

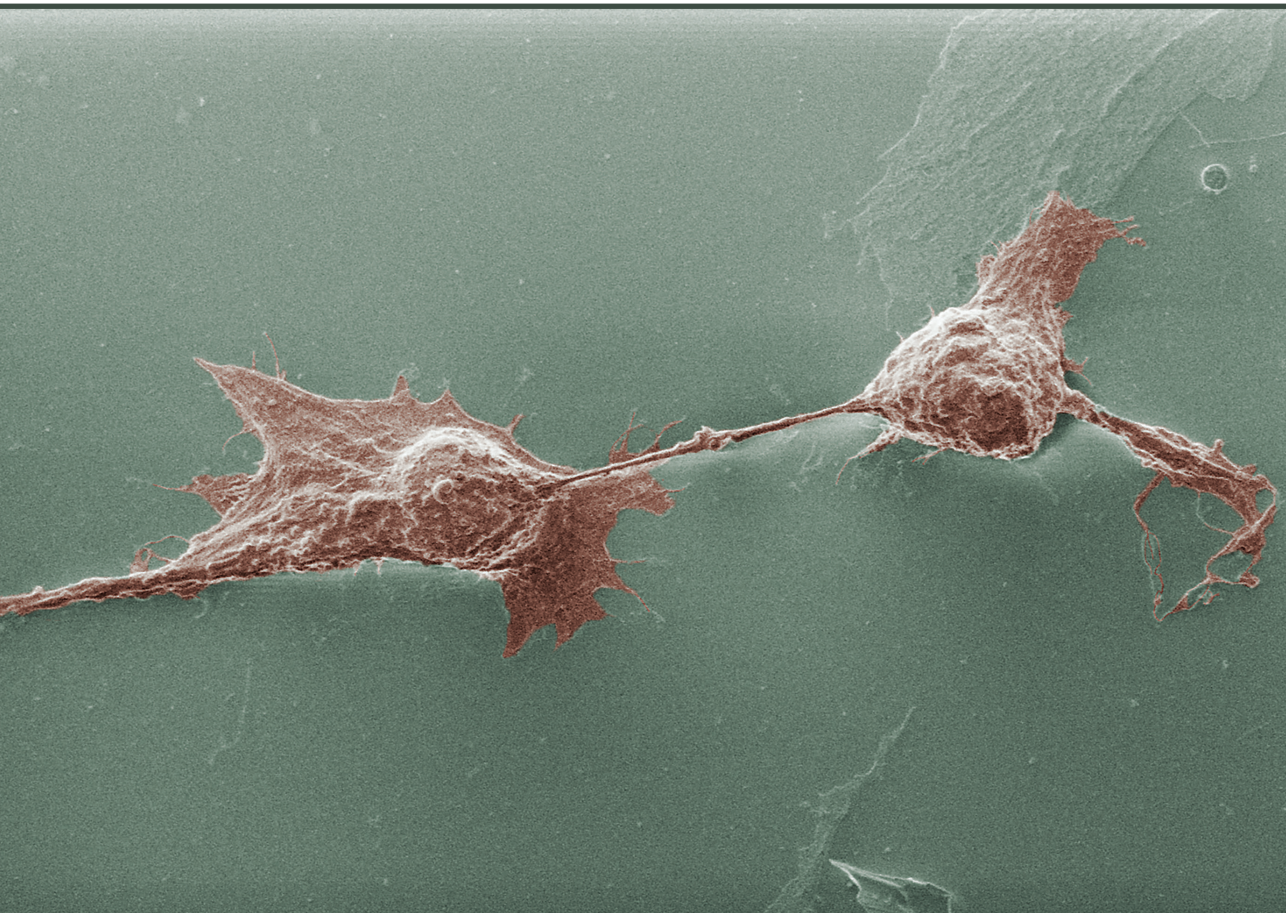


RĪGAS TEHNISKĀ
UNIVERSITĀTE

Jingzhi Fan

METABOLĪTU IZMANTOŠANA BIOMATERIĀLOS KAULAUDU REĢENERĀCIJAI

Promocijas darba kopsavilkums



RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE

Dabaszinātņu un tehnoloģiju fakultāte
Biomateriālu un bioinženierijas institūts

Jingzhi Fan

Doktora studiju programmas “Ķīmija, materiālzinātne un tehnoloģijas” doktorants

METABOLĪTU IZMANTOŠANA BIOMATERIĀLOS KAULAUDU REGENERĀCIJAI

Promocijas darba kopsavilkums

Zinātniskie vadītāji
profesore *Dr. sc. ing.*
DAGNIJA LOČA

asociētais profesors *Dr. nat. techn.*
KRISTAPS KĻAVIŅŠ

RTU Izdevniecība
Rīga 2025

Fan, J. Metabolītu izmantošana biomateriālos kaulaudu reģenerācijai. Promocijas darba kopsavilkums. Rīga: RTU Izdevniecība, 2025. 28 lpp.

Publicēts saskaņā ar promocijas padomes "RTU P-02" 2025. gada 29. septembra lēmumu Nr. 04030- 9.2/7.

Pateicības

Pateicos Kristapam Kļaviņam par atbalstu mana promocijas darba izstrādē!

Pateicos Antonam Sizovam un *Sophie Verrier* par palīdzību dzīvnieku pētījuma datu iegūšanā!

Pateicos *Abhishek Indurkar* par palīdzību materiālu sintēzēs!

Pateicos Ilījanai Kovrlījai, Kristapam Rubenim, *Theresa Schiemer*, *Oznur Demir* un citiem, kas palīdzējuši šī pētījuma tapšanā!

Promocijas darbs izstrādāts Eiropas Savienības projektā "Apvārsnis 2020" "Baltijas Biomateriālu ekselences centrs" [Nr. 857287, BBCE].



Vāka attēla autors Jingzhi Fan.

<https://doi.org/10.7250/9789934372384>

ISBN 978-9934-37-238-4 (pdf)

PROMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS ZINĀTNES DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ

Promocijas darbs zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2025. gada 12. decembrī plkst. 14 Rīgas Tehniskās universitātes Dabaszinātņu un tehnoloģiju fakultātē, Paula Valdena ielā 3, 272 auditorijā.

OFICIĀLIE RECENZENTI

Profesors *Dr. chem.* Māris Turks,
Rīgas Tehniskā universitāte

Asociētais profesors *Dr. sc. ing.* Egils Stalidzāns,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Asociētais profesors *Dr. Gernot Schabbauer*,
Vīnes Medicīnas universitāte, Austrija

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.

Jingzhi Fan (paraksts)

Datums:

Promocijas darbā ir ievads un četras nodaļas. Darbā iekļauti 58 attēli, četras tabulas un viens pielikums. Darbā izmantoti 167 bibliogrāfiskie avoti. Kopējais darba apjoms ir 184 lappuses.

ANOTĀCIJA

Metabolismam jeb vielmaiņai ir būtiska loma kaulu homeostāzē, reģenerācijā un dzīšanas procesos. Promocijas darba gaitā tika pētīta biomateriālu spēja ietekmēt vielmaiņas procesus kaulu dzīšanas laikā kā klīniski nozīmīga biomateriālu izstrādes stratēģija. Šim nolūkam tika raksturotas vielmaiņas izmaiņas kaulu reģenerācijas laikā, lai iegūtos rezultātus tālāk izmantotu biomateriālu izstrādē. Tika veikta metabolītu profila analīze, izmantojot asins paraugus no žurku galvaskausa kritiska izmēra defektiem un aitu stilba kaula defektu modeļiem, lai labāk izprastu sistēmiskās vielmaiņas izmaiņas kaulu reģenerācijas gaitā. Rezultāti parādīja, ka kaulu dzīšanas laikā ievērojami samazinās glutamāta un glutamīna koncentrācija. Ņemot vērā to, ka uz kalcija fosfāta (CaP) bāzes veidoti biomateriāli tiek plaši izmantoti kā kaulaudu pildvielas audu inženierijā, tostarp kā mazmolekulāru savienojumu piegādes sistēmas, tika pētīta šo materiālu un šūnu mijiedarbība. Šim nolūkam tika izmantotas fibroblastu šūnu līnijas un dažādi kalcija fosfāta materiāli. Veiktie pētījumi parādīja, ka keramiskie biomateriāli spēj adsorbēt plašu mazmolekulāro savienojumu klāstu no mikrovides. Rezultāti apliecināja arī CaP saturošu materiālu ietekmi uz šūnu aminoskābju un enerģijas metabolismu. Balstoties rezultātos, kas iegūti, analizējot paraugus no kritiska izmēra defekta dzīvnieku modeļa, tika sintezēts amorfs kalcija fosfāts ar glutamātu (ACP-Glu). Šis materiāls tika raksturots, izmantojot osteoģenēzes un metabolisma pētījumus. Rezultāti apstiprināja ACP-Glu biomateriāla pozitīvo ietekmi uz šūnu enerģijas metabolismu un osteoģenēzes īpašībām. Izmainītais enerģijas metabolisms, īpaši trikarbonskābju cikls, spēja kompensēt anaerobās glikolīzes procesus un nodrošināt audu atjaunošanai nepieciešamo enerģiju. Šāda veida biomateriālus potenciāli varētu izmantot kaulu reģenerācijai pacientiem, lai nodrošinātu paātrinātu dzīšanas procesu un efektīvāku *in situ* enerģijas metabolismu.

Izstrādātais ACP-Glu materiāls potenciāli spēj aizstāt bioloģiski neaktīvās kaulaudu pildvielas un uzlabot kaulaudu reģenerācijas efektivitāti. Turklāt endogēno metabolītu izmantošana bioloģisku procesu modulēšanai ir klīniski drošāka, salīdzinot ar citām bioloģiski aktīvām piedevām, piemēram, citokīniem un augšanas faktoriem. Galvenais promocijas darba praktiskais rezultāts ir izstrādātais ACP-Glu biomateriāls, kas pacientiem ar kaulu defektiem var paātrināt cieto audu atjaunošanos, piegādājot trūkstošās uzturvielas. Darbā lietotā biomateriālu izstrādes un analīzes metodika var kalpot kā paraugs turpmākiem pētījumiem šajā jomā, īpaši metabolikas aspektā.

Saturs

| | |
|--|----|
| Darbā lietotie saīsinājumi | 6 |
| Mērķis un uzdevumi | 7 |
| Darba zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti | 8 |
| Darba praktiskā nozīme | 8 |
| Darba aprobācija un zinātniskās publikācijas (pirmais autors) | 9 |
| Ievads | 10 |
| Metaboliskās izmaiņas kaulu dzīšanas laikā dzīvnieku modeļos | 11 |
| Šūnu un materiāla mijiedarbības metabolikas pētījumi | 13 |
| Biomateriālu iedarbības laika un materiālu sastāva ietekme uz šūnu vielmaiņu | 15 |
| Amorfā kalcija fosfāta ar glutamātu izstrāde | 15 |
| ACP-Glu sintēze un pagatavošana | 15 |
| ACP-Glu raksturošana | 16 |
| Glutamāta izdalīšanās pētījumi no ACP-Glu paraugiem | 17 |
| ACP-Glu ietekmes uz šūnu metabolismu raksturošana | 18 |
| Metabolītu atšķirības starp ACP-Glu un kontroles paraugiem | 18 |
| Metabolītu atšķirības starp ACP-Glu un ACP | 19 |
| ACP-Glu ierosinātas <i>in vitro</i> osteogēnēzes pētījumi | 21 |
| Biosaderības testi | 21 |
| Kalcija un fosfāta jonu koncentrācijas mērījumi šūnu barotnē | 22 |
| Šūnu iekšējā kalcija un fosfāta jonu koncentrācija | 22 |
| Osteogēnēzes noteikšana | 23 |
| Mineralizācijas novērtēšana | 24 |
| Secinājumi | 26 |
| Literatūras avoti | 27 |
| Pateicības | 28 |

Darbā lietotie saīsinājumi

ACP – amorfais kalcija fosfāts

ACP-Glu – amorfais kalcija fosfāts ar glutamātu

ALP – sārmainā fosfatāze

ANOVA – dispersijas analīze

ATP – adenozīna trifosfāts

BCP – bifāziskais kalcija fosfāts

CaP – kalcija fosfāts

CCK-8 – šūnu skaitīšanas komplekts – 8

CNT – kontroles grupa

DMEM – Dulbecco modificētā *Eagle* barotne

F6P – fruktozes-6-fosfāts

FBP – fruktozes-1,6-bifosfāts

FBS – liellopu augļa serums

G6P – glikozes-6-fosfāts

GC – gāzu hromatogrāfija

Glu – glutamāts

H58 – kalcija fosfāts ar 58 % hidroksilapatīta un 42 % β -trikalcijs fosfāta

H95 – kalcija fosfāts ar 95 % hidroksilapatīta un 5 % β -trikalcijs fosfāta

HAP – hidroksiapatīts

HILIC – hidrofilo mijiedarbību šķīduma hromatogrāfija

HPLC – augstas izšķirtspējas šķīduma hromatogrāfija

HPMC – hidroksipropilmetilceluloze

ICDD – Starptautiskais difrakcijas datu centrs

LC – šķīduma hromatogrāfija

LDH – laktāta dehidrogenāze

MS – masas spektrometrija
MSCs – mezenhimālās cilmes šūnas
NMR – kodolmagnētiskā rezonanse
OCN – osteokalcīns
OCP – osteokalcīna fosfāts
OPN – osteopontīns
PBS – fosfāta buferšķīdums
PCA – galveno komponentu analīze
PFK-1 – fosfofruktokināze-1
PLGA – poli(pienskābes-glikolskābe)
RANKL – nukleārā kapa B faktora ligands
Runx2 – *runt* saistītais transkripcijas faktors – 2
SEM – skenējošais elektronu mikroskopija
TCA – trikarbonskābes cikls (citronskābes cikls)
XRD – rentgenstaru difrakcija
 β -TCP – β -trikalcija fosfāts

Mērķis un uzdevumi

Darba mērķis bija izstrādāt jaunu CaP biomateriālu ar iestrādātu metabolītu, kas veicinātu kaulu reģenerācijas procesu.

Lai sasniegtu darba mērķi, tika definēti vairāki galvenie uzdevumi.

1. Izmantojot *in vivo* modeļus, raksturot metabolisma izmaiņas kaulu reģenerācijas laikā, tostarp dinamiskās metabolītu koncentrāciju izmaiņas, kas saistītas ar kaulu dzīšanas procesu.
2. Raksturot biomateriālu un šūnu mijiedarbības rezultātā radītās šūnu metabolisma izmaiņas, izmantojot metabolisma analīzes metodes, lai noteiktu šo izmaiņu molekulāros mehānismus.
3. Identificēt un validēt metabolītus, kas ir būtiski iesaistīti kaulu dzīšanas procesā un ietekmē kaulu reģenerācijas efektivitāti.

4. Sintezēt jaunus biomateriālus ar iestrādātiem identificētajiem metabolītiem, sasaistot vielmaiņas pētījumu rezultātus ar biomateriālu dizainu.
5. Raksturot sintezēto biomateriālu fizikālās īpašības un veikt *in vitro* pētījumus, lai noteiktu to piemērotību klīniskam lietojumam un potenciālo ietekmi uz terapeitiskajiem rezultātiem.

Promocijas darbā aizstāvēšanai izvirzītās tēzes

1. Kaulu dzīšanas process izraisa sistēmiskas vielmaiņas izmaiņas, kas atspoguļojas būtiskās metabolītu koncentrāciju svārstībās un ir cieši saistītas ar audu reģenerācijas gaitu.
2. Uz kalcija fosfāta (CaP) bāzes veidoti biomateriāli ietekmē šūnu metabolismu, radot izmaiņas aminoskābju un enerģijas apmaiņā, tādējādi nosakot šūnu adaptācijas spēju jaunajā mikrovidē.
3. Metabolītu integrēšana biomateriālos var stimulēt kaulaudu veidošanos, nodrošinot nepieciešamās uzturvielas un enerģijas avotus šūnu funkciju un audu reģenerācijas procesa veicināšanai.

Darba zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti

1. Veicot metabolītu analīzi asins plazmas paraugos no žurku galvaskausa kritiskā izmēra defekta un aitas stilba kaula defekta modeļiem, tika iegūta padziļināta izpratne par sistēmiskām vielmaiņas izmaiņām kaulu dzīšanas procesā. Nozīmīgs atklājums bija būtisks glutamāta un glutamīna koncentrācijas samazinājums audu reģenerācijas gaitā.
2. Pirmo reizi tika pierādīta keramisko biomateriālu spēja adsorbēt plašu mazmolekulāro savienojumu spektru no šūnu mikrovides. Iegūtie rezultāti apliecināja kalcija fosfātu saturošu biomateriālu ietekmi uz šūnu aminoskābju un enerģijas metabolismu, parādot to nozīmi šūnu funkcionālās aktivitātes modulēšanā.
3. Balstoties kritiskā izmēra defekta dzīvnieku modeļu rezultātos, tika sintezēts jauns biomateriāls – amorfais kalcija fosfāts ar glutamātu (ACP-Glu). Materiāls tika raksturots, izmantojot osteoģenēzes un metaboloma pētījumu metodes, un tas uzrādīja būtiskus uzlabojumus šūnu enerģijas metabolismā un osteoģenēzes īpašībās. Īpaši nozīmīga bija trikarbonskābju cikla aktivācija, kas kompensēja anaerobās glikolīzes procesus un nodrošināja šūnām audu reģenerācijai nepieciešamo enerģiju. Šie rezultāti liecina, ka izstrādātais ACP-Glu biomateriāls potenciāli varētu tikt izmantots pacientiem kaulu reģenerācijai, nodrošinot ātrāku dzīšanas procesu un efektīvāku *in situ* enerģijas metabolismu.

Darba praktiskā nozīme

Darbā veikto metabolikas pētījumu rezultāti par sistēmiskām vielmaiņas izmaiņām kaulu reģenerācijas laikā sniedz nozīmīgu ieguldījumu biomedicīnas zinātnē, kalpojot par vērtīgu atsauci uztura, klīniskās medicīnas, rehabilitācijas un bioinženierijas nozarēs. Pierādījums, ka biomateriāli spēj adsorbēt mazmolekulāros savienojumus no apkārtējās vides, ir būtisks jaunu biomateriālu izstrādē, jo

tas atklāj svarīgu mehānismu, kas nosaka materiālu un metabolītu mijiedarbību. Pētījums demonstrē metabolikas kā pētniecības metodes potenciālu biomateriālu izvērtēšanā un lietojumā audu inženierijā. Izstrādātais ACP-Glu biomateriāls uzrādīja spēju stimulēt kaulu šūnu aktivitāti, regulējot enerģijas metabolismu, un varētu aizstāt mūsdienās plaši izmantotās bioloģiski neaktīvās kaulu pildvielas, nodrošinot efektīvāku kaulu reģenerācijas procesu. Turklāt endogēno metabolītu izmantošana bioloģisko procesu modulēšanā ir drošāka alternatīva, salīdzinot ar citām bioloģiski aktīvām piedevām, piemēram, citokīniem vai augšanas faktoriem. Galvenais promocijas darba praktiskais rezultāts ir jaunizveidotais ACP-Glu biomateriāls, kas pacientiem ar kaulu defektiem potenciāli var paātrināt kaulaudu atjaunošanos, nodrošinot lokālu dzišanas procesam nepieciešamo metabolītu piegādi.

Darba aprobācija un zinātniskās publikācijas (pirmais autors)

Publikācijas

1. Fan J, Jahed V, Klavins K. Metabolomics in bone research. *Metabolites*. 2021 Jul 1;11(7):434.
2. Fan J, Abedi-Dorcheh K, Sadat Vaziri A, Kazemi-Aghdam F, Rafieyan S, Sohrabinejad M, Ghorbani M, Rastegar Adib F, Ghasemi Z, Klavins K, Jahed V. A review of recent advances in natural polymer-based scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Polymers*. 2022 May 20;14(10):2097.
3. Fan J, Schiemer T, Vaska A, Jahed V, Klavins K. Cell via Cell Viability Assay Changes Cellular Metabolic Characteristics by Intervening with Glycolysis and Pentose Phosphate Pathway. *Chemical Research in Toxicology*. 2024 Jan 8;37(2):208–211.
4. Fan J, Schiemer T, Steinberga V, Vaska A, Metlova A, Sizovs A, Locs J, Klavins K. Exploring the Impact of Calcium Phosphate Biomaterials on Cellular Metabolism. *Heliyon*. 2024 Nov 30;10(22):e39753.

Konferences

1. Fan J., Indukar A., Vaska A., Golubeva D., Verrier S., Sizovs A., Locs J., Klavins K., *Metabolomics-Inspired Biomaterials: Amorphous Calcium Phosphate with Targeted Metabolic Enhancement for Bone Repair*, in: 21st Annual International Conference of the Metabolomics Society 2025.
2. Fan J., Indukar A., Vaska A., Golubeva D., Verrier S., Sizovs A., Locs J., Klavins K., *Metabolomics-Inspired Biomaterials: Amorphous Calcium Phosphate with Targeted Metabolic Enhancement for Bone Repair*, in: The Scandinavian Society for Biomaterials conference 2025.
3. Fan J., Indukar A., Vaska A., Golubeva D., Verrier S., Sizovs A., Locs J., Klavins K., *Development of Amorphous Calcium Phosphate with Incorporated Metabolites for Enhanced Bone Healing*, 12th World Biomaterials Congress 2024.

4. Jingzhi F., Jahed V., Kaufmane L. V., Vaska A., Sizovs A., Loca L., Sadovska L., Line A., Kristaps K., Unraveling the Molecular Mechanisms of Cytotoxicity Induced by Physically Crosslinked Hyaluronic Acid/Poly-L-Lysine Hydrogel, 12th World Biomaterials Congress 2024.
5. Jingzhi F., Jahed V., Kaufmane L.V., Klavins K., Exploring the mechanism of PLL/HA hydrogel cytotoxicity, Materials Science and Applied Chemistry 2023.
6. Fan J., Schiemer T., Vaska A., Klavins K., Influence of cell viability assay on cellular metabolisms, Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society EU chapter 2023.
7. Fan J., Schiemer T., Sizovs A., Locs J., Klavins K., Metabolomics investigation of biomaterial-cell interactions, in: The Scandinavian Society for Biomaterials conference 2022.
8. Fan J., Schiemer T., Sizovs A., Locs J., Klavins K., Calcium phosphate based biomaterials influence on cell metabolism, in: Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society EU chapter 2022.
9. Fan J., Schiemer T., Sizovs A., Locs J., Klavins K., Calcium Phosphates Based Biomaterial Influence on Cell Metabolism, in Nordic Metabolomics Conference 2022.

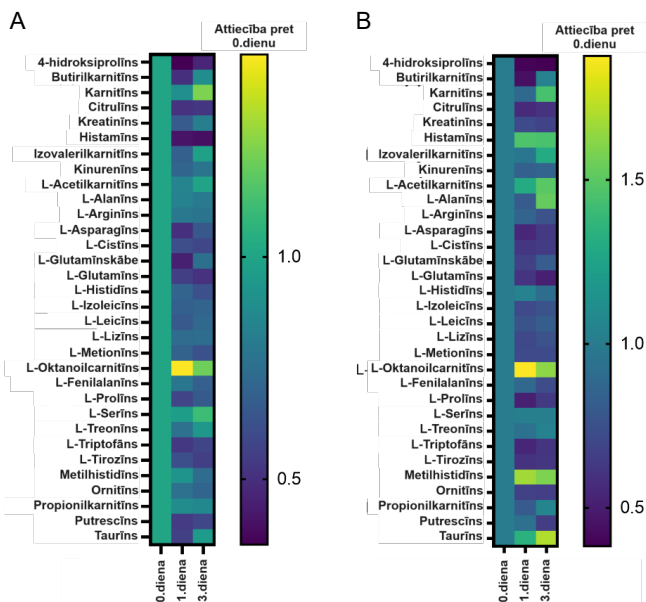
Ievads

2019. gadā pasaulē tika reģistrēti 178 miljoni jaunu kaulu lūzumu un 455 miljoni gadījumu ar akūtiem vai ilgtermiņa simptomiem, kas saistīti ar kaulu lūzumiem [1]. Efektīva pacientu ārstēšana un dzīves kvalitātes uzlabošana bieži prasa ķirurģisku iejaukšanos, kuras laikā tiek novērsti kaulu defekti. Mūsdienās kaulaudu inženierija strauji attīstās, balstoties inovatīvos biomateriālos, šūnu terapijā un audu reģenerācijas risinājumos. Kalcija fosfātam ir būtiska nozīme kaulaudu inženierijā, jo tas imitē dabīgā kaula minerālo sastāvu un veicina gan osteokondukciju, gan osteoindukciju [2]. Tā bioloģiskā saderība nodrošina integrāciju apkārtējos audos, sekmējot kaulaudu reģenerāciju un dzīšanas procesus. Kalcija fosfāta pamatnes plaši izmanto audu inženierijā, lai nodrošinātu mehānisko atbalstu, kā arī veicinātu šūnu piesaisti un proliferāciju efektīvai kaulu atjaunošanai [3]. Viens no jaunākajiem kalcija fosfāta apstrādes paņēmieniem ir aukstās saķepināšanas process, kas ļauj nodrošināt materiālu sablīvēšanu zemākās temperatūrās, parasti zem 300 °C, salīdzinot ar tradicionālajām saķepināšanas metodēm [4]. Šī metode nodrošina iespēju izveidot bioloģiski saderīgas kalcija fosfāta pamatnes un implantus ar uzlabotām mehāniskajām īpašībām, vienlaikus saglabājot materiāla ķīmiskās īpašības. Aukstā saķepināšana ir īpaši piemērota tādu biomateriālu izstrādei, kuru sastāvā ir bioloģiski aktīvas organiskas molekulas, jo tā samazina šo molekulu degradācijas risku un ļauj labāk kontrolēt implanta struktūru un īpašības. Kaulaudu homeostāze ir cieši saistīta ar vielmaiņas procesiem, un metabolītu analīze sniedz iespēju padziļināti pētīt kaulu atjaunošanos [5]. Metabolomika jau ir izmantota potenciālo biomarkieru identificēšanai kaulu traumā [6], osteoporozes [7] un osteosarkomas [8] diagnostikā un prognozēšanā. Raksturojot vielmaiņas izmaiņas kaulu reģenerācijas procesā, ir

iespējams izstrādāt efektīvākus, personalizētus un bioloģiskos procesus ietekmējošus audu inženierijas risinājumus. Šī klīniski nozīmīgā pieeja varētu uzlabot kaulaudu dzīšanas efektivitāti un samazināt komplikāciju risku klīniskajā praksē [9]. Šajā pētījumā metabolikas metodoloģija tika izmantota trīs veidos: cieto audu atjaunošanās procesu izpētei pēc kaula defekta *in vivo*; šūnu un biomateriālu mijiedarbības izpratnei molekulārā līmenī; jaunu biomateriālu izstrādei un raksturošanai.

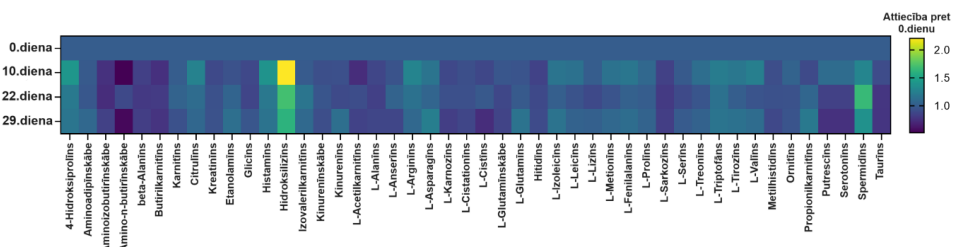
Metaboliskās izmaiņas kaulu dzīšanas laikā dzīvnieku modeļos

Pētījumā izmantots žurku galvaskausa kritiskā izmēra defekta modelis, lai novērtētu metabolisma izmaiņas kaulu dzīšanas laikā. Šis ir uzticams un atkārtojams modelis biomateriālu novērtēšanā, kurā netiek izmantota mehāniskā fiksācija. Pētījuma izstrādes gaitā, izmantojot trepanāciju, *Wistar* vīrišu dzimuma žurkām (8–12 nedēļas vecām) tika izveidots galvaskausa defekts 8 mm diametrā, kas atbilst kritiskā izmēra defektam. Vienā grupā ($n = 6$) defekts netika ārstēts (grupa “defekta vieta atstāta tukša”). Otrā grupā ($n = 5$) izņemtais galvaskausa fragments tika sadalīts četrās daļās un ievietots atpakaļ defekta vietā, lai veicinātu atveseļošanās (grupa “fragments ievietots atpakaļ”). Asins paraugi tika ievākti pirms operācijas, kā arī pirmajā un trešajā dienā pēc operācijas. Metabolītu ekstrakcija tika veikta, izmantojot metanolu, iekļaujot iekšējo standartu ar izotopiski iezīmētiem metabolītiem. Izmantojot *HILIC* šķidrums hromatogrāfiju un veicot mērķētu (*targeted*) kvantitatīvo metabolītu analīzi, tika iegūti rezultāti par 33 metabolītu koncentrācijām asins paraugos. Iegūtie metabolītu profili redzami 1. attēlā.



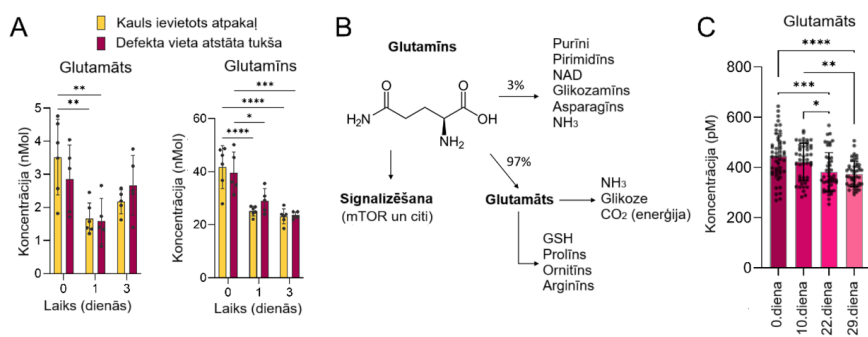
1. attēls. Metabolītu koncentrāciju izmaiņas žurku seruma paraugos, kas iegūti no dzīvniekiem ar galvaskausa kaula defektu. (A) Izgrieztais galvaskausa fragments ievietots atpakaļ defektā. (B) Defekta vieta atstāta tukša.

Lai apstiprinātu iegūtos rezultātus, tika veikta metabolītu analīze asins paraugiem, kas tika iegūti no kaula defekta eksperimenta, kurā tika izmantotas aitas. Šī eksperimenta gaitā 12 veselām Šveices balto Alpu aitu mātītēm (vecums – 2–5 gadi, masa – 60–79 kg) tika veikts pirmsoperācijas radioloģiskais un klīniskais novērtējums [10]. Pēc divu nedēļu aklimatizācijas perioda tika ievākti seruma paraugi un izveidots ķīļveida kaula fragmenta defekts stilba kaulā. Pēc tam asins seruma paraugi tika ievākti 10., 22. un 29. dienā pēc operācijas. Tika veikta iegūto paraugu sagatavošana metaboloma analīzēm, izmantojot ekstrakciju ar metanolu. Paraugi tika analizēti ar LC-MS metodi, izmantojot uz *HILIC* balstītu šķīduma hromatogrāfijas un augstas izšķirtspējas masas spektrometrisko detektēšanu. Tika detektēti 46 metabolīti, kas saistīti ar kaulu dzīšanas procesu aitām (2. att.).



2. attēls. Metabolītu koncentrāciju izmaiņas aitu asins seruma paraugos kaulu dzīšanas procesa laikā.

Metabolomikas rezultātu interpretācija un statistiskā analīze tika veikta, izmantojot *MetaboAnalyst 6.0* un *GraphPad Prism 9*. Analizējot seruma metabolītu izmaiņas kaulu reģenerācijas laikā abiem dzīvnieku modeļiem, izteiktākās izmaiņas novērotas glutamīna un glutamāta koncentrācijās, kas laika gaitā samazinās (3. A un 3. C att.). Svarīgi minēt, ka glutamīns ir galvenais glutamāta prekursors (3. B att.).

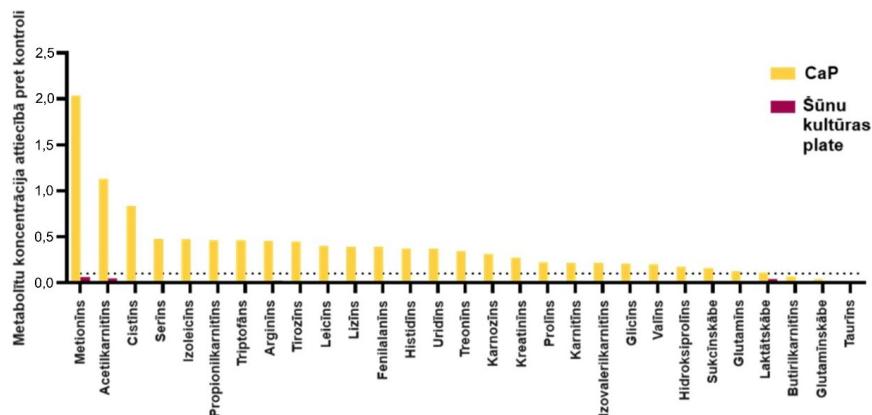


3. attēls. Metabolomikas rezultāti liecina par glutamīna un glutamāta koncentrācijas samazināšanos kaulu reģenerācijas laikā visiem *in vivo* modeļiem. (A) Glutamīna un glutamāta koncentrācija žurku serumā pēc galvaskausa kaula defekta izveidošanas samazinājās kaula reģenerācijas procesā. Glutamīnam bija izteiktāks samazinājums. Būtiskākais abu metabolītu samazinājums notika 1. dienā. (B) Glutamīna metabolisms. Glutamīns primāri tiek pārvērsts par glutamātu [11], [12]. (C) Glutamāta koncentrācija aitu serumā kaulu reģenerācijas laikā uzrādīja pakāpenisku koncentrācijas samazināšanās tendenci. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Glutamāta koncentrācijas samazināšanās kaulu dzīšanas laikā norāda, ka to iespējams izmantot kā informatīvo marķieri, kas atspoguļo dzīšanas procesa temporālo dinamiku, reaģējot uz kaulu traumu. Glutamāts ir svarīgs oglekļa avots trikarbonskābes ciklā. Turklāt glutamātam cieto audu mikrovidē ir galvenā loma vielmaiņas procesos, kas ietekmē enerģijas ražošanu un šūnu funkcijas, piemēram, biosintēzi, oksidēšanās-reducēšanās reakcijas un gēnu ekspresiju [13]. Šis vielmaiņas ceļš ir svarīgs cieto audu reģenerācijas procesā, glutamīns un glutamāts ir nepieciešami kaulu defektiem, lai nodrošinātu kaulaudu šūnām nepieciešamās uzturvielas.

Šūnu un materiāla mijiedarbības metabolikas pētījumi

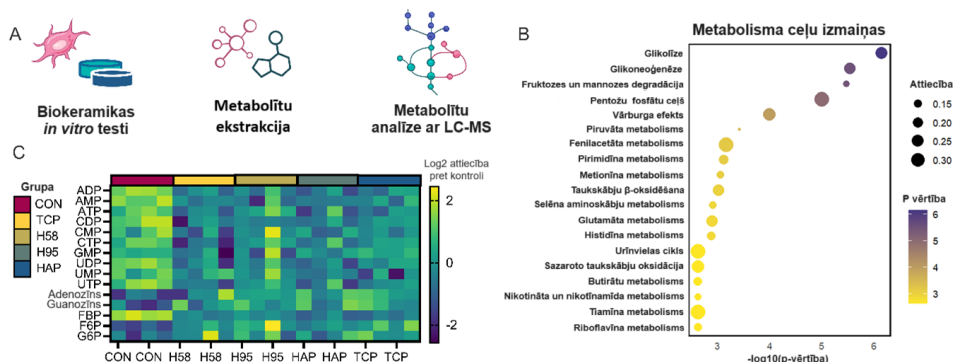
Līdz šim ir plaši pētīta kalcija fosfātus saturošu materiālu afinitāte pret makromolekulām, taču trūkst informācijas par šo materiālu afinitāti pret metabolītiem. Šajā darbā tika veikts sistemātisks pētījums, lai raksturotu CaP ietekmi uz metabolismu, kas savukārt varētu ietekmēt šūnu funkcijas. CaP diski ($n = 3$) tika iegremdētas šūnu barotnē (*DMEM* ar 10 % teļa serumu (*Sigma-Aldrich*) un 1 % penicilīna-streptomīcīna (P/S) šķīdumu) uz 24 stundām. Pirms paraugu savākšanas tika atdalīta kondicionētā šūnu barotne, šūnu plātes tika skalotas ar amonija bikarbonātu un šūnām tika pievienots auksts 80 % metanola šķīdums, lai apstādinātu šūnu metabolismu. Metanola ekstrakti tika savākti pēc 5 minūtēm, žāvēti, izmantojot vakuuma centrifūgu, pēc tam atkal izšķīdināti, lai tos izmantotu LC-MS analīzei. Tukšās plātes iedobes tika izmantotas kā kontroles paraugi, lai analizētu atšķirības metabolītu adsorbcijai uz CaP. Lai noteiktu adsorbcijas ietekmi uz ekstrahēto metabolītu līmeni, adsorbētie metabolīti tika salīdzināti ar metabolītu koncentrāciju šūnās. Izmantojot pirmās dienas metabolītu koncentrācijas kā atsauci, 26 metabolīti uzrādīja augstu adsorbciju: izmaiņas pret kontroles grupu virs 10 % (4. att.). Kopumā CaP uzrādīja zemāku afinitāti ar negatīvi lādētām aminoskābēm, piemēram, asparagīnskābi un glutamīnskābi. Pienskābe adsorbējās gan uz CaP, gan kontroles grupām, taču pienskābes koncentrācija uz CaP virsmas bija gandrīz trīs reizes augstāka nekā kontroles grupā.



4. attēls. Metabolītu adsorbēcija, salīdzinot ar šūnu metabolītu profilu. Pārtrauktā līnija – attiecība pret kontroles grupu = 0,1.

Uz kalcija fosfāta bāzes veidoti biomateriāli plaši tiek lietoti biomedicinā, tomēr līdz šim trūkst informācijas par šo materiālu ietekmi uz šūnu metabolismu. Lai izprastu šūnu un materiālu mijiedarbību mazmolekulāro savienojumu līmenī, tika veikti *in vitro* testi un metabolītu mērījumi. NIH/3T3 šūnu līnija tika kultivēta uz CaP materiāla diskiem. Par šūnu barotni izmantota *DMEM* ar 10 % FBS un 1 % P/S. Sākotnējais šūnu blīvums bija 6×10^4 šūnas/ml un 1 ml šūnu suspensijas tika izmantots uz iedobi/disku. Pirms metabolītu ekstrakcijas šūnas tika skalotas ar amonija bikarbonātu (75 mM, 37 °C), lai atbrīvotos no šūnu barotnes. Pēc tam šūnu paraugiem tikai pievienots atdzesēts 80 % metanola šķīdums, lai inhibētu enzīmu aktivitāti un sagrautu šūnu membrānu. Iegūtie metabolītu ekstrakti tika savākti un centrifugēti. Paraugu ekstrakti tika žāvēti vakuuma centrifūgā, un sausajiem, izžāvētajiem paraugiem tika pievienots 10 μ L izotopiski iezīmēta iekšējo standartu šķīduma un 90 μ L metanola. Tālāk paraugi tika pārnesti uz hromatogrāfijas pudelītēm, lai veiktu LC-MS analīzi. Metabolītu ekstrakcija tika veikta šūnām, kas tika kultivētas kopā ar biomateriāliem pēc vienas, trīs un piecām dienām (5. A att.). Eksperimenti tika veikti ar hidroksilapatītu (HAP) un β -trikalcija fosfātu (TCP), kā arī to kompozītmateriāliem dažādās attiecībās – 95 % HAP un 5 % TCP (H95) un 58 % HAP un 42 % TCP (H58). Kompozītmateriālu attiecības tika izvēlētas, pamatojoties uz komerciāli pieejamiem produktiem *MBCP*® un *4BONE*®. Iegūtie metabolītu profila dati parādīja, ka šūnas uz CaP paraugiem sākotnēji reaģē, izraisot straujas izmaiņas enerģijas metabolismā. Salīdzinot materiālu grupu un kontroles (CNT) iegūtos rezultātus, novērojamas būtiskas atšķirības koncentrāciju līmeņos enerģijas metabolismā iesaistītajiem metabolītiem (5. C att.). Tas liecina par kalcija fosfātu materiālu ievērojamo ietekmi uz šūnu enerģijas ražošanas procesu. Izmantojot metabolisma ceļu izmaiņu detalizētu analīzi (*SMPDB*), tika konstatēts, ka visvairāk ietekmētais metabolisma signālceļš ir glikolīzes process (5. B att.) un citi kanoniskie enerģijas metabolisma ceļi. Šūnām, kas tika pakļautas mijiedarbībai ar CaP

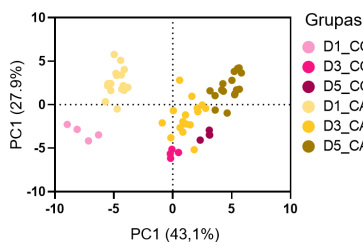
materiālu virsmām, bija palielināts enerģijas patēriņš, par ko liecina paaugstināta glikolīzes procesa un TCA cikla aktivitāte.



5. attēls. Kalcija fosfātu biomateriālu izraisītās izmaiņas šūnu metabolismā. (A) Veiktā eksperimenta ilustrācija. (B) Šūnas iekšējo metabolītu signālceļu izmaiņu detalizēta analīze, salīdzinot kalcija fosfāta materiālus pret kontroli pēc vienas dienas. (C) Enerģijas metabolismā konstatētās metabolītu izmaiņas pēc vienas dienas.

Biomateriālu iedarbības laika un materiālu sastāva ietekme uz šūnu vielmaiņu

Lai noteiktu, vai biomateriālu sastāvs un šūnu ekspozīcijas laiks ietekmē metabolismu, tika veikta galveno komponentu analīze (*principal component analysis; PCA*). Iegūtie rezultāti tika atspoguļoti izkliedes grafikā, tika novērota dažādu CaP materiālu cieša savstarpējā grupēšanās un būtiska atšķirība starp materiālu un kontroles grupu rezultātiem (6. att.). Metabolītu izmaiņas pirmajā laika punktā ir nozīmīgākas nekā vēlākos laika posmos, īpaši PC1 (43,1 %) grafikā, kas liecina par būtiskākām CaP un kontroles grupas atšķirībām sākotnējā eksperimenta fāzē. Metabolītu izmaiņu amplitūda laika gaitā pakāpeniski samazinās. Tas liecina par šūnu spēju pielāgoties jaunai videi.



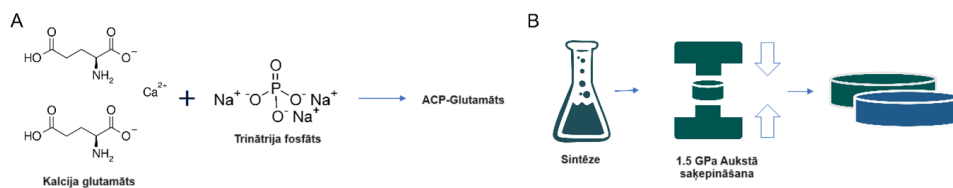
6. attēls. Izkliedes grafiks visām CaP materiālu un kontroles grupām pirmajā, trešajā un piektajā dienā ($n = 4$).

Amorfā kalcija fosfāta ar glutamātu izstrāde

ACP-Glu sintēze un pagatavošana

Pamatojoties uz iepriekš aprakstītajiem eksperimentālajiem rezultātiem, tika nolemts veikt amorfā kalcija fosfāta ar pievienotu glutamātu (ACP-Glu) sintēzi. Lai sintezētu ACP ar glutamātu (ACP-Glu),

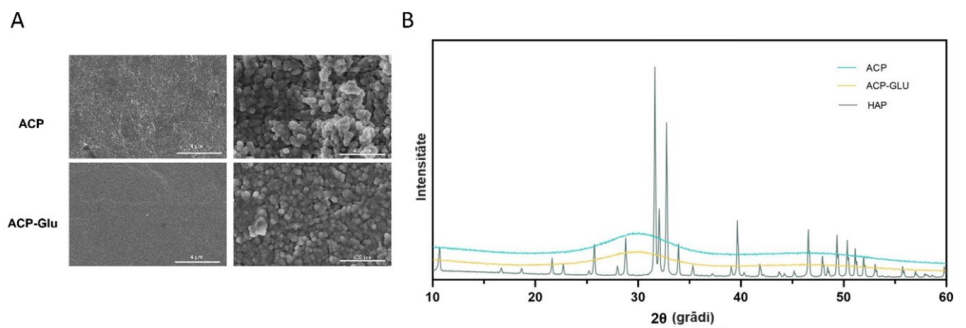
tika pagatavots 150 mM kalcija glutamāta šķīdums *Milli-Q*® ūdenī. Pēc tam kalcija glutamāta šķīduma pH tika pielāgots līdz 11,5, izmantojot 3M NaOH šķīdumu. Pēc pH pielāgošanas šķīdumam nekavējoties tika pievienots tāds pats tilpums (150 ml) 100 mM trinātrija fosfāta šķīduma (kopējais tilpums 300 ml). Procesa laikā tika nodrošināta nepārtraukta maisīšana. Uzreiz pēc nogulsnešanās suspensija tika centrifugēta ar 3000 apgr./min piecas minūtes, un iegūtās nogulsnes tika mazgātas trīs reizes ar *Milli-Q*® ūdeni. Vēlāk centrifūgas mēģene ar nogulsnēm tika ievietota šķīdrajā slāpekļā uz 15 minūtēm un liofilizēta 72 stundas. 0,3 g iegūtā pulvera tika pārnesti uz 13 mm *split-sleeve* presēšanas veidni (W18Cr4V *hardened carbon tool steel, Across International*), pārklājot virsmu ar lentu, lai novērstu pulvera pielipšanu un piesārņošanu. Izmantojot PW 100 ES elektrohidraulisko presi (P/O/WEBER), paraugam ar ātrumu ~15 MPa/s tika pielikts 1,5 GPa spiediens. Spiediens tika noturēts piecas minūtes, un tad pakāpeniski paraugs tika atbrīvots. Šis aukstās saķepināšanas process tika veikts istabas temperatūrā (18–25 °C), pēc kura sapresētie pulvera diski bija gatavas turpmākiem *in vitro* pētījumiem. *In vitro* testiem tika izmantoti 0,3 g katra sintezētā ACP-Glu materiāla, bet ACP un HAP pulveri tika izmantoti kā kontroles grupas salīdzināšanai. Materiālu sintēze un disku sagatavošana redzama 7. attēlā.



7. attēls. Materiālu pagatavošana. (A) ACP-Glutamāta sintēze; (B) materiāla disku sagatavošana, izmantojot auksto saķepināšanu.

ACP-Glu raksturošana

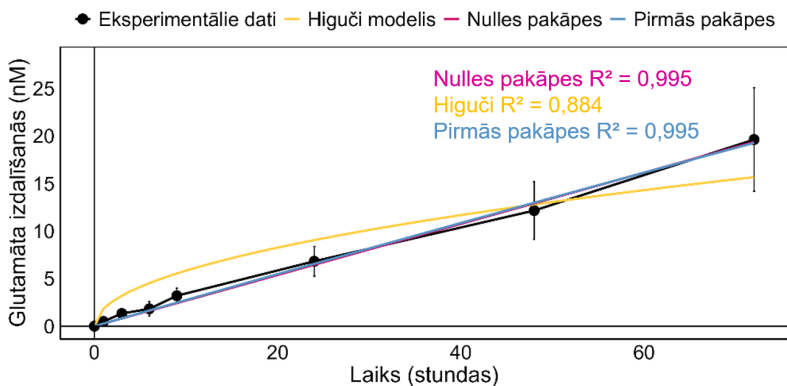
Sintezētais ACP-Glu kopā ar amorfo kalcija fosfātu un hidroksilapatītu tika raksturots, izmantojot skenējošo elektronu mikroskopiju (SEM) un rentgenstaru difraktometriju (*XRD*). Auksti saķepinātajiem diskiem ir plakana virsma, daļiņu izmērs – aptuveni 14 nm (8. A att.). ACP un ACP-Glu virsma un daļiņu izmēri ir līdzīgi. *XRD* rezultāti uzrāda, ka ACP un ACP-Glu ir amorfa struktūra, savukārt HAP ir klasiska apatīta kristāliskā struktūra (8. B att.). Glutamāta karboksilāta jonu klātbūtne var stabilizēt ACP amorfo fāzi [14].



8. attēls. ACP-Glu raksturošana. (A) ACP un ACP-Glu SEM attēli. (B) ACP, ACP-Glu un HAP XRD aina.

Glutamāta izdalīšanās pētījumi no ACP-Glu paraugiem

Auksti saķepinātās ACP-Glu diski (diametrs – 13 mm, masa – 0,3 g) tika iegremdētas 1 ml šūnu kultūras barotnes (*DMEM*) iedobju platēs. Pēc vienas, trīs, sešām, deviņām, 24, 48 un 72 stundām tika savākti 50 μ l kondicionētās šūnu kultūras barotnes. Katram paraugam tika pievienoti 200 μ l metanola, lai sasniegtu 80 % metanola proporciju paraugos. Sagatavotie paraugi tikai analizēti ar LC-MS. Glutamāta izdalīšanās no ACP-Glu *DMEM* vidē ir attēlota līniju diagrammas veidā, veicot vienkāršu lineārās regresijas analīzi, lai modelētu glutamāta izdalīšanās ātrumu (9. att.). Gan nulles kārtas, gan pirmās kārtas modeļi labi aprakstīja kumulatīvo glutamāta izdalīšanos (attiecīgi $R^2 = 0,995$ un $0,995$). Pielāgotās līknes 0–72 h intervālā vizuāli pārklājās tiktāl, ka konkrētā izlases lieluma gadījumā šos divus modeļus ir statistiski grūti nošķirt. Glutamāta izdalīšanās ātrums ir aptuveni 0,01454 nmol (2,14 ng) stundā. Šī vienmērīgā izdalīšanās ļauj precīzi kontrolēt devu, kas tiek piegādāta kaulaudiem, tādējādi ir iespējams panākt vēlamo terapeitisko efektu un samazināt iespējamās blakusparādības, ko var radīt strauja glutamāta izdalīšanās. Atšķirībā no ārēji pārklātām zāļu izdalīšanās sistēmām, ACP-Glu materiālā glutamāts sintēzes laikā tiek iekļauts materiāla iekšpusē, tāpēc glutamāta izdalīšanās ir lineāra, nevis strauja, kā tas ir raksturīgi citām neiekapsulētām zāļu piegādes sistēmām. Salīdzinot ar citām ACP zāļu piegādes sistēmām, kas atspoguļo pieaugošu absorbcijas tendenci iegremdēšanas laikā [15], [16], glutamāta lineārā izdalīšanās tendence no ACP-Glu atbilst glutamīna un glutamāta līmeņa pakāpeniskajam samazinājumam *in vivo* eksperimentos. Eksperimentā tika izmantota stacionāra iegremdēšanas vide, kas ir salīdzināma ar turpmākajiem *in vitro* eksperimentiem. Līdz ar to bioaktīvas aminoskābes izdalīšanās tendence bioloģiski reālos apstākļos var atšķirties. Glutamāta izdalīšanās vai uzņemšanas ātrums var mainīties plūsmas, piemēram, asinsrites, vai šūnu, piemēram, osteoklastu, klātbūtnē.



9. attēls. Glutamāta izdalīšanās no ACP-Glu 72 stundu laikā.

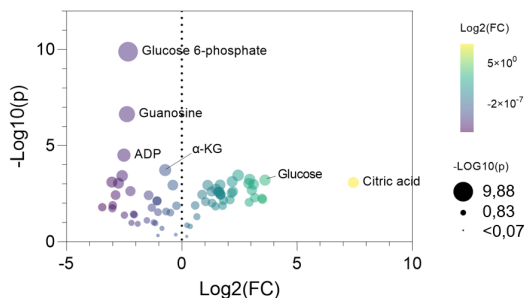
ACP-Glu ietekmes uz šūnu metabolismu raksturošana

Lai raksturotu ACP-Glu ietekmi uz šūnu metabolismu, tika izmantota MC3T3-E1 pre-osteoblastiem līdzīga šūnu līnija, kas kultivēta *DMEM* (*Gibco*) vidē ar 50 µg/ml L-askorbīnskābi (C vitamīnu), 10 % FBS (ar karstumu inaktivēts) un 1 % P/S [17]. Šūnu iesēšanas blīvums bija $3,5 \times 10^4$ šūnas/ml un 1 ml šūnu suspensijas tika izmantots uz iedobi/disku. *DMEM* barotnes sastāvā netika pievienots papildu glutamāts, kas, balstoties dzīvnieku pētījumu rezultātos, imitēja kaulu traumas apstākļus. Šūnas ar materiāliem (ACP, ACP-Glu, HAP un kontroles paraugiem) tika kultivētas trīs dienas. Trešajā dienā tika veikta šūnu ekstrakcija, vispirms no platēm noņemot barotni, un tad mazgājot šūnas trīs reizes ar 75 mM amonija bikarbonāta šķīdumu. Metabolītu ekstrakcijai tika izmantots 80 % metanola šķīdums. Paraugu ekstrakti tika pārnesti uz *Eppendorf* paraugu stobriņiem un centrifugēti ar ātrumu $1000 \times g$ 0 °C temperatūrā. Paraugu ekstrakti tika iztvaicēti vakuuma centrifūgā un pēc tam izšķīdināti 80 % metanola šķīdumā, papildus pievienojot izotopiski iezīmētu iekšējo standartu šķīdumu. Paraugi tika analizēti ar mērķētu metabolītu analīzi, izmantojot *HILIC* balstītu šķīduma hromatogrāfiju, kas apvienota ar trīskāršā kvadrupola masspektrometra detektēšanu. Iegūto datu statistikas analīzei tika izmantots *MetaboAnalyst 6.0*. Iegūtās metabolītu koncentrācijas vērtības tika logaritmiski pārveidotas un mērogotas, izmantojot vidējās vērtības centrēšanu, katru no mainīgajiem dalot ar standarta novirzi.

Metabolītu atšķirības starp ACP-Glu un kontroles paraugiem

Vulkāna diagrammā (10. att.) ir salīdzināti metabolīti ACP-Glu un CNT (kontroles paraugos bez materiāliem). Statistiski visbūtiskākās izmaiņas tika novērotas diviem metabolītiem: glikozes 6-fosfātam (attiecība pret kontroli = 0,20, $p < 0,0001$) un citronskābei (attiecība pret kontroli = 173,20, $p < 0,001$). Glikozes 6-fosfāta koncentrācija ir būtiski samazinājusies, savukārt citronskābes – palielinājusies. Glikozes 6-fosfātam ir svarīga nozīme glikozes metabolismā, un tā koncentrācijas samazināšanās liecina par izmaiņām enerģijas metabolismā vai šūnu signālceļos. Glikozes 6-fosfāts kā otrs metabolīts glikolīzē inhibē glikozes metabolisma sākotnējo reakciju. Inhibēšanu izraisa papildu

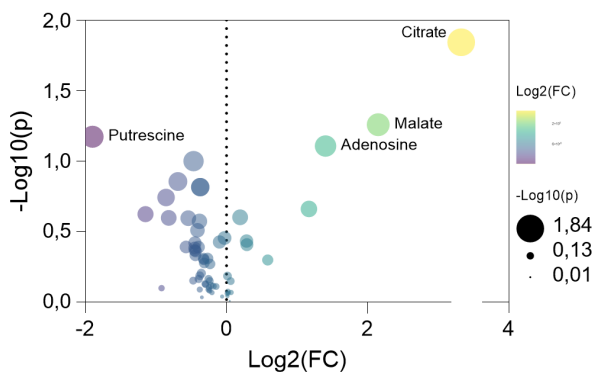
glikoneoģenēze, ko nodrošina glutamāts. Citronskābe ir starpprodukts TCA ciklā, un tās koncentrācijas pieaugums var liecināt par izmaiņām šūnu enerģijas metabolismā. Novērotās izmaiņas ir saistītas ar enerģijas metabolismu, nukleotīdu sintēzi, neirotransmiteru regulāciju un šūnu signālsistēmām.



10. attēls. Vulkāna diagramma, kurā salīdzināti nozīmīgākās metabolītu koncentrāciju izmaiņas ACP-Glu un kontroles paraugos. Uz X ass ir atlikta izmaiņas attiecībā pret kontroles grupu izteiktas kā \log_2 (attiecība pret kontroli); uz y ass ir p vērtība, kas izteikta kā $-\log_{10}(p)$ vērtība).

Metabolītu atšķirības starp ACP-Glu un ACP

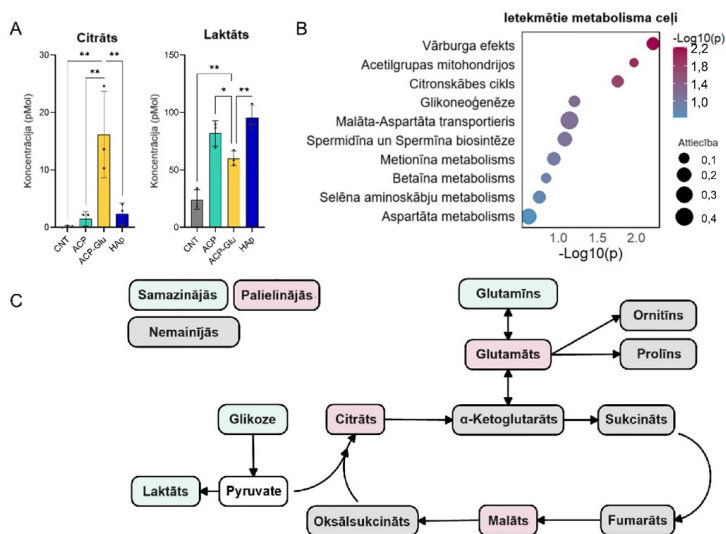
Vulkāna diagrammā (11. att.) ir salīdzinātas metabolītu koncentrācijas ACP-Glu un ACP grupām. Salīdzinot ar ACP, ACP-Glu paraugos citronskābes koncentrācija ir palielinājusies 10 reizes, taču ābolskābes (*Malic acid*) – 4,4 reizes. Ņemot vērā iepriekšējos pētījumus, zināms, ka šie metabolīti ir iesaistīti enerģijas metabolisma procesos, jo īpaši TCA ciklā. Paaugstināts adenozīna līmenis liecina par palielinātu ATP apriti vai sintēzi. Tas varētu liecināt par lielāku enerģijas pieprasījumu, izmaiņām ATP izmantošanā vai pārstrādē šūnās, kas ir saskarē ar ACP-Glu. Var secināt, ka ACP-Glu būtiski ietekmē šūnu metabolismu, īpaši enerģijas ražošanas procesus. ACP-Glu paraugu grupā paaugstinātais TCA cikla starpproduktu un adenozīna līmenis, salīdzinot ar ACP, liecina par izmaiņām šūnu enerģijas metabolismā, kas, iespējams, palielina ATP sintēzi vai apriti.



11. attēls. Vulkāna diagramma, kurā salīdzināti nozīmīgākie metabolīti ACP-Glu un ACP paraugos. Uz X ass ir atlikta izmaiņas attiecībā pret kontroles grupu izteiktas kā \log_2 (attiecība pret kontroli); uz y ass ir p -vērtība, kas atspoguļota kā $-\log_{10}(p)$ -vērtība).

Pre-osteoblasti, kas kultivēti ar ACP-Glu, uzrāda ievērojami augstu citronskābes līmeni. Citronskābes koncentrācija šūnās ir aptuveni astoņas reizes augstāka nekā pārējām divām CaP materiālu grupām un apmēram 80 reizes augstāka nekā kontroles grupā (12. A att.). Visām CaP materiālu grupām ir augstāks laktāta līmenis, salīdzinot ar CNT paraugiem. Savstarpēji salīdzinot CaP materiālu iegūtos rezultātus, var novērot, ka šūnām, kas saskaras ar ACP-Glu, ir zemāks laktāta līmenis – 0,7 attiecībā pret ACP un 0,6 attiecībā pret HAP. Izmantojot metabolisma ceļu izmaiņu detalizētu analīzi (*SMPDB*), tika veikta ietekmēto metabolisma ceļu analīze, kas redzama 12. B attēlā. Trīs ietekmētākiem metabolisma ceļiem – Vārburga efektam, acetilgrupām mitohondrijos un TCA ciklam – ir liela nozīme organismu enerģijas ražošanā. Var secināt, ka glutamāta klātbūtne osteoblastu vielmaiņā ir radījusi izmaiņas enerģijas ražošanas procesos. Metabolisma ceļu ilustrācija (12. C att.) attēlo metabolītu koncentrāciju samazināšanos glikolīzes procesā, ietverot primāro substrātu – glikozi. Glutamāta pievienošana materiālam samazina anaerobās glikolīzes procesa aktivitāti. Turklāt glutamāta klātbūtne varētu mazināt tieši CaP inducēto pastiprināto anaerobo glikolīzi. Jāatzīmē, ka TCA ciklā iesaistīto metabolītu koncentrācija nemainījās vai paaugstinājās, liecinot par iespējamo TCA cikla pastiprināto aktivitāti.

Metabolisma ceļu karte atspoguļo arī alternatīvus vielmaiņas ceļus, kas pastiprina citu aminoskābju sintēzi. Glutamīna līmenis samazinās, taču ornitīna un prolīna līmenis paliek nemainīgs. Novērotās metabolisma izmaiņas liecina, ka papildus izdalītais glutamāts no substrāta piedalās TCA ciklā.



12. attēls. Enerģijas metabolisma ceļu izmaiņas. (A) Citronskābes koncentrācija visās paraugu grupās. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ (B) Ietekmēto metabolisma ceļu izmaiņas, salīdzinot ACP-Glu un ACP paraugus. (C) Metabolisma ceļu karte, atspoguļojot salīdzinājumu metabolītu koncentrāciju izmaiņām ACP-Glu un ACP. “Palielinājies” nozīmē, ka metabolīta līmenis ACP-Glu ir augstāks, savukārt “samazinājies” nozīmē, ka metabolīta līmenis ACP-Glu ir zemāks.

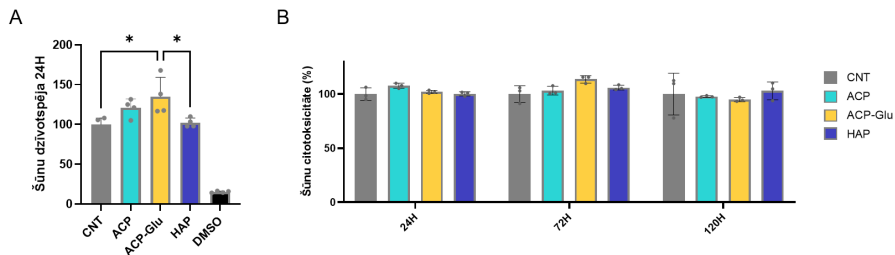
ACP-Glu izraisa specifiskas izmaiņas šūnu metabolismā, kas atspoguļojas paaugstinātā citronskābes koncentrācijā ACP-Glu paraugos. Paaugstināts citronskābes un ābolskābes līmenis liecina par palielinātu aktivitāti TCA ciklā un potenciāli pastiprinātu ATP sintēzi vai apriti. Šīs vielmaiņas izmaiņas liecina par ACP-Glu spēju mainīt kaulaudu šūnu darbību, potenciāli ietekmējot procesus, kas ir būtiski kaulu veselībai, reģenerācijai un pārveidošanai.

ACP-Glu ierosinātas *in vitro* osteoģenēzes pētījumi

Lai raksturotu izstrādātā ACP-Glu spēju uzlabot jaunu kaulaudu veidošanos (osteoģenēzi), tika veikti *in vitro* šūnu pētījumi ar MC3T3-E1, kas ir pre-osteoblastiem līdzīga šūnu līnija. Šūnas tika kultivētas ar šūnu barotni, kas sastāvēja no *DMEM* (*Gibco*) ar 50 µg/ml L-askorbīnskābi (C vitamīnu), 10 % FBS (karstumu inaktivēts) un 1 % P/S [17]. Bioloģiskās saderības testam tika sagatavoti materiālu diski (diametrs 6 mm, masa 0,07 g), izmantojot aukstās saķepināšanas metodi. Šūnas tika kultivētas 96 iedobju platēs ar iesēšanas blīvumu 10000 šūnu vienā iedobē/diskā. Lielākā izmēra materiāla diski (diametrs 13 mm, masa 0,3 g) tika izmantoti kalcija un fosfātu jonu izdalīšanās testiem un osteoģenēzes novērtēšanai. Šūnu iesēšanas blīvums šajos testos bija $3,5 \times 10^4$ šūnas/ml, un tika izmantots 1 ml šūnu suspensijas uz vienu iedobi/disku. Lietotās *DMEM* barotnes sastāvā nav pievienots papildu glutamāts, kas imitē kaulu traumas apstākļus, kas tika novēroti dzīvnieku pētījumā. *In vitro* pētījumā tika izmantoti ACP, ACP-Glu un HAP materiāli, kā kontroles grupu izmantojot šūnu paraugus, kuru iedobēs netika pievienots biomateriāls.

Biosaderības testi

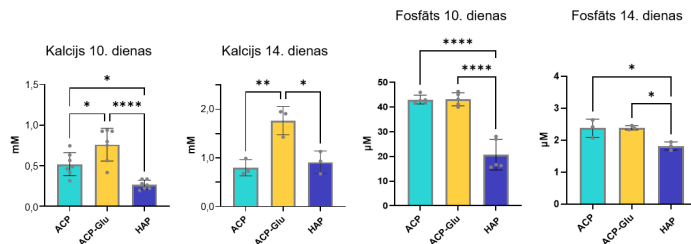
Šūnu proliferācija tika novērtēta, mērot metabolisma aktivitāti ar *Cell Counting Kit-8* (CCK-8) testu. Šūnas, kas 24 stundas tika kultivētas *DMSO*, tika izmantotas kā pozitīvās kontroles grupa. Citotoksicitātes pētījumu gaitā tika veikti LDH (laktāta dehidroģenāzes) mērījumi kondicionētās šūnu kultūras barotnēs 24, 72 un 120 stundas pēc šūnu iesēšanas (13. att.). Laktāta dehidroģenāze (LDH) ir enzīms, kas izdalās, kad tiek bojātas šūnu membrānas, un LDH tests mēra LDH izdalīšanos. Salīdzinot ar kontroles paraugiem ($p = 0,0102$) un HAP ($p = 0,0166$), šūnas audzētas uz ACP-Glu CCK-8 testos uzrādīja ievērojami augstākus šūnu dzīvotspējas rezultātus. Būtiska atšķirība starp ACP un ACP-Glu netika novērota ($p = 0,5150$). Tas ir skaidrojams ar to, ka glutamāta klātbūtne ACP-Glu var veicināt šūnu dzīvotspēju. Glutamāts ir aminoskābe, kas ir iesaistīta dažādos šūnu procesos, tostarp enerģijas ražošanā un olbaltumvielu sintēzē. Šūnas to spēj izmantot kā papildu barības vielu, lai atbalstītu vielmaiņas aktivitātes, kā rezultātā palielinās šūnu dzīvotspēja. Var secināt, ka bez glutamāta piegādes šūnu dzīvotspēja ir samazināta. Lai gan tika novērotas izmaiņas dzīvotspējā, tomēr neviena no materiālu paraugu grupā neuzrādīja toksicitāti. Jāuzsver, ka glutamāta izdalīšanās neizraisīja šūnu struktūras bojājumus un šūnu nāvi.



13. attēls. (A) MC3T3-E1 šūnu proliferācija pēc 24 stundu kultivēšanas ($n = 4$), $*p < 0,05$. (B) Izdalītā LDH līmeņa rezultāti visās paraugu grupās pēc 24, 72 un 120 stundu šūnu kultivēšanas ($n = 3$).

Kalcija un fosfāta jonu koncentrācijas mērījumi šūnu barotnē

Kalcija un fosfāta jonu koncentrācijas kondicionētajā barotnē tika mērītas 10. un 14. dienā pēc šūnu iesēšanas. Kalcija koncentrācija barotnē tika mērīta ar kalcija kolorimetriskā testa komplektu (*Sigma*), bet fosfāta koncentrācija barotnē tika mērīta ar fosfātu testa komplektu (*Sigma*). Lai noteiktu savstarpējās atšķirības dažādās materiālu grupās, tika veikta viena faktora dispersijas analīze (*one-way ANOVA*), kam sekoja *Tukey* testa veikšana. Iegūtie rezultāti uzrādīja, ka gan ACP, gan ACP-Glu pastiprināti izdala kalcija jonus (14. att.). Proti, kondicionētā barotne ar ACP-Glu saturēja ievērojami vairāk kalcija jonus nekā ACP (2,2 reizes vairāk) un HAP 14. dienā (1,9 reizes vairāk). Tas atbilst literatūras datiem, jo amorfajam kalcija fosfātam ir augstāka šķīdība, salīdzinot ar HAP [20]. Ātrāku šķīšanas kinētiku veicina ACP nesakārtotā struktūra, izraisot ātrāku kalcija un fosfāta jonu sadalīšanos un atbrīvošanos [21]. Tas rada ievērojamu atšķirību ACP šķīdībā dažādos vides apstākļos (temperatūra, pH). Osteoblasti, kas atrodas materiāla tuvumā, var absorbēt šos kalcija jonus no barotnes un tālāk izmantot kaulu mineralizācijai un citiem šūnu procesiem [19].

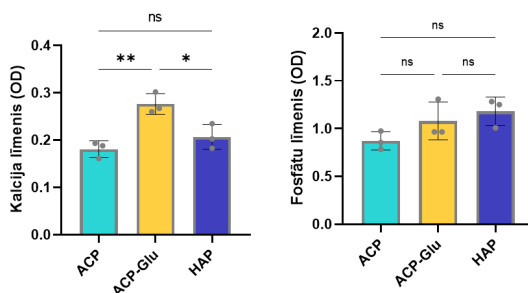


14. attēls. Kalcija un fosfātu jonu koncentrācija šūnu barotnē 10. un 14. dienā.

Šūnu iekšējā kalcija un fosfāta jonu koncentrācija

Šūnu iekšējā kalcija un fosfāta koncentrācija tika noteikta šūnām 14. dienā pēc uzņemšanas uz materiāliem ar trīs paralēlajiem paraugiem katrai paraugu grupai. Šūnu kultūras barotne tika atdalīta, un šūnas tika divas reizes mazgātas ar PBS šķīdumu. Tris-HCl šķīdums ar 1% triton X-100 tika izmantots, lai lizētu šūnas. Tālāk paraugi tika pārnesti uz *Eppendorf* stobriņiem un maisīti 15 sekundes. Kalcija un fosfāta jonu koncentrācijas tika mērītas ar kalcija kolorimetriskā testa komplektu (*Sigma*) un

fosfātu testa komplektu (*Sigma*) uz 96 iedobju platēm. HAP un ACP-Glu uzrādīja augstāku šūnu kalcija līmeni, salīdzinot ar ACP, taču fosfātu līmeņiem nevarēja novērot būtiskas atšķirības starp grupām. ACP-Glu rada vidi ar augstu kalcija saturu, kas veicina kalcija uzņemšanu, un glutamāts ACP-Glu sastāvā, iespējams, maina kalcija metabolismu. Tas var ietekmēt kalcija signālu pārneši un šūnu reakcijas, potenciāli uzlabojot kalcija uzņemšanu šūnās [22]. Jāņem vērā, ka rezultāti iegūti tikai no viena laika punkta un jau pēc 14 dienu kultivēšanas, tādējādi tos varēja ietekmēt dažādi ārēji faktori, piemēram, kalcija un fosfora jonu nogulsšanās no mineralizētiem CaP diskkiem.



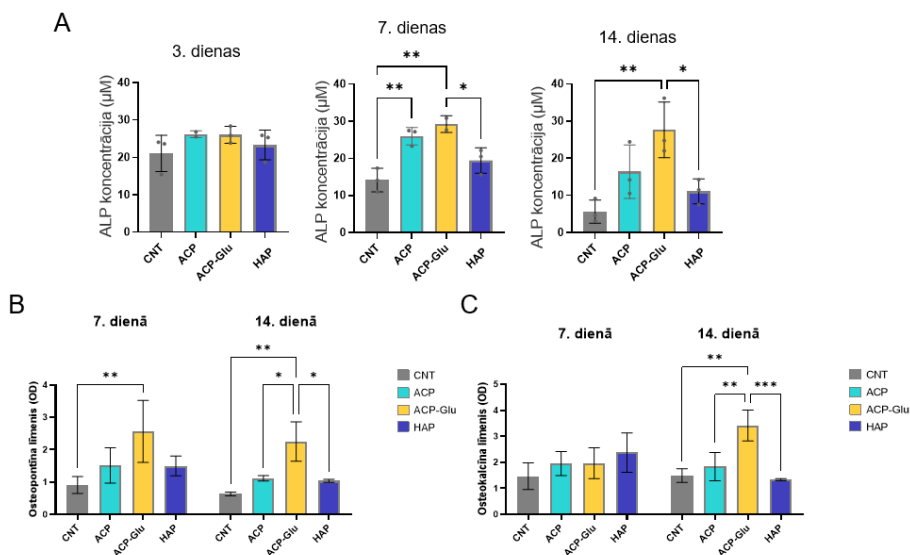
15. attēls. Intracelulāro kalcija un fosfātu jonu līmenis pēc 14 dienām.

Osteoģenēzes noteikšana

Enzīma sārmainās fosfatāzes (ALP) tests, izmantojot *Sigma* p-nitrofenilfosfāta tabletes, tika veikts, lai raksturotu materiālu osteoģenēzi. ALP ir svarīga loma ārpusšūnu matricas mineralizācijai kaulaudos. Kad preosteoblastu šūnas nobriest par osteoblastiem, tās veic kaulu matricas sintēzi, kas ietver kolagēnu un citus proteīnus. ALP iesāk un veicina šīs matricas mineralizāciju, defosforilējot savienojumus, kas kavē mineralizāciju, piemēram, neorganisko pirofosfātu. ALP tiek izmantots par osteoģenēzes marķieri, kas liecina par sākotnējo osteoblastu diferenciāciju un osteoģenēzes aktivitātes pieaugumu. ALP līmeni nosaka mērot p-nitrofenola veidošanos no p-nitrofenilfosfāta. ALP līmenis tika noteikts CNT, ACP, ACP-Glu un HAP paraugu grupās, lai novērtētu osteoģenēzes procesa sākotnējos posmus. Pirmajā mērījumu punktā (trešā diena) ALP līmenis ir līdzīgs (16. A att.), taču laika gaitā ACP-Glu materiālā ALP līmenis ievērojami paaugstinās. Rezultāti apstiprināja, ka ACP-Glu izraisīja labāku osteoģenēzi nekā kontroles, ACP un HAP paraugi.

Osteoģenēzes biomarķieru OPN (osteopontīna) un OCN (osteokalcīna) koncentrācija šūnu barotnē tika noteikta septītajā un 14. dienā pēc šūnu uzņemšanas. OPN un OCN līmeņa noteikšanai šūnu barotnē pēc septiņu un 14 dienu kultivēšanas tika izmantoti *Abcam* (ab285236) piedāvātais *Mouse Osteocalcin ELISA Kit* un *Sigma* piedāvātais *Mouse Osteopontin ELISA Kit* (RAB0437). ACP-Glu paraugiem abos laika punktos bija ievērojami augstāks OPN līmenis, salīdzinot ar kontroles paraugiem. Septītajā dienā nevarēja novērot būtiskas atšķirības starp ACP-Glu salīdzinājumā ar ACP un HAP paraugiem, taču OPN līmenis būtiski palielinājās ACP-Glu grupai 14. dienā (16. B att.). OPN ir nesakārtots proteīns ar

ievērojamu negatīvo lādiņu. Aptuveni 25 % no proteīna sastāva sastāda aspartāta vai glutamāta atlikumi [23]. ACP-Glu satur vienu no šī proteīna galvenajām sastāvdaļām, kas var veicināt arī OPN sintēzi.



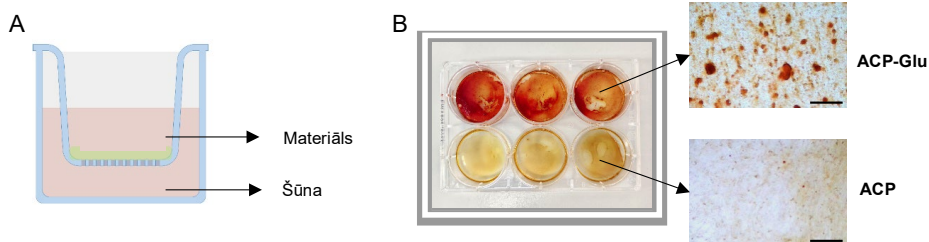
16. attēls. Osteogēneses marķieru koncentrācijas līmenis. (A) ALP koncentrācija trešajā., septītajā un 14. dienā. (B) Osteopontīna koncentrācijas līmenis septītajā un 14. dienā. (C) Osteokalcīna koncentrācijas līmenis septītajā un 14. dienā.

OCN līmenis septītajā dienā uzrādīja līdzīgus rezultātus. OCN ir nobriedušu osteoblastu biomarķieris, kas iesaistīts kaulu matricas veidošanā (16. C att.). OCN koncentrācija septītajā dienā liecina, ka visās paraugu grupās šūnas ir salīdzinoši agrīnā osteoblastu diferenciācijas stadijā. Glutamāta klātbūtnes ietekme uz osteoblastu nobriešanu rezultātos atspoguļojās 14. dienā. OCN līmenis no šūnām uz ACP-Glu materiāla ir 1,86 reizes augstāks nekā ACP materiāla grupā un 2,57 reizes augstāks nekā HAP grupā. Tas liecina, ka šūnas, kas bija saskarē ar ACP-Glu, ātrāk diferencējās un veido nobriedušus osteoblastus.

Mineralizācijas novērtēšana

Lai detektētu un kvantificētu kalcija jonu nogulsnes, kas biomateriālos var liecināt par mineralizācijas procesu, tika izmantots alizarīna sarkanais. Tas reaģē un saistās ar kalcija joniem, iekrāsojoties sarkanā krāsā. Izmantojot mikroskopiju vai spektrofotometriju, var raksturot osteogēno diferenciāciju vai mineralizāciju audu inženierijas modeļos. Šajā pētījumā tika izmantota netiešā šūnu kultivēšanas metode, lai izvairītos no biomateriāla iekrāsošanās. Materiāli pulvera stāvoklī tika ievietoti *transwell* ieliktnī šūnu barotnes augšpusē. MC3T3-E1 šūnas tika iesētas sešās iedobju platēs ar blīvumu $3,5 \times 10^4$ šūnas/ml un 3 ml šūnu suspensijas katrā iedobē. Šūnas trīs paralēlos eksperimentos tika kultivētas 21 dienu *DMEM* vidē, kas nesatur glutamātu. Kā kontroles grupa tika izmantots tīrs ACP materiāls. Pēc 21 dienas kultivēšanas barotne tika noņemta un katra iedobe trīs reizes uzmanīgi tika mazgāta ar

dejonizētu ūdeni. Pēc tam katrā iedobē uz vienu minūti tika pievienots 1 ml Alizarīna sarkanā šķīdums, pēc vienas minūtes iedobes atkal tika mazgātas ar dejonizēto ūdeni piecas reizes. Pēc 21 dienas ACP-Glu paraugi šūnu barotnē vizuāli uzrādīja palielinātu mineralizāciju (17. att.). ACP-Glu paraugu makroskopiskajā attēlā novērojama intensīvi iekrāsota sarkanā krāsa. Izmantojot optiskā mikroskopa palielinājumu, novēroti intensīvāk iekrāsoti sarkani laukumi un lielāki mineralizācijas nogulsņējumi ACP-Glu paraugiem, salīdzinot ar ACP paraugiem. Jāmin, ka rezultātus varēja ietekmēt materiāla iekļūšana filtrā, tomēr tas būtu iespējams arī ACP paraugiem, līdz ar to rezultātus joprojām var uzskatīt par nozīmīgiem. Var secināt, ka ne tikai kalcijs, bet arī glutamāts, kas izdalās no materiāliem, veicina osteoblastu osteoģenēzes procesu. Glutamāta trūkums var ierobežot osteoblastu mineralizāciju, savukārt glutamātu saturoša materiāla klātbūtne spēj uzlabot osteoblastu galveno funkciju – jaunu kaulu struktūru veidošanu. Šie rezultāti pierāda ACP-Glu spēju veicināt osteoģenās indukcijas procesus.



17. attēls. Alizarīna sarkanā krāsojums. (A) Netiešā šūnu barotne ar materiāliem. (B) Alizarīna sarkanā krāsojuma kopskats uz materiāliem ar kameras un mikroskopa attēliem. Augšējā attēlā – ACP-Glu, apakšējā – ACP. Mēroga josla = 30 μm .

Secinājumi

1. Dzīvniekiem ar kritiska izmēra kaulu defektu dzīšanas procesa laikā novērojamas izteiktas metabolītu koncentrāciju svārstības, īpaši ievērojama ir glutamīna un glutamāta koncentrācijas samazināšanās.
2. Kalcija fosfāti (CaPs) adsorbē mazmolekulārus metabolītus, īpaši aminoskābes, un ietekmē šūnu aminoskābju un enerģijas metabolisma ceļus.
3. Šūnās palielinās anaerobā vielmaiņa, kad tās nonāk saskarē ar CAP, īpaši pirmajā dienā.
4. Aukstās sintēzes ceļā iegūts ACP-Glu paātrina šūnu mineralizācijas procesus, salīdzinot ar hidroksiapatītu un ACP, par ko liecina divas reizes augstāki OCN un OPN līmeņi un izteiktāki Alizarīna sarkanā iekrāsošanas rezultāti.
5. Amorfs kalcija fosfāts ar glutamātu (ACP-Glu) demonstrē kontrolētu un pakāpenisku glutamāta izdalīšanos trīs dienu laikā, kas ir būtiski svarīgi šūnu funkciju atbalstam audu atjaunošanās laikā.
6. ACP-Glu maina enerģijas metabolismu, īpaši uzlabojot trikarbonskābes ciklu pēc glikoneoģenēzes. ACP-Glu iedarbība izraisīja astoņas reizes augstāku citronskābes līmeni šūnās nekā citi pētītie kalcija fosfāta biomateriāli.

Literatūras avoti

1. Wu, A. M., Bisignano, C., James, S.L., Abady, G.G., Abedi, A., Abu-Gharbieh, E., et al. Global, regional, and national burden of bone fractures in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Heal Longev.* 2021;2(9):e580–592.
2. Yousefi, A.M. A review of calcium phosphate cements and acrylic bone cements as injectable materials for bone repair and implant fixation. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2019;17 (4).
3. Pandit, A., Indurkar, A., Locs, J., Haugen, H.J., Loca, D. Calcium Phosphates: A Key to Next-Generation In Vitro Bone Modeling. *Advanced Healthcare Materials.* 2024.
4. Galotta, A., Sglavo, V.M. The cold sintering process: A review on processing features, densification mechanisms and perspectives. *J Eur Ceram Soc [Internet].* 2021;41(16):1–17. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2021.09.024>.
5. Choi, I.A., Umemoto, A., Mizuno, M., Park-Min, K.H. Bone metabolism – an underappreciated player. *npj Metab Heal Dis [Internet].* 2024;2(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s44324-024-00010-9>.
6. Xia, D., Wu, R., Xue, Q., Jiang, G., Xu, S. Metabolomics provides insights into acceleration of bone healing in fractured patients with traumatic brain injuries. *Biomed Chromatogr.* 2023;37(11).
7. Zhang, X., Xu, H., Li, G.H.Y., Long M.T., Cheung, C., Vasan, R.S., et al. Metabolomics insights into osteoporosis through association with bone mineral density. *J Bone Miner Res.* 2021;00(00):1–10.
8. Lv, D., Zou, Y., Zeng, Z., Yao, H., Ding, S., Bian, Y., et al. Comprehensive metabolomic profiling of osteosarcoma based on UHPLC-HRMS. *Metabolomics [Internet].* 2020;16(12):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01745-4>.
9. Fan, J., Jahed, V., Klavins, K. Metabolomics in bone research. *Metabolites.* 2021;11(7).
10. Barcik, J., Ernst, M., Buchholz, T., Constant, C., Mys, K., Epari, D.R., et al. The absence of immediate stimulation delays bone healing. *Bone [Internet].* 2023;175(April):116834. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2023.116834>.
11. Watford, M. Glutamine and glutamate: Nonessential or essential amino acids? *Anim Nutr [Internet].* 2015;1(3):119–122. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aninu.2015.08.008>.
12. Timblin, G.A., Tharp, K.M., Ford, B., Winchester, J.M., Wang, J., Zhu, S., et al. Mitohormesis reprogrammes macrophage metabolism to enforce tolerance. *Nat Metab [Internet].* 2021;3(5):618–635. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s42255-021-00392-w>.
13. Shang, M., Cappellesso, F., Amorim, R., Serneels, J., Virga, F., Eelen, G., et al. Glutamine Metabolism Controls Chondrocyte Identity and Function. *Dev Cell [Internet].* 2020;53(5):530–544.e8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.05.001>.

14. Indurkar, A., Choudhary, R., Rubenis, K., Nimbalkar, M., Sarakovskis, A., Boccaccini, A.R., et al. Amorphous Calcium Phosphate and Amorphous Calcium Phosphate Carboxylate: Synthesis and Characterization. *ACS Omega*. 2023;8(30):26782–26792.
15. Visan, A.I., Ristoscu, C., Popescu-Pelin, G., Sopronyi, M., Matei, C.E., Socol, G., et al. Composite drug delivery system based on amorphous calcium phosphate–chitosan: An efficient antimicrobial platform for extended release of tetracycline. *Pharmaceutics*. 2021;13(10).
16. Sun, R., Åhlén, M., Tai, C.W., Bajnóczi, É.G., de Kleijne, F., Ferraz, N., et al. Highly porous amorphous calcium phosphate for drug delivery and bio-medical applications. *Nanomaterials*. 2020;10(1):1–18.
17. Izumiya, M., Haniu, M., Ueda, K., Ishida, H., Ma, C., Ideta, H., et al. Evaluation of mc3t3-e1 cell osteogenesis in different cell culture media. *Int J Mol Sci*. 2021;22(14):1–12.
18. Walker, M.C., van der Donk, W.A. The many roles of glutamate in metabolism. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2016;43(2–3):419–430.
19. Salhotra, A., Shah, H.N., Levi, B., Longaker, M.T. Mechanisms of bone development and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2020;21(11):696–711. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-020-00279-w>.
20. Luginina, M., Orru, R., Cao, G., Luginina, M., Grossin, D., Brouillet, F., et al. First successful stabilization of consolidated amorphous calcium phosphate (ACP) by cold sintering: Toward highly-resorbable reactive bioceramics. *J Mater Chem B*. 2020;8(4):629–635.
21. Degli Esposti, L., Iafisco, M. Amorphous calcium phosphate, the lack of order is an abundance of possibilities. *Biomater Biosyst* [Internet]. 2022;5(December 2021):100037. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbiosy.2021.100037>.
22. Pei, Z., Lee, K.C., Khan, A., Erisnor, G., Wang, H.Y. Pathway analysis of glutamate-mediated, calcium-related signaling in glioma progression. *Biochem Pharmacol*. 2020;176.
23. Kariya, Y., Kariya, Y. Osteopontin in Cancer: Mechanisms and Therapeutic Targets. *Int J Transl Med*. 2022;2(3):419–447.

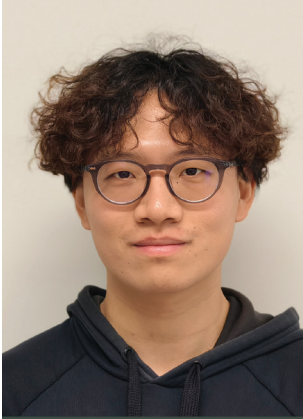
Pateicības

Pateicos Kristapam Kļaviņam par atbalstu mana promocijas darba izstrādē!

Pateicos Antonam Sizovam un *Sophie Verrier* par palīdzību dzīvnieku pētījuma datu iegūšanā!

Pateicos *Abhishek Indurkar* par palīdzību materiālu sintēzēs!

Pateicos Ilijana Kovrlija, Kristapam Rubenim, *Theresa Schiemer*, *Oznur Demir* un citiem, kas palīdzējuši šī pētījuma tapšanā!



Jingzhi Fan dzimis 1995. gadā Ķīnā, Liaoninas provincē. Pekīnas Ķīmijas tehnoloģijas universitātē ieguvis bakalaura grādu biomateriālos (2018), Dublinas Universitātes koledžā – maģistra grādu materiālzinātnē un inženierzinātnē (2019). Kopš 2020. gada studē Rīgas Tehniskās universitātes (RTU) doktorantūrā. 2021. gadā bijis *AO Research Institute Davos* viespētnieks. Patlaban ir RTU zinātniskais asistents. Pētniecības intereses saistītas ar biomedicīnas inženieriju un vielmaiņu.