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Mater. Today Bio* **2022**, *17*, 100495. <https://doi.org/10.1016/J.MTBIO.2022.100495>.
- [24] Salma-Ancane, K.; Sceglavs, A.; Tracuma, E.; Wychowanec, J. K.; Aunina, K.; Ramata-Stunda, A.; Nikolajeva, V.; Loca, D. Effect of Crosslinking Strategy on the Biological, Antibacterial and Physicochemical Performance of Hyaluronic Acid and ϵ -Polylysine Based Hydrogels. *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *208*, 995–1008. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.03.207>.
- [25] Sionkowska, A.; Kulka-Kamińska, K.; Brudzyńska, P.; Lewandowska, K.; Piwowski, Ł. The Influence of Various Crosslinking Conditions of EDC/NHS on the Properties of Fish Collagen Film. *Mar. Drugs* **2024**, *22* (5), 194. <https://doi.org/10.3390/MD22050194>.
- [26] Munir, M. U.; Salman, S.; Javed, I.; Bukhari, S. N. A.; Ahmad, N.; Shad, N. A.; Aziz, F. Nano-Hydroxyapatite as a Delivery System: Overview and Advancements. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* **2021**, *49* (1), 717–727. <https://doi.org/10.1080/21691401.2021.2016785>.
- [27] Lee, N. H.; Kang, M. S.; Kim, T. H.; Yoon, D. S.; Mandakhbayar, N.; Jo, S. Bin; Kim, H. S.; Knowles, J. C.; Lee, J. H.; Kim, H. W. Dual Actions of Osteoclastic-Inhibition and Osteogenic-Stimulation through Strontium-Releasing Bioactive Nanoscale Cement Imply Biomaterial-Enabled Osteoporosis Therapy. *Biomaterials* **2021**, *276*, 121025. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2021.121025>.
- [28] Pan, H. B.; Li, Z. Y.; Lam, W. M.; Wong, J. C.; Darvell, B. W.; Luk, K. D. K.; Lu, W. W. Solubility of Strontium-Substituted Apatite by Solid Titration. *Acta Biomater.* **2009**, *5* (5), 1678–1685. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2008.11.032>.
- [29] Stipnice, L.; Wilson, S.; Curran, J. M.; Chen, R.; Salma-Ancane, K.; Sharma, P. K.; Meenan, B. J.; Boyd, A. R. Strontium Substituted Hydroxyapatite Promotes Direct Primary Human Osteoblast Maturation. *Ceram. Int.* **2021**, *47* (3), 3368–3379. <https://doi.org/10.1016/J.CERAMINT.2020.09.182>.
- [30] Stipnice, L.; Ramata-Stunda, A.; Vecstaudza, J.; Kreicberga, I.; Livkisa, D.; Rubina,

- A.; Scegllov, A.; Salma-Ancane, K. A Comparative Study on Physicochemical Properties and In Vitro Biocompatibility of Sr-Substituted and Sr Ranelate-Loaded Hydroxyapatite Nanoparticles. *ACS Appl. Bio Mater.* **2023**, *6* (12), 5264–5281. <https://doi.org/10.1021/ACSABM.3C00539>.
- [31] Kołodziejaska, B.; Stępień, N.; Kolmas, J. The Influence of Strontium on Bone Tissue Metabolism and Its Application in Osteoporosis Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (12), 6564. <https://doi.org/10.3390/IJMS22126564>.
- [32] Rocha Scardueli, C.; Bizelli-Silveira, C.; Adriana Marcantonio, R. C.; Marcantonio Jr, E.; Stavropoulos, A.; Spin-Neto, R. Systemic Administration of Strontium Ranelate to Enhance the Osseointegration of Implants: Systematic Review of Animal Studies. *Int. J. Implant Dent.* **2018**, *4* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S40729-018-0132-8>.
- [33] Akram, F.; Imtiaz, M.; Haq, I. ul. Emergent Crisis of Antibiotic Resistance: A Silent Pandemic Threat to 21st Century. *Microb. Pathog.* **2023**, *174*, 105923. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2022.105923>.
- [34] *New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis.* <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis> (accessed 2024-04-02).
- [35] Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M. Polymeric Materials with Antimicrobial Activity. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37* (2), 281–339. <https://doi.org/10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2011.08.005>.
- [36] Santos, M. R. E.; Fonseca, A. C.; Mendonça, P. V.; Branco, R.; Serra, A. C.; Morais, P. V.; Coelho, J. F. J. Recent Developments in Antimicrobial Polymers: A Review. *Mater.* **2016**, *9* (7), 599. <https://doi.org/10.3390/MA9070599>.
- [37] Haktaniyan, M.; Bradley, M. Polymers Showing Intrinsic Antimicrobial Activity. *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51* (20), 8584–8611. <https://doi.org/10.1039/D2CS00558A>.
- [38] Smola-Dmochowska, A.; Lewicka, K.; Macyk, A.; Rychter, P.; Pamuła, E.; Dobrzyński, P. Biodegradable Polymers and Polymer Composites with Antibacterial Properties. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (8), 7473. <https://doi.org/10.3390/IJMS24087473>.
- [39] Mishra, R.; Panda, A. K.; De Mandal, S.; Shakeel, M.; Bisht, S. S.; Khan, J. Natural Anti-Biofilm Agents: Strategies to Control Biofilm-Forming Pathogens. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 566325. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.566325>.
- [40] Melander, R. J.; Basak, A. K.; Melander, C. Natural Products as Inspiration for the Development of Bacterial Antibiofilm Agents. *Nat. Prod. Rep.* **2020**, *37* (11), 1454–1477. <https://doi.org/10.1039/D0NP00022A>.
- [41] Munita, J. M.; Arias, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4* (2). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.VMBF-0016-2015>.

- [42] Peterson, E.; Kaur, P. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Front. Microbiol.* **2018**, *9* (NOV), 426686. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02928>.
- [43] Abushaheen, M. A.; Muzahed; Fatani, A. J.; Alosaimi, M.; Mansy, W.; George, M.; Acharya, S.; Rathod, S.; Divakar, D. D.; Jhugroo, C.; Vellappally, S.; Khan, A. A.; Shaik, J.; Jhugroo, P. Antimicrobial Resistance, Mechanisms and Its Clinical Significance. *Dis. Mon.* **2020**, *66* (6). <https://doi.org/10.1016/J.DISAMONTH.2020.100971>.
- [44] Chamidah, A.; Hardoko; Prihanto, A. A. Antibacterial Activities of β -Glucan (Laminaran) against Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *AIP Conf. Proc.* **2017**, *1844* (1), 20011. <https://doi.org/10.1063/1.4983422/748336>.
- [45] Hyldgaard, M.; Mygind, T.; Vad, B. S.; Stenvang, M.; Otzen, D. E.; Meyer, R. L. The Antimicrobial Mechanism of Action of Epsilon-Poly-L-Lysine. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80* (24), 7758–7770. <https://doi.org/10.1128/AEM.02204-14>.
- [46] Jenssen, H.; Hancock, R. E. W. Antimicrobial Properties of Lactoferrin. *Biochimie* **2009**, *91* (1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2008.05.015>.
- [47] Vedadghavami, A.; Minooei, F.; Mohammadi, M. H.; Khetani, S.; Rezaei Kolahchi, A.; Mashayekhan, S.; Sanati-Nezhad, A. Manufacturing of Hydrogel Biomaterials with Controlled Mechanical Properties for Tissue Engineering Applications. *Acta Biomater.* **2017**, *62*, 42–63. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2017.07.028>.
- [48] Bai, X.; Gao, M.; Syed, S.; Zhuang, J.; Xu, X.; Zhang, X. Q. Bioactive Hydrogels for Bone Regeneration. *Bioact. Mater.* **2018**, *3* (4), 401–417. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2018.05.006>.
- [49] Moreira, C. D. F.; Carvalho, S. M.; Florentino, R. M.; França, A.; Okano, B. S.; Rezende, C. M. F.; Mansur, H. S.; Pereira, M. M. Injectable Chitosan/Gelatin/Bioactive Glass Nanocomposite Hydrogels for Potential Bone Regeneration: In Vitro and in Vivo Analyses. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *132*, 811–821. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.03.237>.
- [50] Cross, E. R.; Coulter, S. M.; Pentlavalli, S.; Lavery, G. Unravelling the Antimicrobial Activity of Peptide Hydrogel Systems: Current and Future Perspectives. *Soft Matter* **2021**, *17* (35), 8001–8021. <https://doi.org/10.1039/D1SM00839K>.
- [51] Qu, H.; Yao, Q.; Chen, T.; Wu, H.; Liu, Y.; Wang, C.; Dong, A. Current Status of Development and Biomedical Applications of Peptide-Based Antimicrobial Hydrogels. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2024**, *325*, 103099. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2024.103099>.
- [52] Wang, R.; Xu, D.; Liang, L.; Xu, T.; Liu, W.; Ouyang, P.; Chi, B.; Xu, H. Enzymatically

- Crosslinked Epsilon-Poly-L-Lysine Hydrogels with Inherent Antibacterial Properties for Wound Infection Prevention. *RSC Adv.* **2016**, *6* (11), 8620–8627. <https://doi.org/10.1039/C5RA15616E>.
- [53] Zou, Y. J.; He, S. S.; Du, J. Z. ϵ -Poly(L-Lysine)-Based Hydrogels with Fast-Acting and Prolonged Antibacterial Activities. *Chinese J. Polym. Sci. (English Ed.)* **2018**, *36* (11), 1239–1250. <https://doi.org/10.1007/S10118-018-2156-1>.
- [54] Kennedy, S. M.; Deshpande, P.; Gallagher, A. G.; Horsburgh, M. J.; Allison, H. E.; Kaye, S. B.; Wellings, D. A.; Williams, R. L. Antimicrobial Activity of Poly-Epsilon-Lysine Peptide Hydrogels Against *Pseudomonas Aeruginosa*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2020**, *61* (10), 18–18. <https://doi.org/10.1167/IOVS.61.10.18>.
- [55] Wang, L.; Zhang, C.; Zhang, J.; Rao, Z.; Xu, X.; Mao, Z.; Chen, X. Epsilon-Poly-L-Lysine: Recent Advances in Biomanufacturing and Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 895. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.748976>.
- [56] Tan, Z.; Shi, Y.; Xing, B.; Hou, Y.; Cui, J.; Jia, S. The Antimicrobial Effects and Mechanism of ϵ -Poly-Lysine against *Staphylococcus Aureus*. *Bioresour. Bioprocess.* **2019**, *6* (1). <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0246-8>.
- [57] Li, Y.; Wang, Y.; Li, J. Antibacterial Activity of Polyvinyl Alcohol (PVA)/ ϵ -Polylysine Packaging Films and the Effect on Longan Fruit. *Food Sci. Technol.* **2020**, *40* (4), 838–843. <https://doi.org/10.1590/FST.19919>.
- [58] Amorim, S.; Reis, C. A.; Reis, R. L.; Pires, R. A. Extracellular Matrix Mimics Using Hyaluronan-Based Biomaterials. *Trends Biotechnol.* **2021**, *39* (1), 90–104. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2020.06.003>.
- [59] Harrer, D.; Sanchez Armengol, E.; Friedl, J. D.; Jalil, A.; Jelkmann, M.; Lechner, C.; Laffleur, F. Is Hyaluronic Acid the Perfect Excipient for the Pharmaceutical Need? *Int. J. Pharm.* **2021**, *601*, 120589. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2021.120589>.
- [60] Guo, W.; Douma, L.; Hu, M. H.; Eglin, D.; Alini, M.; Šćerović, A.; Grad, S.; Peng, X.; Zou, X.; D'Este, M.; Peroglio, M. Hyaluronic Acid-Based Interpenetrating Network Hydrogel as a Cell Carrier for Nucleus Pulposus Repair. *Carbohydr. Polym.* **2022**, *277*, 118828. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2021.118828>.
- [61] Hu, W.; Wang, Z.; Xiao, Y.; Zhang, S.; Wang, J. Advances in Crosslinking Strategies of Biomedical Hydrogels. *Biomater. Sci.* **2019**, *7* (3), 843–855. <https://doi.org/10.1039/c8bm01246f>.
- [62] Cui, H.; Zhuang, X.; He, C.; Wei, Y.; Chen, X. High Performance and Reversible Ionic Polypeptide Hydrogel Based on Charge-Driven Assembly for Biomedical Applications. *Acta Biomater.* **2015**, *11* (1), 183–190. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2014.09.017>.
- [63] Xue, X.; Hu, Y.; Wang, S.; Chen, X.; Jiang, Y.; Su, J. Fabrication of Physical and

- Chemical Crosslinked Hydrogels for Bone Tissue Engineering. *Bioact. Mater.* **2022**, *12*, 327–339. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2021.10.029>.
- [64] Hua, J.; Li, Z.; Xia, W.; Yang, N.; Gong, J.; Zhang, J.; Qiao, C. *Preparation and Properties of EDC/NHS Mediated Crosslinking Poly (Gamma-Glutamic Acid)/Epsilon-Polylysine Hydrogels*; Elsevier B.V., 2016; Vol. 61. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.001>.
- [65] Porod, G. *General Theory – Small Angle X-Ray Scattering*; Glatter, O. K. O., Ed.; Academic Press: London, 1982.
- [66] *M07 Ed12 | Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 12th Edition*. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07/> (accessed 2025-02-19).
- [67] *ISO 10993-5:2009 – Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. <https://www.iso.org/standard/36406.html> (accessed 2025-02-27).
- [68] Burguera, E. F.; Xu, H. H. K.; Sun, L. Injectable Calcium Phosphate Cement: Effects of Powder-to-Liquid Ratio and Needle Size. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2008**, *84B* (2), 493–502. <https://doi.org/10.1002/JBM.B.30896>.
- [69] Jacquart, S.; Girod-Fullana, S.; Brouillet, F.; Pigasse, C.; Siadous, R.; Fatnassi, M.; Grimoud, J.; Rey, C.; Roques, C.; Combes, C. Injectable Bone Cement Containing Carboxymethyl Cellulose Microparticles as a Silver Delivery System Able to Reduce Implant-Associated Infection Risk. *Acta Biomater.* **2022**, *145*, 342–357. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2022.04.015>.
- [70] Baniasadi, M.; Minary-Jolandan, M.; Editor, A.; Zadpoor, A. A. Alginate-Collagen Fibril Composite Hydrogel. *Mater.* **2015**, *8* (2), 799–814. <https://doi.org/10.3390/MA8020799>.
- [71] Liu, L.; Cooke, P. H.; Coffin, D. R.; Fishman, M. L.; Hicks, K. B. Pectin and Polyacrylamide Composite Hydrogels: Effect of Pectin on Structural and Dynamic Mechanical Properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *92* (3), 1893–1901. <https://doi.org/10.1002/APP.20174>.
- [72] Rubina, A.; Scegllov, A.; Ramata-Stunda, A.; Pugajeva, I.; Skadins, I.; Boyd, A. R.; Tumilovica, A.; Stipniece, L.; Salma-Ancane, K. Injectable Mineralized Sr-Hydroxyapatite Nanoparticles-Loaded ϵ -Polylysine-Hyaluronic Acid Composite Hydrogels for Bone Regeneration. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *280*, 135703. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2024.135703>.
- [73] Karvinen, J.; Kellomäki, M. Characterization of Self-Healing Hydrogels for Biomedical Applications. *Eur. Polym. J.* **2022**, *181*, 111641.

<https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2022.111641>.

- [74] Murugesan, V.; Vaiyapuri, M.; Murugesan, A. Fabrication and Characterization of Strontium Substituted Chitosan Modify Hydroxyapatite for Biomedical Applications. *Inorg. Chem. Commun.* **2022**, *142*, 109653. <https://doi.org/10.1016/J.INOCHE.2022.109653>.



Artemijs Ščeglovs dzimis 1996. gadā Rīgā. Rīgas Tehniskajā universitātē (RTU) ieguvis bakalaura grādu ķīmijā (2019), Rīgas Stradiņa universitātē – maģistra grādu biomedicinā (2021). Patlaban ir RTU pētnieks. Iesaistījies nacionālo un starptautisko projektu īstenošanā, kuru ietvaros piedalās starptautiskās konferencēs Eiropā, pilnveidojot profesionālo pieredzi apmācībās un mobilitātes braucienos. Zinātniskās intereses saistītas ar biomateriālu izstrādi, fokusējoties uz antibakteriālo aktivitāti pret dažādām slimību izraisošām, tostarp antibiotiku rezistentām, baktērijām.