RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE

Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte

Vispārīgās ķīmijas tehnoloģijas institūts

Līga STĪPNIECE

Doktora studiju programmas «Materiālzinātne» doktorante

(stud.apl.nr. 061RĶB049)

AR MAGNIJU MODIFICĒTU KALCIJA FOSFĀTU BIOKERAMIKAS IZSTRĀDE KAULAUDU REĢENERĀCIJAI

Promocijas darbs

Zinātniskās vadītājas:

Profesore *Dr. sc. ing.* L. BĒRZIŅA-CIMDIŅA

Vadošā pētniece *Dr. sc. ing.* K. ŠALMA-ANCĀNE

Rīga 2016

Promocijas darbs izstrādāts: Rīgas Tehniskās universitātes,
Vispārīgās ķīmijas tehnoloģijas institūtā.

Darba zinātniskās vadītājas:

Profesore *Dr. sc. ing*. Līga Bērziņa-Cimdiņa

Vadošā pētniece *Dr. sc. ing.* Kristīne Šalma-Ancāne

2016. gadā iesniegts aizstāvēšanai Rīgas Tehniskās universitātes
Materiālzinātnes apakšnozares Promocijas padomē P-18

PATEICĪBA

Visdziļākā pateicība promocijas darba zinātniskajām vadītājām profesorei *Dr. sc. ing.* Līgai Bērzņai-Cimdiņai un vadošajai pētniecei *Dr. sc. ing.* Kristīnei Šalmai-Ancānei ne vien par promocijas darbā izvirzīto mērķu sasniegšanai nepieciešamā teorētiskā pamata nodrošināšanu, padomiem un ieteikumiem darba pilnveidošanai, bet arī par nesavtīgu atbalstu un uzticību visā promocijas darba izstrādes laikā.

Paldies draudzīgajam RTU MLĶF Vispārīgās ķīmijas tehnoloģijas institūta kolektīvam par veiksmīgu sadarbību un atbalstu promocijas darba tapšanā. Īpašs paldies *Dr. sc. ing.* Jānim Ločam, *Dr. sc. ing.* Dagnijai Ločai, kas dalījās pieredzē, padomos un ieteikumos.

Paldies Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Šūnu transplantācijas centra kolektīvam un *Dr. Olafur E. Sigurjonsson* (Landspitali Universitātes slimnīca) par iespēju veikt mikrobioloģiskos pētījumus.

Sirsnīgs paldies par maniem tuviniekiem un draugiem par iedrošinājumu, neizsīkstošu sapratni, neizmērojamu atbalstu un līdzpārdzīvošanu darba tapšanas laikā.

ANOTĀCIJA

BIOKERAMIKA, MAGNIJS, DIVFĀŽU KALCIJA FOSFĀTI, HIDROKSILAPATĪTS, β-TRIKALCIJA FOSFĀTS

Promocijas darba ietvaros sintezēti kalcija fosfātu, t. sk. hidroksilapatīta, kalcija deficītā hidroksilapatīta un apatītiskā trikalcija fosfāta pulveri ar mainīgu magnija saturu, izmantojot modificētu suspensijas nogulsnēšanas metodi, un pētīta magnija satura ietekme uz iegūto pulveru fizikālķīmiskajām īpašībām. Pētīts ar magniju modificētu kalcija fosfātu prekursoru pulveru potenciāls blīvas un porainas biokeramikas izstrādei ar variējamu un reproducējamu ķīmisko un fāžu sastāvu. Pirmo reizi izgatavotas ar magniju modificēta hidroksilapatīta un β-trikalcija fosfāta porainās pamatnes, izmantojot *in situ* viskozas masas uzputošanas metodi. Iegūtajiem ar magniju modificētiem kalcija fosfātu produktiem pirms un pēc augsttemperatūras apstrādes raksturots ķīmiskais un fāžu sastāvs, molekulārā struktūra, morfoloģija un mikrostruktūra, kā arī analizēta magnija satura ietekme uz produktu termisko stabilitāti un saķepšanas procesiem, izmantojot plašu klāstu modernu pētniecības metožu.

Promocijas darbā veikti sistemātiski un kompleksi salīdzinoši pētījumi par magnija satura un hidroksilapatīta/β-trikalcija fosfāta fāžu attiecību kombināciju ietekmi uz biokeramikas bioloģiskajām īpašībām, realizējot *in vitro* bioaktivitātes testus simulētajā ķermeņa šķidrumā, kā arī novērtējot izstrādātās biokeramikas citotoksicitāti, t. i., šūnu atbildes reakciju.

Literatūras apskatā akcentēti aktuālākie sasniegumi kalcija fosfātu pētniecībā un ar magniju modificētu kalcija fosfātu biokeramikas potenciāls lietojumam kaulaudu reģenerācijai.

Promocijas darbs uzrakstīts latviešu valodā, tā apjoms 141 lpp. Darbā ir 48 attēli, 22 tabulas, un izmantotās literatūras saraksts ietver 224 literatūras avotus.

ANNOTATION

BIOCERAMIC, MAGNESIUM, BIPHASIC CALCIUM PHOSPHATES, HYDROXYLAPATITE, β-TRICALCIUM PHOSPHATE

Calcium phosphate bioceramics precursor powders of hydroxyapatite, calcium deficient hydroxyapatite and apatitic tricalcium phosphate containing various amounts of magnesium were synthesized through modified aqueous precipitation method. The influence of magnesium content on the physicochemical properties of the precursor powders was analysed. The potential of magnesium containing calcium phosphates precursor powders for preparation of dense and porous bioceramic with variable and reproducible chemical and phase composition were investigated. For the first time porous magnesium containing calcium phosphates, i.e., hydroxyapatite and β-tricalcium phosphate, bioceramic were formed by the ammonium hydrogen carbonate provided viscous slurry foaming. The chemical and phase composition, molecular structure, morphology and microstructure of obtained magnesium containing calcium phosphates products, as well as the influence of magnesium on the thermal stability and sintering processes were analysed using a wide range of advanced research methods.

For the first time systematic and complex studies of coherence between the various combinations of hydroxyapatite/β-tricalcium phosphate phase ratio and magnesium content on biological properties of calcium phosphate bioceramic were performed.

The most recent milestones in the research of calcium phosphates for biomedical applications as well as potential of magnesium containing calcium phosphates bioceramic for bone tissue regeneration applications are highlighted in the literature review.

The Doctoral thesis is written in the Latvian language, consist of 141 pages. The Doctoral Thesis has been illustrated by 48 figures and 22 tables. List of References comprises 224 information sources.

SAĪSINĀJUMI UN APZĪMĒJUMI

AAS	atomabsorbcijas spektrometrija
ACP	amorfs kalcija fosfāts
ap-TCP	apatītiskais trikalcija fosfāts
ATM	augsttemperatūras mikroskopija
ATP	adenoīn-50-trifosfāta
ATR	pavājināta pilnīgā atstarošanās
BET metode	Brunauera-Emeta-Tellera metode
BCP	divfāžu kalcija fosfāti
c	koncentrācija
Ca-ISE	kalcija jonu selektīvais elektrods
CaP	kalcija fosfāti
CDHAp	kalcija deficītais hidroksilapatīts
CHAp	karbonāthidroksilapatīts (A-CHAp - «A-tipa» CHAp; B-CHAp - «B-tipa» CHAp; AB-CHAp – «AB-tipa» CHAp)
D	kristalītu izmērs, nm
d_{BET}	daļiņu vidējais izmērs, nm
DCPA	dikalcija fosfāta anhidrīds
DCPD	dikalcija fosfāta dihidrāts
DMEM	*Dulbecco* modificēta *Eagle* šūnu kultūru barotne
de novo	no latīņu valodas: sākt no jauna
DTA	diferenciāltermiskā analīze
EDTA	etilēndiamīntetraetiķskābe
F	spiediena spēks
FBS	teļa augļa serums (angļu val.: *Fetal Bovine Serum*)
FDA	ASV Pārtikas un zāļu pārvalde (angļu val.: *US Food & Drugs Administration*)
LE-SEM	lauka emisijas skenējošā elektronu mikroskopija
FT-IS	Furjē transformāciju infrasarkanā spektroskopija
HAp	hidroksilapatīts
HEPE	N-2-hidroksietilpiperazīna-N'-2-etānsulfoskābe

in situ	dabisko dzīvotņu saglabāšana un dzīvotspējīgu populāciju uzturēšana un atveseļošana to dabiskajā vidē vai vidē, kurā attīstījušās to raksturīgās īpašības
in vitro	bioloģiskās studijas, kas veiktas ārpus dzīvā organisma, mākslīgā vidē
in vivo	bioloģiskās studijas, kas veiktas dzīvā organismā
ISO	Starptautiskās Standartizācijas organizācija (angļu val.: *International Organization for Standardization*)
MEM	*Harry Eagle* izstrādāta šūnu kultūru vide *Minimal Essential Medium*
MgP	magnija fosfāti
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds, tiazolilzilais
NHS	Nacionālais veselības dienests
NOF	Nacionālais Osteoporozes fonds
OCP	oktakalcija fosfāts
P_A	atvērtā porainība, %
pH_{beigu}	sintēzes suspensijas pH vērtība pēc stabilizācijas laika
P_K	kopējā porainība, %
PYC	piknometrija
RDA	rentgendifraktometrijas analīze
SĶŠ	simulētais ķermeņa šķidrums
SSA_{BET}	īpatnējais virsmas laukums
S_V	tilpuma lineārais sarukums, %
T	temperatūra, ^oC
TRIS	tris(hidroksimetil)aminometāns
TRIS-HCl	tris(hidroksimetil)aminometāna un sālsskābes buferšķīdums
V	tilpums
X_C	kristāliskuma pakāpe, %
α-TCP	α-trikalcija fosfāts
β-TCP	β-trikalcija fosfāts
$\rho_{šķ}$	šķietamais blīvums, g/cm^3

SATURS

SAĪSINĀJUMI UN APZĪMĒJUMI 6
SATURS 8
IEVADS 10
1. LITERATŪRAS APSKATS 18
1.1. CaP cilvēka organismā 19
1.2. CaP potenciāls biomedicīniskam lietojumam 24
1.2.1. Sintētiskie CaP biomedicīniskam lietojumam 25
1.2.2. HAp un β-TCP vispārīgs raksturojums 29
1.2.3. HAp un β-TCP strukturāls raksturojums 30
1.2.4. Ar izomorfiem aizvietotājiem modificēti CaP 32
1.2.4.1. Anjonaizvietoti CaP 32
1.2.4.2. Katjonaizvietoti CaP 34
1.3. Mg saturoši biomateriāli 37
1.3.1. Ar Mg modificētu CaP sintēze 39
1.3.2. Ar Mg modificētu CaP strukturāls raksturojums 41
1.4. Dzīvo audu un CaP biokeramikas mijiedarbība un tās novērtēšana 42
1.4.1. Mg ietekme uz CaP biokeramikas mijiedarbību ar dzīvajiem audiem 47
1.5. Mg loma cilvēka organismā 48
LITERATŪRAS APSKATA KOPSAVILKUMS 51
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA 52
2.1. Eksperimentālā darba shēma un izmantotais laboratorijas aprīkojums 52
2.2. Ar Mg modificētu CaP biokeramikas pamatņu izgatavošana 54
2.2.1. Ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursoru sintēze 54
2.2.1.1. Izejas suspensijas pagatavošana 56
2.2.1.2. Nogulsnēšanās reakcijas realizēšana 57
2.2.2. Ar Mg modificētu CaP biokeramikas pamatņu izgatavošana 57
2.2.2.1. Blīvu biokeramikas pamatņu izgatavošana 58
2.2.2.2. Porainu biokeramikas pamatņu izgatavošana 59
2.3. Sintēžu produktu fizikālķīmisko īpašību raksturošanai izmantotās metodes 59
2.3.1. Rentgenstaru pulverdifrakcija 59
2.3.2. Furjē transformāciju infrasarkanā spektroskopija 62
2.3.3. Lauka emisijas skenējošā elektronu mikroskopija 62
2.3.5. Atomabsorbcijas spektroskopija 63
2.3.6. Diferenciāltermiskā analīze 63
2.3.7. Augsttemperatūras mikroskopija 63
2.3.8. Piknometrija 63
2.3.9. N_2 sorbtometrija 64
2.3.10. Arhimēda metode 64
2.3.11. Dzīvsudraba porozimetrija 66

2.4. *In vitro* pārbaudes ... 67
2.4.1. Biokeramikas šķīdības pētījumi ... 67
2.4.2. Biokeramikas pētījumi simulētajā ķermeņa šķidrumā ... 68
2.4.3. Biokeramikas citotoksicitātes novērtēšana šūnu kultūrās ... 70
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS ... 71
3.1. Biokeramikas prekursoru pulveru raksturojums ... 71
3.1.1. Ķīmiskā, fāžu un molekulārā sastāva pētījumi ... 71
3.1.2. Morfoloģijas un īpatnējā virsmas laukuma pētījumi ... 76
3.1.3. Termiskās stabilitātes un saķepšanas procesa pētījumi ... 79
3.2. Biokeramikas fizikālķīmisko īpašību raksturojums ... 85
3.2.1. Ar Mg modificēta HAp biokeramikas fizikālķīmisko īpašību raksturojums ... 86
3.2.1.1. Ar Mg modificēta HAp biokeramikas fāžu un molekulārais sastāvs ... 86
3.2.1.2. Ar Mg modificēta HAp biokeramikas mikrostruktūra ... 88
3.2.2. Ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas fizikālķīmisko īpašību raksturojums ... 92
3.2.2.1. Ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas fāžu un molekulārais sastāvs ... 92
3.2.2.2. Ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas mikrostruktūra ... 95
3.2.3. Ar Mg modificētu BCP biokeramikas fizikālķīmisko īpašību raksturojums ... 99
3.2.3.1. Ar Mg modificētu BCP biokeramikas fāžu un molekulārais sastāvs ... 99
3.2.3.2. Ar Mg modificētu BCP biokeramikas mikrostruktūra ... 104
3.3. Biokeramikas *in vitro* pārbaudes ... 105
3.3.1. Šķīdība ... 105
3.3.2. *In vitro* bioaktivitāte simulētajā ķermeņa šķidrumā ... 110
3.3.3. Citotoksicitāte ... 112
SECINĀJUMI ... 118
CONCLUSIONS ... 120
IZMANTOTĀ LITERATŪRA ... 122

IEVADS

Saskaņā ar 2012. gada 15. decembrī medicīnas žurnālā «*The Lancet*» publicētajiem starptautisku ekspertu ziņojumiem, muskuloskeletālās sistēmas traucējumi ir otrs izplatītākais cēlonis invaliditātei globālā līmenī. Osteoporoze ir sistēmiska skeleta saslimšana, kurai ir raksturīga zema kaulu masa un kaulaudu mikroarhitektonikas bojājumi, kas izraisa pastiprinātu kaulu trauslumu un no tā izrietošu paaugstinātu lūzumu risku. Saskaņā ar Nacionālā veselības dienesta (*National Health Service,* NHS) datiem katru gadu Lielbritānijā osteoporoze izraisa aptuveni 230 000 kaulu lūzumu. Nacionālais Osteoporozes fonds (*National Osteoporosis Foundation*, NOF) norāda, ka osteoporoze ir sabiedrības veselības apdraudējums aptuveni 44 miljoniem ASV iedzīvotāju, t. i., 55 % cilvēku 50 un vairāk gadu vecumā. Latvijā aptuveni 160 000 sieviešu vecumā no 45 līdz 85 gadiem cieš no osteoporozes un tās izraisītajām komplikācijām. Apjomīgu kaulu lūzumu stabilizācija un osteoporotisku lūzumu ārstēšana ir būtiski izaicinājumi ortopēdijas jomā, tādēļ arvien jauni pētījumi ir vērsti uz inovatīvu sintētisku kaulu implantmateriālu izstrādi.

Kalcija fosfāti, īpaši hidroksilapatīts un β-trikalcija fosfāts, uzrādot lielisku bioloģisko saderību, bioaktivitāti vai biorezorbciju, raduši plašu pielietojumu biomedicīnas nozarē kā kaulu aizvietotājmateriāli. Tie tiek veiksmīgi izmantoti sejas un žokļu, rekonstruktīvajā ķirurģijā, zobārstniecībā un ortopēdijā porainu keramisku granulu vai metālisku implantu pārklājumu veidā. Variējot hidroksilapatīta un β-trikalcija fosfāta fāžu attiecības, iespējams iegūt divfāžu kalcija fosfātu biokeramiku ar kontrolējamu biorezorbcijas kinētiku un stimulējošu iedarbību uz jaunā kaula veidošanos.

Zinātniskās literatūras analīze liecina par pieaugošu interesi dažādu bioloģiski aktīvu elementu iekļaušanai sintētisko kalcija fosfātu biomateriālos medicīniskam lietojumam ar mērķi tuvināt to īpašības kaula minerālās komponentes, proti, bioloģiskā hidroksilapatīta īpašībām, tādējādi, uzlabojot biomateriāla saderību ar dzīvajiem audiem. Tomēr šādu modificētu materiālu pārākums, salīdzinot ar nemodificētiem kalcija fosfātiem, vēl nav pilnībā pierādīts. Izvirzīta hipotēze, ka daļēja kalcija aizvietošana ar magniju varētu ievērojami uzlabot kalcija fosfātu bioloģiskās īpašības. Sagaidāms, ka kalcija aizvietošanas ar magniju un kalcija fosfātu biorezorbējošo īpašību kombinācijas rezultātā, tiktu iegūts biomateriāls, kas implantēts organismā, pakāpeniski šķīstot, izdalītu magnija jonus, kam piedēvētas antiosteoporotiskas īpašības, kas veicinātu jaunā kaula augšanu un osteoporozes ārstēšanu.

Šis darbs tika aizsākts 2012. gadā ar mērķi izstrādāt alternatīvus multifunkcionālus kalcija fosfātu implantmateriālus osteoporozes skarto kaulaudu bojājumu novēršanai.

Promocijas darbam izvirzītais mērķis

Izstrādāt ar magniju modificētu kalcija fosfātu biokeramiku ar variējamu un reproducējamu fāžu un ķīmisko sastāvu kaulu defektu labošanai.

Promocijas darbam izvirzītie uzdevumi

1. Bastoties uz literatūras datiem, izstrādāt kalcija fosfātu sintēzes metodi ar magniju modificēta hidroksilapatīta, β-trikalcija fosfāta un divfāžu kalcija fosfātu biokeramikas iegūšanai laboratorijas apstākļos.
2. Veikt kalcija fosfātu biokeramikas prekursoru pulveru – hidroksilapatīta, kalcija deficītā hidroksilapatīta un apatītiska trikalcija fosfāta sintēžu sērijas, sistemātiski mainot magnija jonu avota koncentrāciju sintēzes vidē.
3. Novērtēt mainīgā magnija satura ietekmi uz sintezētu un augsttemperatūrā apstrādātu kalcija fosfātu produktu fizikālķīmiskajām īpašībām un biokeramikas potenciālo bioaktivitāti.
4. Vadoties pēc literatūras datiem un eksperimentālajiem rezultātiem, izvērtēt kalcija fosfātu biokeramikas optimālo magnija saturu un fāžu sastāvu izmantošanai kaulaudu reģenerācijai.

Aizstāvamās tēzes:

1. Kalcija fosfātu – hidroksilapatīta, divfāžu kalcija fosfātu un β-trikalcija fosfāta, modificēšana ar magniju līdz 1 % (masas) izmaina iegūtās biokeramikas mikrostruktūru un šķīdību, kas savukārt atspoguļojas *in vitro* bioaktivitātē dzīvam organismam pietuvinātos apstākļos.
2. Kalcija atomu aizvietošana ar magnija atomiem kalcija fosfātu kristāliskajā struktūrā sekmē magnija jonu izdalīšanos, nodrošinot iegūtās biokeramikas variējamu biorezorbciju fizioloģiskos apstākļos un pastiprinot šūnu aktivitāti un dzīvotspēju.

Promocijas darba zinātniskā nozīmība un novitāte

1. Pirmo reizi sistemātiski un kompleksi pētītas un izvērtētas sakarības starp magnija saturu un kalcija fosfātu fāžu sastāvu, fizikālķīmiskajām un bioloģiskajām īpašībām.

2. Pirmo reizi, izmantojot *in situ* viskozas masas uzputošanas metodi, kā poru veidojošo aģentu lietojot amonija hidrogēnkarbonātu un keramikas masas plastifikatoru – glicerīnu, no ķīmiskās šķīduma nogulsnēšanas reakcijā sintezētiem, dažādā koncentrācijā magniju saturošiem hidroksilapatīta un apatītiskā trikalcija fosfāta pulveriem pagatavotas porainas biokeramikas pamatnes.

Promocijas darba praktiskā nozīmība

Izstrādāta relatīvi vienkārša, ekonomiska un videi draudzīga metode, kas piemērota ar magniju modificētu kalcija fosfātu ar variējamu un reproducējamu fāžu un ķīmisko sastāvu iegūšanai potenciālam lietojumam kaulu defektu labošanā.

Darba aprobācija

Promocijas darba zinātniskie sasniegumi un galvenie rezultāti atspoguļoti 15 pilna teksta zinātniskās publikācijās, kā arī par tiem ziņots 27 starptautiskās zinātniskās konferencēs (32 recenzētas zinātniskās konferenču tēzes).

Pilna teksta zinātnisko publikāciju saraksts

1. Šalma-Ancāne, K., Stīpniece, L., Borodajenko, N., Jakovļevs, D., Bērziņa-Cimdiņa, L. Incorporation of Magnesium Ions into Synthetic Hydroxyapatite: Synthesis and Characterization. *Key Engineering Materials*, **2012**, Vol. 527, pp. 26–31.
2. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K., Jakovļevs, D., Borodajenko, N., Bērziņa-Cimdiņa, L. The Study of Magnesium Substitution Effect on Physicochemical Properties of Hydroxyapatite. *Scientific Journal of RTU: Materials Sciences and Applied Chemistry*. **2013**, Vol. 28, pp. 51–57.
3. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K., Borodajenko, N., Sokolova, M., Jakovļevs, D., Bērziņa-Cimdiņa, L. Characterization of Mg-substituted Hydroxyapatite Synthesized by Wet Chemical Method. *Ceramics International*, **2014**, Vol. 40, Iss. 2, pp. 3261–3267.
4. Šalma-Ancāne, K., Stīpniece, L., Irbe, Z., Sokolova, M., Krieķe, G., Bērziņa-Cimdiņa, L. Effect of Mg content on thermal stability of β-tricalcium phosphate ceramics. *Key Engineering Materials,* **2014**, Vol. 604, pp. 192–195.
5. Šalma-Ancāne, K., Stīpniece, L., Ločs, J., Lakevičs, V., Irbe, Z., Bērziņa-Cimdiņa, L. The influence of biogenic and synthetic starting materials on the properties of porous hydroxyapatite bioceramics. *Key Engineering Materials,* **2014**, Vol. 614, pp. 11–16.

6. Šalma-Ancāne, K., Stīpniece, L., Putniņš, A., Bērziņa-Cimdiņa, L. Development of Mg-Containing Porous β-Tricalcium Phosphate Scaffolds for Bone Repair. *Ceramics International*, **2015**, Vol. 41, Iss. 3, Part B, pp. 4996–5004.
7. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K., Putniņš, A., Bērziņa-Cimdiņa, L. Evaluation of Sr- and/or Mg-containing Hydroxyapatite Behavior in Simulated Body Fluid. *Key Engineering Materials*, **2015**, Vol. 631, pp. 61–66.
8. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K., Loča, D., Pastare, S. Synthesis of Strontium Substituted Hydroxyapatite through Different Precipitation Routes. *Key Engineering Materials*, **2016**, Vol. 674, pp. 3–8.
9. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K., Narkevica, I., Juhņeviča, I., Bērziņa-Cimdiņa, L. Fabrication of Nanostructured Composites based on Hydroxyapatite and ε-Polylysine. *Materials Letters*, **2016**, Vol. 163, pp. 65–68.
10. Stīpniece, L., Narkevica, I., Sokolova, M., Ločs, J., Ozoliņš, J. Novel scaffolds based on hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol) nanocomposite coated porous TiO_2 ceramics for bone tissue engineering. *Ceramics International*, **2016**, Vol. 42, pp. 1530–1537.
11. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K., Rjabovs, V., Juhņeviča, I., Turks, M., Narkevica, I., Bērziņa-Cimdiņa, L. Development of Functionalized Hydroxyapatite/Poly(vinyl alcohol) Composites. *Journal of Crystal Growth*, **2016**, Vol. 444, pp. 14–20.
12. Šalma-Ancāne, K., Stīpniece, L., Irbe, Z. Effect of biogenic and synthetic starting materials on the structure of hydroxyapatite bioceramics. *Ceramics International*, **2016**, Vol. 42, Iss. 8, pp. 9504–9510.
13. Stīpniece, L., Narkevica, I., Šalma-Ancāne, K., Loča, D. Sr- and/or Mg- containing nanocrystalline hydroxyapatite: study from synthesis to calcined products. *Key Engineering Materials*, **2016,** Vol. 721, pp. 167–171.
14. Robinson, L., Šalma-Ancāne, K., Stīpniece, L., Meenan, B. J., Boyd, A. R. The deposition of strontium and zinc co-substituted hydroxyapatite coatings. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **2016**. (Iesniegta; *ID: JMSM-D-16-00530*).
15. Stīpniece, L., Narkevica, I., Šalma-Ancāne, K. Low temperature synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite: effect of Mg and Sr content. *Journal of the American Ceramic Society*, **2016**. (Pieņemta publicēšanai).

Ziņojumi starptautiskās konferencēs:

1. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K., Borodajenko, N., Jakovļevs, D., Krieķe, G., Bērziņa-Cimdiņa, L. Influence of Mg-Substitution on the Characteristics of Hydroxyapatite Powders. *Riga Technical University 53rd International Scientific Conference: Dedicated to the 150th Anniversary and the 1st Congress of World Engineers and Riga Polytechnical Institute / RTU Alumni: Section: Material Science and Applied Chemistry*, Latvija, Rīga, 11.–12. oktobris, **2012**. *(Stenda referāts).*
2. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K., Borodajenko, N., Jakovļevs, D., Bērziņa-Cimdiņa, L. Synthesis and Characterization of Magnesium-Substituted Hydroxyapatite. *ECERs Second International Conference for Students and Young Scientists on Material Processing Science*, Gruzija, Tbilisi, 10.–13. oktobris, **2012**. *(Mutiskais referāts).*
3. Šalma-Ancāne, K., Dubņika, A., Stīpniece, L., Sokolova, M., Borodajenko, N. Synthesis Methodology and Investigation of Calcium Phosphate Biomaterials for Bone Tissue Replacement in Regenerative Medicine. *Symposium «Bioceramics and Cells for Reinforcement of Bone»*, Latvija, Rīga, 18.–20. oktobris, **2012**. *(Stenda referāts).*
4. Šalma-Ancāne, K., Stīpniece, L., Borodajenko, N., Jakovļevs, D., Krieķe, G., Bērziņa-Cimdiņa, L. Mg-Substituted Hydroxyapatite Bioceramics: Formation and Properties. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien*, Vācija, Hamburga, 1.–3. novembris, **2012**. *(Stenda referāts).*
5. Šalma-Ancāne, K., Stīpniece, L., Borodajenko, N., Jakovļevs, D., Bērziņa-Cimdiņa, L. Processing and Characterization of Magnesium Containing β-Tricalcium Phosphate Ceramics. *13th International Conference of the European Ceramic Society (ECERS 2013)*, Francija, Limoges, 23.–27. jūnijs, **2013**. *(Stenda referāts).*
6. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K., Ločs, J., Jakovļevs, D., Bērziņa-Cimdiņa, L. Control of Hydroxyapatite/Beta-Tricalcium Phosphate Ratio of Mg-Substituted Biphasic Calcium Phosphate. *Nano and Advanced Materials Workshop and Fair (NAMF 2013)*, Polija, Varšava, 16.–19. septembris, **2013**. *(Stenda referāts).*
7. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K., Ločs, J., Krieķe, G., Bērziņa-Cimdiņa, L. Preparation and Characterisation of Magnesium-substituted Calcium Phosphate Bioceramics. *Riga Technical University 54th International Scientific Conference: Section: Material Science and Applied Chemistry*, Latvija, Rīga, 14.–16. oktobris, **2013**. *(Mutiskais referāts).*

8. Šalma-Ancāne, K., Stīpniece, L., Ločs, J., Lakevičs, V., Bērziņa-Cimdiņa, L. The influence of biogenic and synthetic starting materials on the properties of porous hydroxyapatite bioceramics. *25th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (BIOCERAMICS 25),* Rumānija, Bukareste, 7.–10. novembris, **2013**. *(Mutiskais referāts).*
9. Šalma-Ancāne, K., Stīpniece, L., Krieķe, G., Sokolova, M., Bērziņa-Cimdiņa, L. Effect of Mg Content on Thermal Stability of β-Tricalcium Phosphate Ceramics. *22nd International Baltic Conference of Engineering Materials & Tribology (Baltmattrib 2013)*, Latvija, Rīga, 14.–15. novembris, **2013**. *(Mutiskais referāts).*
10. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K., Ločs, J., Putniņš, A., Bērziņa-Cimdiņa, L. Influence of various Mg contents on characteristics of porous β-tricalcium phosphate ceramic. *Scandinavian Society for Biomaterials 7th conference (ScSB 2014)*, Dānija, Orhūsa, 26.–28. marts, **2014**. *(Stenda referāts).*
11. Šalma-Ancāne, K., Stīpniece, L., Putniņš, A., Ločs, J., Bērziņa-Cimdiņa, L. Porous β-tricalcium Phosphate Scaffolds with Sustained Therapeutic Mg Ions Release. *13th European Symposium on Controlled Drug Delivery 2014 (ESCDD 2014)*, Nīderlande, Egmond aan Zee, 16.–18. aprīlis, **2014**. *(Stenda referāts).*
12. Putniņš, A., Ločs, J., Šalma-Ancāne, K., Stīpniece, L. Degradation Behaviour of Designed Sr, Mg and Non-Substituted Hydroxyapatite Granules. *The 12th Junior Euromat Conference (Junior EuroMAT)*, Šveice, Lausanne, 21.–25. jūlijs, **2014**. *(Stenda referāts).*
13. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K., Bērziņa-Cimdiņa, L. Comparison of Sr-substituted Hydroxyapatite Obtained of Various Precursors through Neutralization Reaction: Characterisation at the Bulk and Particle Leve *(stenda referāts)*; Šalma-Ancāne, K., Stīpniece, L., Bērziņa-Cimdiņa, L. Low Temperature Aqueous Precipitation of Nanocrystalline Hydroxyapatite *(stenda referāts). 26th Annual Conference European Society for Biomaterials (ESB 2014)*, Lielbritānija, Liverpūle, 31. augusts–3. septembris, **2014**.
14. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K., Rjabovs, V., Putniņš, A., Juhņeviča, I., Turks, M., Bērziņa-Cimdiņa, L. Development of Hydroxyapatite/Poly(Vinyl Alcohol) Nanostructured Composites. *Riga Technical University 55th International Scientific Conference*, Latvija, Rīga, 14.–17. oktobris, **2014**. *(Mutiskais referāts).*

15. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K., Putniņš, A., Narkevica, I., Bērziņa-Cimdiņa, L. Evaluation of Sr- and/or Mg-containing Hydroxyapatite Bahaviour in Simulated Body Fluid *(stenda referāts)*; Šalma-Ancāne, K., Stīpniece, L., Sokolova, M., Branka, M., Loča, D., Bērziņa-Cimdiņa, L. Preparation and Characterization of Sr and Mg Containing Hydroxyapatite-Poly(Vinyl Alcohol) Microspheres for Clinical Application *(mutiskais referāts)*. *26th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (BIOCERAMICS 26)*, Spānija, Barselona, 6.–8. novembris, **2014**.
16. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K. Preparation and characterization of Sr-containing calcium phosphates *(stenda referāts)*; Šalma-Ancāne, K., Stīpniece, L., Ločs, J., Rjabovs, V., Bērziņa-Cimdiņa, L. Modified poly(vinyl alcohol)/hydroxyapatite microspheres for bone tissue engineering *(stenda referāts)*. *Unified scientific approaches towards regenerative orthopaedics and dentistry (REDEOR 2015)*, Itālija, Venēcija, 25.–27. marts, **2015**.
17. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K., Rjabovs, V., Bērziņa-Cimdiņa, L. Tailoring the Degradation of Hydroxyapatite/Poly-(Vinyl Alcohol) Composites *(mutiskais referāts)*. Šalma-Ancāne, K., Stīpniece, L., Vojevodova, A., Narkevica, I., Bērziņa-Cimdiņa, L. Design of Multifunctional Micro-Granules based on Sr-Substituted Hydroxyapatite and Poly-(Vinyl Alcohol) *(stenda referāts)*. *Scandinavian Society for Biomaterials 8th conference (ScSB 2015)*, Latvija, Sigulda, 6.–8. maijs, **2015**.
18. Šalma-Ancāne, K., Stīpniece, L., Ločs, J., Rjabovs, V., Bērziņa-Cimdiņa, L. Modified poly(vinyl alcohol)-hydroxyapatite microspheres for bone tissue engineering. *European Symposium and Exhibition on Biomaterials and related areas (Euro BioMAT 2015)*, Vācija, Veimāra, 21.–22. aprīlis, **2015**. *(Mutiskais referāts).*
19. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K., Sigurjonsson, E.O., Ločs, J., Preparation and in vitro evaluation of Mg-susbtituted biphasic calcium phosphate bioceramics for bone tissue engineering. *14th International Conference of the European Ceramic Society (ECERS 2015),* Spānija, Toledo, 21.–25. jūnijs, **2015**. *(Mutiskais referāts).*
20. Rjabovs, V., Stīpniece, L., Juhņeviča, I., Narkevica, I., Šalma-Ancāne, K., Bērziņa-Cimdiņa, L., Turks, M. Microstructured Polymer/Hydroxyapatite Composite Materials. *19th European Symposium of Organic Chemistry (ESOC 2015)*, Portugāle, Lisabona, 12.–16. jūlijs, **2015**. *(Stenda referāts).*
21. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K., Loča, D. Influence of Strontium on the Synthesis and Degradation Behaviour of Biphasic Calcium Phosphate Ceramics *(stenda referāts)*; Šalma-Ancāne, K., Stīpniece, L., Narkevica, I. Development of Nanostructured Composites Based

on ε-Polylysine and Apatite *(mutiskais referāts)*. *27th European Conference on Biomaterials (ESB 2015)*, Polija, Krakova, 30. augusts–3. septembris, **2015**.

22. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K., Loča, D. Synthesis and Characterization of Divalent Cation Substituted Calcium Phosphates. *11th Conference for Young Scientists in Ceramics*, Serbija, Novi Sad, 21.–24. oktobris, **2015**. (*Mutiskais referāts).*
23. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K., Loča, D., Pastare, S. Synthesis of strontium substituted hydroxyapatite through different precipitation routes. *24th International Baltic Conference ENGINEERING MATERIALS & TRIBOLOGY BALTMATTRIB 2015*, Igaunija, Tallina, 5.–6. novembris, **2015**. *(Mutiskais referāts).*
24. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K., Ločs, J., Sigurjonsson, O. E. Mg containing biphasic calcium phsophate bioceramics: preparation and *in vitro* evaluation *(stenda referāts)*. Narkevica, I., Stīpniece, L., Ozoliņs, J. Hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol) nanocomposite coated TiO_2 scaffolds for bone tissue engineering *(stenda referāts)*. *40th International Conference nd Exposition on Advanced Ceramics and Composites*, ASV, Daytona Beach, 24.–29. janvāris, **2016**.
25. Stīpniece, L., Vecstaudža, J., Zālīte, V., Šalma-Ancāne, K., Loča, D., Bērziņa-Cimdiņa, L. Kalcija fosfātu dizains un sintēzes optimizācija biomedicīniskam pielietojumam *(stenda referāts).* Sokolova, M., Stīpniece, L., Vojevodova, A., Mirošņikovs, A., Šalma-Ancāne, K., Ločs, J., Bērziņa-Cimdiņa, L. Bionoārdāmi kompozītmateriāli uz polimēru un kalcija fosfātu bāzes medicīniskam pielietojumam: izstrādes tehnoloģijas un raksturojums *(stenda referāts)*. *LU CFI 32.zinātniskā konference*, Latvija, Rīga, 17.–19. februāris, **2016**.
26. Stīpniece, L., Šalma-Ancāne, K., Narkevica, I., Rjabovs, V. Development of hydroxyapatite/modified poly(vinyl alcohol) composites for bone tissue engineering. *9th annual meeting of the Scandinavian Society for Biomaterials*, Īslande, Reijkjavīka, 1.–3. jūnijs, **2016**. *(Stenda referāts).*
27. Stīpniece, L., Narkevica, I., Šalma-Ancāne, K., Bērziņa-Cimdiņa, L. Development and characterization of Mg-containing hydroxyapatite, β-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate bioceramics *(stenda referāts)*. Narkevica, I., Stīpniece, L., Ozoliņš, J. Design and characterization of hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol) nanocomposite coated titania scaffolds for bone repair *(stenda referāts)*. *Eighteenth annual conference YUCOMAT 2016*, Melnkalne, Herceg Novi, 5.–10. septembris, **2016**.

1. LITERATŪRAS APSKATS

Slimi un bojāti organisma audi, t. sk. kauli, vienmēr ir bijusi globāla problēma. Līdz ar to nepieciešamība pēc materiāliem cilvēku dzīves kvalitātes uzlabošanai nepārtraukti rada pieprasījumu pēc inovatīvu un funkcionālu biomateriālu izstrādes ar specifiskām īpašībām audu patoloģiju profilaksei, ārstēšanai un reģenerācijai. Cilvēku populācijai novecojot, tiek prognozēts, ka tuvākajā nākotnē 30 % slimnīcu pacientu būs diagnosticēta saslimšana ar osteoporozi. Statistikas dati liecina, ka 20 % osteoporozes pacientu, kas cietuši no osteoporotiskiem kaulu lūzumiem mirst pirmajā gadā pēc veiktās operācijas [1]. Šie fakti apstiprina, ka joprojām ir akūta nepieciešamība pēc inovatīvām slimo un bojāto kaulu ārstniecības metodēm. Pēdējo desmitgažu laikā ir novērota pārsteidzoša attīstība inovatīvu implantmateriālu izstrādē. Starp šiem materiāliem biokeramiskiem implatmateriāliem ir īpaša nozīme.

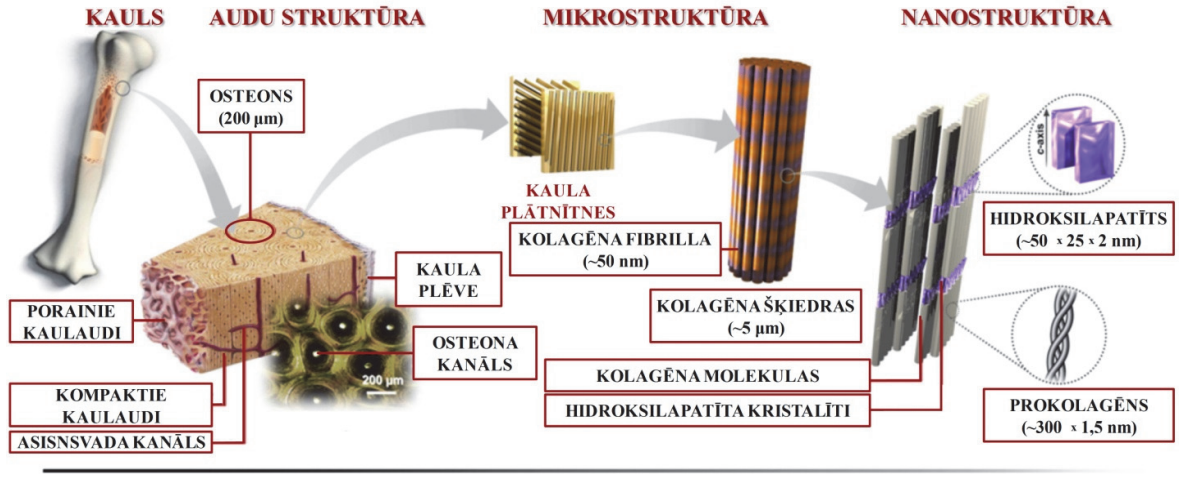
Biokeramikai ir izvirzīti šādi priekšnoteikumi: ķīmiskā stabilitāte organismā, bioloģiskā saderība un prognozējama biorezorbcija [2]. Biokeramikas plašās izmantošanas iespējas medicīnas jomā veicinājušas daudzu pētījumu attīstību. Tomēr, neskatoties uz plašajiem pētījumiem, zinātne joprojām ir tālu no tādu materiālu izstrādes, kas varētu tikt izmantoti, lai pilnībā aizstātu dabiskos audus. No biokeramikas materiāliem vislielāko uzmanību izpelnījušies kalcija fosfāti (CaP), pateicoties to potenciālam izmantošanā cieto audu, t. i., kaulu un zobu labošanā [3-5]. CaP, t. sk. hidroksilapatīta (HAp) un β-trikalcija fosfāta (β-TCP), kā arī divfāžu kalcija fosfātu (BCP), kas satur HAp un β-TCP, biokeramikai piemīt lieliska bioloģiskā saderība, bioaktivitāte un/vai biorezorbcija, kā arī osteokonduktivitāte, pateicoties šo materiālu ķīmiskajai un strukturālajai līdzībai ar kaulu minerālās fāzes pamatkomponenti, proti, bioloģisko HAp. Turklāt, ņemot vērā, ka cilvēku kaula sastāvā ir ~65 % CaP minerālu, sintētiski CaP biomateriāli tiek uzskatīti par optimālu izvēli bojātu kaulu labošanai, pateicoties to salīdzinoši vienkāršām un ekonomiski izdevīgām izgatavošanas metodēm, kā arī iespējai tos viegli virzīt klīniskai izmantošanai [1].

Literatūras apskatā akcentēti aktuālākie sasniegumi CaP pētniecībā un magniju (Mg) saturošas CaP biokeramikas potenciāls biomedicīniskam lietojumam. Tiek prognozēts, ka ar Mg aizvietoti CaP produkti nodrošinātu efektīvāku defektētā kaula atveseļošanos, pateicoties to uzlabotai biorezorbcijas spējai organismā un pakāpeniskai, terapeitisku (Mg^{2+}) jonu atbrīvošanai.

1.1. CaP cilvēka organismā

Kalcijs (Ca) ir visizplatītākais minerālelements cilvēka organismā. Savienojumos ar fosfāta anjoniem (PO_4^{3-}) tas veido dažādus CaP sāļus. 99 % no organismā esošā Ca, fosfātu sāļu veidā, atrodas skeletā, galvenokārt kaulos un zobos.

Kauls ir izturīgs, heterogēns kompozītmateriāls, kurš sastāv no organiskiem un neorganiskiem savienojumiem. Galvenā kaulu neorganiskā jeb minerālā komponente ir CaP klases pārstāvis - bioloģiskais HAp, savukārt organiskā – kolagēns. Kaula hierarhiskā struktūra no makro- līdz nano- līmenim parādīta 1.1. attēlā.



1.1. att. Kaula hierarhiskā struktūra [6]

Kaulaudus iedala kompaktajos jeb blīvajos (kortikālie kauli) un porainajos jeb sūkļveida (trabekulārie kauli) kaulaudos. Kompaktie kaulaudi sastāda ~80 % no kopējās skeleta masas un atrodas kaula ārējā daļā. Savukārt porainie kaulaudi veido kaula iekšējo daļu, sastādot ~20 % no skeleta masas. Kauls ir būvēts no osteoniem, kas ir mikroskopiskas koncentrisku kaula plātnīšu kolonnas ar dobu kanālu vidusdaļā (*Haversa* kanāls), kurā izvietojušies asinsvadi un nervi. Kaula plātnītes ir formētas no kolagēna šķiedrām. Kaulā, trim kolagēna molekulām savijoties spirālē, tiek veidotas šķiedrās sakārtotās prokolagēna molekulas. Starp kolagēna šķiedrām izgulsnējas CaP sāļi, t.i, plākšņveida vai adatveida nanoizmēra (~50 x 25 x 2 nm^3) HAp kristalīti. Kolagēns kopā ar minerālvielām nodrošina kaula mehānisko izturību. Organiskā komponente jeb kolagēns piešķir kaulam elastību. Neorganiskā komponente jeb bioloģiskais HAp piešķir kaulam cietību [7, 8].

Pirms vairākiem gadu desmitiem zinātnieks *de Jong* novēroja strukturālas līdzības starp sintētisku minerālu – HAp ar ķīmisko formulu $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ - un kaulu minerālo komponenti, izmantojot rentgendifraktometriju (RDA) [9]. Zinātnei attīstoties, pierādīts, ka sintētisks stehiometrisks HAp un kaulu minerālā komponente jeb bioloģiskais HAp savstarpēji atšķiras ķīmiskā sastāva, kristāliskuma pakāpes, kā arī stehiometrijas ziņā. Stehiometriska HAp Ca/P molārā attiecība ir 1,67. Cilvēka dzīves laikā lietotais uzturs būtiski ietekmē bioloģiskā HAp Ca/P molāro attiecību, kas var variēt robežās no 1,37 līdz 1,77, mikroelementu jonapmaiņas rezultātā [10, 11]. Būtiskākās cilvēka kaula ķīmisko sastāvu veidojošās komponentes uzskaitītas 1.1. tabulā.

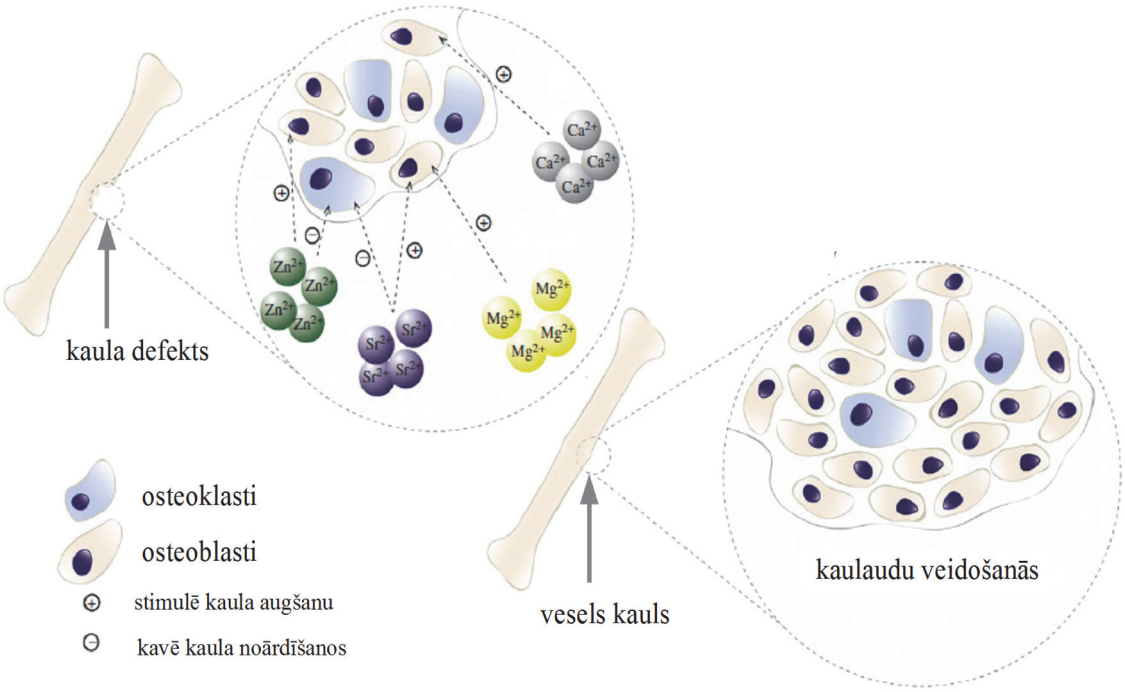
1.1. tabula

Kaula ķīmiskais sastāvs [3]

Elements	**Ca**	**P**	**CO_2**	**Na**	**K**	**Mg**	**Sr**	**Cl**	**F**	**Zn**	**Cr**	**Mn**	**Si**
***c*, % (masas)**	36,60	17,10	4,80	1,00	0,07	0,60	0,05	0,13	0,10	0,04	$0{,}33 \times 10^{-4}$	$0{,}17 \times 10^{-4}$	0,05
Kopējā neorganiskā daļa, % (masas)							~65,0						
Kopējā organiskā daļa, % (masas)							~25,0						
Absorbētais H_2O							~10,0						

Bioloģiskā HAp struktūrā bez HAp pamatelementiem, t. i., Ca, fosfātgrupām $[PO_4]$ un hidroksilgrupām [OH], salīdzinoši augstā koncentrācijā sastopami arī tādi elementi un piemaisījumi kā karbonātgrupas $[CO_3]$, nātrijs (Na), magnijs (Mg), fluors (F), hlors (Cl), kā arī mikroelementi relatīvi zemā koncentrācijā, piemēram, kālijs (K), silīcijs (Si), stroncijs (Sr), cinks (Zn) u.c. Tādējādi, bioloģiskā HAp ķīmisko formulu var pierakstīt sekojoši - $(Ca,M)_{10}(PO_4,Y)_6(OH,X)_2$, kur M apzīmē katjonus, t. sk. (Mg^{2+}), (Na^{+}), (K^{+}), (Sr^{2+}), (Ba^{2+}) u.c., Y apzīmē (CO_3^{2-}), (HPO_4^{2-}), (SiO_4^{3-}), (SO_4^{2-}) un X – (F^{-}), (Cl^{-}), (CO_3^{2-}) u.c. anjonus [12]. Minētie mikroelementi organismā pilda svarīgas funkcijas, ietekmējot kaulu virmas ķīmiju un nodrošinot kaulu bioloģisko aktivitāti [13, 14]. Ķīmisko elementu bioloģiskā loma cilvēka organismā ir ļoti daudzveidīga. Makroelementu galvenā funkcija ir audu veidošana, pastāvīga osmotiskā spiediena, jonu un skābju-bāzu sastāva uzturēšana. Mikroelementi, kas ietilpst fermentu, hormonu, vitamīnu un citu bioloģiski aktīvo vielu sastāvā, piedalās vielmaiņā,

vairošanās procesos, audu elpošanā, toksisku vielu neitralizēšanā. Dabīgā kaula sastāvā ietilpstošo metālisko elementu bioloģiskās funkcijas organismā uzskaitītas 1.2. tabulā, savukārt dažādu katjonu loma kaulaudu veidošanās procesā shematiski attēlota 1.2. attēlā [14].



1.2. att. Metālisko jonu ietekme uz kaulaudu veidošanos [14]

1.2. tabula

Dabīgajā kaulā sastopamo metālisko elementu svarīgākās funkcijas organismā un to bioloģiskā loma

Elements	Funkcijas un bioloģiskā loma	Avots
Kalcijs (Ca)	~99% no dzīvā organismā esošā Ca ir akumulēts cietajos audos, t. i., kaulos un zobos, savienojumā ar (PO_4^{3-}) joniem veidojot bioloģisko HAp. (Ca^{2+}) jonu transports citoplazmā, t. i., (Ca^{2+}) joniem šķērsojot starpšūnu telpu, dod signālus šūnu procesiem. (Ca^{2+}) jonu eksocitoze[1] darbojas kā neiromediators muskuļu kontrakcijām. Optimāla starpšūnu (Ca^{2+}) jonu koncentrācija palīdz kontrolēt neirīta jeb aksona augšanu. (Ca^{2+}) joni stimulē kaulu šūnu vairošanos, osteoblastu proliferāciju, kaulaudu vielmaiņas procesus un to mineralizāciju. Ca uzlabo augšanas faktoru (*IGF-I* un *IGF-II*) darbību, kas regulē cilvēku osteoblastu proliferāciju, ekspresiju.	[15–17]
Nātrijs (Na)	Na nodrošina normālu muskuļu šūnu kairinājumu, piedalās skābju–bāzu līdzsvara saglabāšanā, sirdsdarbības regulēšanā (nomierinoša iedarbība), aiztur ūdens izvadīšanu no organisma.	[18]
Kālijs (K)	(K^+) joni piedalās muskuļu (īpaši sirds muskuļu) normālā funkcionēšanā, nervu impulsu vadīšanā, apmaiņas reakcijās, veicinot lieko (Na^+) jonu izvadīšanu, atbrīvojot organismu no liekā ūdens un likvidējot asinsizplūdumus. (K^+) joni pārsvarā sastopami šūnu iekšienē, kur pilda fermentu aktivatoru funkciju. (K^+) joni regulē vielmaiņas procesus.	[19]
Hroms (Cr)	Cr darbojas kā koenzīms, stimulējot insulīna darbību.	[20]
Magnijs (Mg)	Mg galvenokārt palīdz aktivēt tos enzīmus, kuri piedalās fosfātgrupu šķelšanas un transportēšanas procesā, lai veidotos adenoīn-50-trifosfāts[2] (ATP).	[21–23]

[1]Eksocitoze ir veids, kādā šūnas izdala vielas. Transporta vezikulas saplūst ar plazmas membrānu, bet to saturs nokļūst šūnu ārpusē.
[2]ATF ir nukleotīds ar ļoti lielu nozīmi dzīvo organismu vielmaiņā. Tas ir universāls enerģijas avots organismos noritošajiem bioķīmiskajiem procesiem.

Elements	Funkcijas un bioloģiskā loma	Avots
	Mg piedalās dažādu organismā notiekošo ķīmisko reakciju norisē, palīdzot pareizi darboties šajās reakcijās iesaistītajiem enzīmiem. Mg stimulē kaulaudu veidošanos.	
Mangāns (Mn)	Mn ir kofaktors ļoti plašam fermentu klāstam (transferāzēm, hidrolāzēm, liāzēm, izomerāzēm, ligāzēm, integrīniem, glutamīnu sintetāzēm u.c.). Būtiska loma superoksīdu brīvo radikāļu detoksikācijā.	[24]
Stroncijs (Sr)	Sr fizikāli un ķīmiski ir līdzīgs Ca, un tas galvenokārt ir akumulējies skeletā, pārsvarā jaunajos trabekulārajos (porainajos) kaulos un atkarībā no skeleta vietas tā daudzums var atšķirties. Sr daudzums jaunos kompaktajos (blīvajos) kaulaudos ir daudzkārt augstāks kā novecojušos kaulaudos. Optimālā (Sr^{2+}) jonu koncentrācija stimulē kaulaudu veidošanos. Paaugstināta (Sr^{2+}) jonu koncentrācija negatīvi ietekmē kaula mineralizācijas procesus, samazinot (Ca^{2+}) jonu uzsūkšanos un, iespējams, izmainot kaula minerālās komponentes īpašības. Sr veicina kaulveides procesu un kavē kaula noārdīšanās procesus, kas noved pie kaula masas pieauguma un līdz ar to kaula mehānisko īpašību uzlabošanās. Sr veicina osteoblastu diferencēšanos un funkcijas, kavē osteoklastu diferencēšanos un aktīnu mikrofilamentu sabrukšanu.	[25–27]
Cinks (Zn)	Zn kaulu vielmaiņas procesā ir saistīts ar augšanas hormoniem - *GH* vai *IGF-I*. Zn veicina nervaudu atjaunošanos. Zn stimulē kaulveides procesu, veicinot osteoblastu diferencēšanos. Zn piemīt antibakteriāls efekts. Zn kavē baktēriju koloniju veidošanos un uzlabo brūču dzīšanu.	[28–33]

Skeleta sistēma ne tikai dod mehānisku atbalstu ķermenim, pildot balsta un kustību funkcijas, un aizsargā orgānus, bet arī glabā šūnas un ir atbildīga par minerālvielu homeostāzi. Kaulu kvalitāti ietekmē ne tikai dažādi ārējie faktori (indivīda svars un vecums, kaulu ģeometrija un mikrostruktūra), bet arī raksturīgās audu materiāla īpašības - mineralizācija, organiskās matricas parametri, pielāgošanās mikrobojājumiem un osteocītu apoptoze[3] [34]. Kauls nepārtraukti piedalās rekonstruēšanā un ķīmiskā apmaiņā ar visu ķermeni, un tam ir unikāla spēja atjaunoties. Kaulu atjaunošanos nodrošina divu tipu šūnas - osteoklasti, kas uzsūc pārkaļķojušos kaulu matricu un osteoblasti, kas atbild par jaunas kaulu matricas sintēzi [34, 35]. Organiskās un neorganiskās komponentes saturs kaulos mainās atkarībā no indivīda vecuma un kaula veida un lokācijas. Vairākums kaulu slimību rodas atjaunošanās procesu anomāliju rezultātā, kad tiek bojāta kaula arhitektūra un struktūra, kā arī pazemināsto mehāniskā izturība, novedot pie tādiem klīniskiem simptomiem kā sāpes, deformācija, lūzumi, kā arī minerālvielu homeostāzes anomālijas. Visbiežāk sastopamās kaulu un locītavu slimības, kas negatīvi ietekmē cilvēka skeleta veselību, bojājot kaulus un locītavas, ir osteoporoze, artrīts un vēzis [36, 37]. Osteoporoze, pretēji vispārpieņemtiem uzskatiem, ir nevis Ca trūkums, bet paaugstināta (Ca^{2+}) jonu «izskalošana» no kauliem, ko, savukārt, izraisa Mg deficīts organismā. Tādējādi Mg ir atbildīgs par pietiekamu (Ca^{2+}) jonu saturu kaulos un, veicinot kaulu veidojošo šūnu (osteobalstu) vairošanos un augšanu, nodrošina stiprus un veselus kaulus, kā arī pazemina osteoporozes risku [38].

1.2. CaP potenciāls biomedicīniskam lietojumam

CaP biomateriāli tiek uzskatīti par daudzsološākajiem materiāliem lietojumam kaulaudu inženierijā, pateicoties to ķīmiskajai un strukturālajai līdzībai ar dabīgā kaula minerālo komponenti [39]. Sintētiskie CaP kaulu aizvietotājmateriāli uzrāda osteokonduktivitāti[4] un osteoinduktivitāti[5]. CaP potenciāls mūsdienās tiek veiksmīgi izmantots, tomēr par spīti milzīgajai daudzveidībai, tikai daži sintētisko CaP klases pārstāvji, t. sk. HAp un β-TCP tiek efektīvi pielietoti medicīniskiem mērķiem.

[3]Apoptoze ir šūnu bojāeja, kad enzīmi degradē dezoksiribonukleīnskābes molekulas.

[4]Osteokonduktivitāte ir implantmateriāla spēja atbalstīt kaulaudu augšanu uz tā virsmas.

[5]Osteoinduktivitāte ir apkārtējo audu mezenhimālo cilmes šūnu stimulācija un aktivācija, rezultātā pārveidojot tās par kaulaudus veidojošajām šūnām.

1.2.1. Sintētiskie CaP biomedicīniskam lietojumam

Pirmo reizi biomateriālu uz CaP bāzes izmantošana kaulu lūzumu labošanā fiksēta 1920. gadā [40]. Tomēr plašāki CaP pētījumi, kas vērsti uz biomedicīnisku pielietojumu, aizsākti 1970. gadā [41–45].

Fundamentālo zinātņu jomā plaši tiek pētīta sintētisko CaP, t. i., stehiometriska HAp, kā arī Ca-deficītā HAp (CDHAp) un bioloģiski nozīmīgu vai radniecīgu CaP, t. sk. amorfā kalcija fosfāta (ACP, $Ca_x(PO_4)_y$), monetīta jeb dikalcija fosfāta anhidrīda (DCPA, $CaHPO_4$), brušīta jeb dikalcija fosfāta dihidrāta (DCPD, $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$), oktakalcija fosfāta (OCP, $Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$), kā arī β-TCP, sintēze un fizikālķīmiskās īpašības, lai gūtu pilnīgāku izpratni par sintētisko CaP īpašībām, kuras pielāgojamas bioloģiskajam HAp [46].

CaP biomateriālu vēsturiskās attīstības gaita, sākot no 1920. gada, un nozīmīgākie sasniegumi sniegti 1.3. tabulā. Jāatzīmē, ka 1.3. tabulā atspoguļotais apkopojums nav uztverams kā izsmeļošs, un uzskaitīta tikai daļa no CaP biomateriālu plašā izpētes lauka un potenciālā medicīniskā pielietojuma klāsta.

1.3. tabula

CaP biomateriālu vēsturiskās attīstības nozīmīgākie etapi [1]

Laika periods	Atklājums / Notikums
1920. gads	CDHAp šlikera izmantošana kaulaudu augšanas stimulēšanai
1934. gads	Trikalcija, monokalcija un dikalcija fosfātu šlikeru izmantošana kaulaudu augšanas stimulēšanai
1965. gads	HAp prekursora fāzes jeb *Posnera* klāstera atklāšana
1969. gads	Blīvas HAp keramikas sintēze lietojumam protezēšanā
1970. gads	Makroporu nozīmes kaulaudu reģenerācijā akcentēšana
1971. gads	Biorezorbējošas TCP keramikas implantēšana žurkām
1975.-1979. gads	β-TCP un HAp klīniskie pētījumi
1975.-1982. gads	Pirmo CaP produktu komercializācija biomedicīniskam lietojumam: «*Synthograft/Synthos*» (β-TCP, 1975. gads); *Ceros HA* (HAp, 1980. gads); *Durapatit*e (HAp,1982. gads); *ProOsteon* (HAp, 1981. gads); *Calcite* (HAp, 1982. gads); *Alveograft* (HAp, 1982. gads); *Ceros TCP* (1982. gads); *BioBase* (α-TCP, 1982. gads)
1976. gads	α-TCP hidraulisko īpašību aprakstīšana
1980.-1987. gads	CaP pārklājumu izgatavošana
1982.-1987. gads	CaP kaulu cementu izgatavošana
1985.-1990. gads	CaP izmantošana lokālās zāļu piegādes sistēmās

Laika periods	Atklājums / Notikums
1985. gads	Mikroporu nozīmes akcentēšana kaulaudu reģenerācijā
1987.-1999. gads	Injicējamu, nesacietējošu CaP pastu izgatavošana
1990.-1991. gads	Osteokonduktivitātes jēdziena definēšana
1994.-1995. gads	CaP kaulu cementu klīniskie pētījumi, komercializācija: *Norian SRS*; *BoneSource*
1997. gads	CaP biokeramikas pamatņu izgatavošana, izmantojot ātro prototipēšanu
1999. gads	Ar Si modificēta HAp sintēze
2001.–2004. gads	Biomimētisku CaP pamatņu un makroporainu CaP kaulu cementu izgatavošana
2003. gads	Lietošanai gatavu vienkomponenetes un divkomponenešu CaP kaulu cementu pastu izgatavošana
2003.–2004. gads	CaP nanodaļiņu sintēze gēnu transportam
2004.–2006. gads	Hidratētā konstatēšana slāņa uz HAp kristāla virsmas
2005.–2007. gads	CaP pamatņu izgatavošana, izmantojot 3D printēšanu
2008. gads	HAp nanodaļiņu pastas potenciāla pierādīšana kaulu defektu labošanā
2008. gads	CaP → magnija fosfātu (MgP) fāžu diagrammas izstrāde
2008. gads	Kaula attīstības procesa pētījumos konstatēta ACP klātbūtne
2010.–2011. gads	No CaP biomateriāliem atbrīvoto (Ca^{2+}) un (PO_4^{3-}) jonu terapeitiskā potenciāla pētījumi
2012. gads	CaP nanodaļiņu kovalenta funkcionalizēšana
2013. gads	ACP formēšanās *in vitro* detalizēts apraksts

Populārākie CaP biomateriālu izmantošanas virzieni medicīnā ietver zobārstniecību, parodontozes ārstēšanu, ortopēdiju, mutes, sejas un žokļu ķirurģiju, mugurkaula ķirurģiju, zāļu piegādes sistēmas un pamatnes audu inženierijā. Līdz mūsdienām minētajiem mērķiem izstrādāti CaP biomateriāli dažādās formās, sākot no plānajām kārtiņām uz metāliskiem implantiem, lai nodrošinātu implanta un kaula efektīvu saaugšanu, līdz augsttemperatūrā apstrādātai CaP biokeramikai un nanodaļiņām tādu terapeitisko aģentu kā medikamentu, bioloģiski aktīvu jonu, gēnu u.c. mērķtiecīgai, lokālai piegādei organismā [47–49].

Ilggadēji pētījumi apstiprina, ka CaP biokeramika nav toksiska, ir biosaderīga, t. i., imūnsistēma to atpazīst kā piederīgu, un tai piemīt bioaktivitāte, spēja integrēties dzīvajos audos [39, 48]. Lai gan pierādīts, ka starp CaP biokeramiku un kaulaudiem *in vivo* veidojas cieša fizikālķīmiskā saite, tomēr CaP biokeramikas izmantošanu biomedicīnā limitē to

mehāniskās īpašības, proti, tā ir trausla, ar zemu izturības pakāpi. Pildot savas funkcijas organismā, kauli tiek pakļauti slodzei, kas nozīmē to, ka implantmateriāliem, kas paredzēti izmantošanai kaulu defektu labošanā, ir jābūt slodzes izturīgiem. Pareizs slodzes sadalījums starp implantmateriālu un kaulu ir būtisks, lai nodrošinātu savstarpējo stabilizāciju. Slodzes sadalījumu starp implantmateriālu un kaulu ietekmē elastības moduļa jeb *Junga* moduļa[6] un mehāniskās stiprības atšķirības. Implantmateriāla un kaula mehāniskās stiprības atšķirības var izraisīt kaula sabrukšanu spriegumu dēļ. Tas ir viens no faktoriem, kas kompromitē implantmateriālu izmantošanu medicīnā. Nodrošinot stabilu fiksāciju jeb sasaisti starp kaulaudiem un implantmateriāla virsmu, tiek veicināta slodzes un spriegumu pārvade no implanta uz apkārtesošajiem kaulaudiem [50]. Mūsdienās kaulu defektu labošanai slodzi nenesošās vietās izmanto blīvu vai porainu HAp, β-TCP un BCP biokeramiku granulu vai pamatņu formā [7, 48, 51]. Savukārt, slodzi nesošās vietās izmanto HAp pārklājumus uz tādiem metāliskiem implantiem kā titāns un tā sakausējumi, kas plaši tiek izmantoti ortopēdijā, piemēram, gūžas endoprotēžu izgatavošanā. Tādējādi tiek iegūti produkti ar uzlabotu bioaktivitāti, vienlaicīgi saglabājot izcilas mehāniskās īpašības [52-54].

Plašu CaP biomateriālu pētniecības nozari pārstāv CaP kaulu cementi, kas kalpo kā saistviela ortopēdisko protēžu nostiprināšanai vai tiek izmantoti tiešai kaulu defektu pildīšanai, potenciālam lietojumam ortopēdijā, plastiskajā un rekonstruktīvajā ķirurģijā. CaP kaulu cementi tiek izgatavoti no CaP prekursoru pulvera un piedevu maisījuma, kuru sajaucot ar ūdens šķīdumu iegūst formējamu un injicējamu pastu. Pēc implantēšanas organismā pasta sacietē. Aktuālākie pētījumi pasaulē ir vērsti uz CaP kaulu cementu fizikālķīmisko īpašību tuvināšanu dabīgā kaula īpašībām, kā arī uz sacietēšanas laika *in vivo* pielāgošanu efektīvākai operēšanai, variējot kaulu cementu sastāvu, t. sk. CaP, visbiežāk HAp, α-TCP un DCPA, saturu [55, 56].

Viens no aktuālākajiem CaP pētniecības virzieniem ir mikro- vai nano-strukturētu biomateriālu, t. i., mikrosfēru, mikrogranulu vai nanodaļiņu, izveide lietojumam kaulaudu inženierijā, piemēram, gēnu transportam, zāļu piegādes sistēmās, terapeitisku, bioloģiski aktīvu jonu lokālās piegādes sistēmās [57]. Biomateriāli, t. sk. kompozītmateriāli, uz nanoizmēra CaP un kolagēna bāzes pirmo reizi pētīti *in vivo* 1990. gadā. Pozitīvie *in vivo* testu rezultāti pavēra iespējas nanokristāliskus CaP izmantot kā kaulu aizvietotājmateriālus un lokālās zāļu piegādes

[6] *Junga* modulis trabekulārajiem kaulaudiem ir no 0,5 līdz 1,5 GPa un kortikālajiem kaulaudiem – no 7 līdz 30 GPa.

sistēmās [58, 59]. Pirmais medicīniskais preparāts *NanOss™* - kaulu defektu pildviela, kas satur nanoizmēra CaP daļiņas, komercializēts 2005.gadā ASV. *NanOss™* mikrostruktūra, ķīmiskais sastāvs un fizikālķīmiskās īpašības imitē kaulaudos esošo bioloģisko HAp. Tas ir mehāniski izturīgāks, spēj efektīvāk veicināt kaulaudu atjaunošanos salīdzinājumā ar analogu mikroizmēra CaP daļiņas saturošu preparātu [60]. Perspektīvs komerciāls produkts ir *Ostim®*, kas ir izmantošanai gatava injicējamā pasta uz nanokristāliska HAp, kura kristalītu vidējais izmērs – ($100^{x}2^{x}3$) nm^3 un īpatnējais virsmas laukums ~100 m^2/g, un ūdens bāzes. *Ostim®* izmanto kaulu lūzumu ārstēšanā [58].

HAp, pateicoties tā elastīgajai un vienlaicīgi stabilajai kristāliskajai struktūrai, piemīt spēja iekļaut izomorfus aizvietotājus, kas netieši izskaidro bioloģiskā HAp ķīmiskā sastāva plašās variācijas. Līdz ar to lielākā daļa dabīgo apatītu minerālu ir nestehiometriski. Vienkāršākā jonu apmaiņas teorijā metālu joni adsorbējas uz apatīta virsmas, aizvietojot (Ca^{2+}) jonus HAp difūzijas ceļā, kā parādīts vienādojumā (1.1) [11]:

$$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + xMe^{2+} \rightarrow (Ca_{10-x})Me_x(PO_4)_6(OH)_2 + xCa^{2+} \qquad (1.1)$$

Tādējādi bez jau aprakstītajām plašajām HAp izmantošanas iespējām biomedicīnā, HAp materiāliem ir rasts pielietojums arī vides tehnoloģijās, piemēram, notekūdeņu, piesārņotas augsnes attīrīšanai un smago metālu adsorbcijai [56, 61, 62]. Turklāt zinātniskās literatūras analīze liecina, ka dažādu biomateriālu bioloģiskās un fizikālķīmiskās īpašības iespējams uzlabot, veicot to modificēšanu ar dažādiem elementiem un to grupām, t. sk. tādiem, kas sastopami dabīgā kaula sastāvā. CaP modificēšanu visbiežāk veic ar mērķi uzlabot to bioloģisko saderību ar dzīvajiem audiem. Izpētīts, ka izomorfu aizvietotāju, t. i., elementu, kas netilpst CaP pamatsastāvā, iekļaušana CaP struktūrā būtiski ietekmē tādas materiālu īpašības kā kristāliskums, izmainot kristāliskā režģa parametrus, un šķīdību, kā arī ietekmē galaproduktu bioloģisko saderību [63]. Līdz ar to aizvietotu CaP sintēze guvusi popularitāti, jo ir iespējams izstrādāt implantmateriālus, kas uzrādītu vēlamas īpašības specifiskiem biomedicīniskiem pielietojumiem [64]. Izmantojot CaP pamatelementu aizvietošanu, iespējams modificēt implantmateriāla virsmas īpašības, uzlabojot proteīnu adsorbciju un šūnu adhēziju uz virsmas, kā arī bioaktivitāti [52]. Iekļaujot sintētiskā CaP struktūrā elementus, kas sastopami dabīgajos cietajos audos, materiāls kļūst nestehiometrisks un sīkkristālisks, līdz ar to tā īpašības tiek tuvinātas bioloģiskā HAp īpašībām, un tiek uzlabota biomateriāla saderība ar dzīvajiem audiem [65–67]. CaP ar zemu kristāliskuma pakāpi piemīt uzlabota biorezorbcija organismā. Tā tiek

uzskatīta par priekšrocību, jo uz materiāla virsmas tiek radītas dinamiskas šķīšanas un bioloģiskā HAp nogulsnēšanas zonas *in vivo*.

Aktuāli ir pētījumi par CaP modificēšanu ar elementiem, kas nav sastopami vai to koncentrācija dabīgajos cietajos audos ir mērāmas miljonu daļās, piešķirot tiem specifiskas funkcijas, piemēram, pretiekaisuma, magnētiskās, fotoluminiscences īpašības. Turklāt, modificētie CaP var tikt izmantoti kā bioloģiski nozīmīgu, terapeitisku jonu nesēji. Zinātniskajā literatūrā pieejamās informācijas apskats par CaP modificēšanu ar dažādiem elementiem sniegts 1.2.4. apakšnodaļā.

1.2.2. HAp un β-TCP vispārīgs raksturojums

Pazīstamākie CaP biokeramikas pārstāvji ir HAp un β-TCP, kam piemīt biosaderība, bioaktivitāte un/vai biorezorbcija, kā arī osteokonduktivitāte. Promocijas darbā HAp un β-TCP izvēlēti modificēšanai ar Mg. Vispārīgs HAp un β-TCP fizikālo un ķīmisko īpašību salīdzinājums sniegts 1.4. tabulā.

1.4. tabula

HAp un β-TCP fizikālo un ķīmisko īpašību salīdzinājums [48]

Fāze	**Ķīmiskā formula**	**Ca/P molārā attiecība**	**Šķīdība 25 °C, $pK_{šķ}$**	**Kristālrežģa sistēma**	**Blīvums, g/cm^3**
HAp	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1,67	116,80	heksagonāla	3,15
β-TCP	$Ca_3(PO_4)_2$	1,50	28,90	romboedrāla	3,07

CaP biokeramiku iegūst šķīduma vai cietvielu reakcijās sintezētu CaP prekursoru formēšanas, piemēram, pārklājumu uznešanas, presēšanas u.c., un augsttemperatūras apstrādes rezultātā. Ca/P molārai attiecībai ir nozīmīga loma augsttemperatūras apstrādē, piemēram, HAp gadījumā izteiktas novirzes no stehiometriskas Ca/P molārās attiecības, kas atbilst 1,67, veicina α- vai β-TCP blakusfāžu veidošanos biokeramikā augsttemperatūras apstrādes rezultātā. Sekojoši, ja CaP prekursora Ca/P molārā attiecība atbilst 1,50 (apatītisks TCP (ap-TCP)), augsttemperatūras apstrādes rezultātā tas transformējas par β-TCP ($T \geq 700$ °C) vai α-TCP (1120 °C $\leq T \leq$ 1290 °C) [68, 69]. Savukārt, ja CaP prekursora Ca/P molārā attiecība robežās 1,50 < Ca/P < 1,67 (CDHAp), augsttemperatūras apstrādē tiek iegūti BCP, kas sastāv no HAp un β-TCP dažādās attiecībās. Turklāt, jo zemāka Ca/P molārā attiecība, jo CaP ir skābāks un tam raksturīga augstāka šķīdība ūdenī un ūdens šķīdumos. Tādējādi CaP biokeramikas bioaktivitāte un biorezorbcija ir tieši atkarīga no Ca/P molārās attiecības, fāžu tīrības un

kristāliskuma. Savukārt osteokonduktivitāti un osteoinduktivitāti galvenokārt ietekmē biokeramikas ķīmiskais sastāvs un virsmas īpašības. Ir pierādīts, ka β-TCP osteoinduktivitātes potenciāls ir augstāks kā HAp. Savukārt klīniskie pētījumi liecina, ka β-TCP biokeramikas biorezorbcijas pakāpe ir par augstu, kas kavē kaulaudu augšanu. β–TCP biorezorbcijas ātrums ir aptuveni 10 reizes lielāks nekā HAp [70].

Nereti izmanto BCP biokeramiku, kas satur HAp un β-TCP dažādās attiecībās. Regulējot stabilā HAp un šķīstošā β-TCP fāžu attiecību BCP biokeramikas sastāvā, iespējams kontrolēt materiāla biorezorbciju organismā [48, 71]. Vēsturiski par optimālu tiek uzskatīta BCP biokeramika ar HAp/β-TCP fāžu attiecību 60/40 % (masas) [72, 73]. Svarīgi atzīmēt, ka dažādās organisma daļās nepieciešami implantmateriāli ar atšķirīgu biorezorbcijas kinētiku, lai tā būtu samērojama ar attiecīgā kaula augšanas kinētiku [74, 75]. BCP biokeramiku var iegūt, mehāniski samaisot noteiktās attiecībās augsttemperatūrā iegūtās HAp un β-TCP fāzes vai termiski apstrādājot sintezēto CDHAp. Priekšroka tiek dota CDHAp augsttemperatūras apstrādes metodei, jo fāžu maisījums, kas iegūts sintēzes ceļā atomu līmenī, nodrošina homogēnāku HAp un β-TCP graudu izkliedi biokeramikas tilpumā, ļaujot iegūt BCP biokeramiku ar uzlabotu graudu sablīvēšanos, kas, savukārt, nodrošina labākas mehāniskās īpašības, proti, augstāku mehānisko izturību.

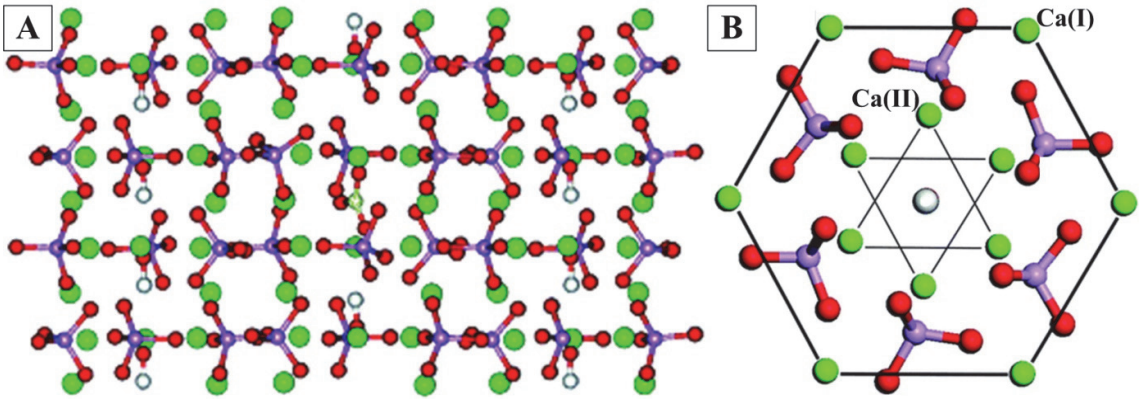
1.2.3. HAp un β-TCP strukturāls raksturojums

Vispārīgi aprakstot, var apgalvot, ka pamatā CaP kristālisko struktūru veidojošie atomi izvietoti apkārt fosfātgrupu [PO_4] sistēmai, kas nodrošina struktūras stabilitāti.

HAp kristāliskā struktūra sastāv no [PO_4] tetraedru pamatnes. Atkarībā no [OH] grupu izkārtojuma, HAp ieņem monoklīno vai heksagonālo struktūru. Gaisa atmosfērā HAp ieņem monoklīnu ($P2_1/b$) un pie 250 ºC heksagonālu ($P6_3/m$) telpisko struktūru. Bioloģiskais HAp (mugurkaulnieku cieto audu neorganiskā daļa) kaulu un zobu sastāva ir ar heksagonālu struktūru, bet zobu emaljas sastāvā ar monoklīnu struktūru. Ņemot vērā HAp kristāliskā režģa parametrus (a = 0,95 nm, c = 0,68 nm) un tā simetriju (heksagonāla, $P6_3/m$), likumsakarīgi, ka HAp elementāršūna ir orientēta c-ass virzienā [47, 76–78].

Stehiometriska HAp, kura ķīmiskā formula $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, kristālrežģa šūnu veido divas $Ca_5(PO_4)_3OH$ molekulas. Shematiska HAp kristālrežģa uzbūve parādīta 1.3. attēlā. HAp raksturīgs heksagonāls kristālrežģis, kur Ca atomi ir atrodas divās pozīcijās – kolumnāri (Ca(I)) un heksagonāli (Ca(II)) (skat. 1.3. att. (B)). Kolumnārie Ca jeb Ca(I) atomi izvietoti kristālrežģa punktos, heksagonālie Ca atomi jeb Ca(II) - izvietoti plaknēs, kas paralēlas c-asij. Tādējādi,

HAp struktūras formula pierakstāma sekojoši - $Ca(I)_4Ca(II)_6(PO_4)_6(OH)_2$. [$PO_4$] tetraedri atrodas kristālrežģa plaknēs, savukārt hidroksilgrupas [OH] ir izvietotas kristālrežģa stūros *c*-asij paralēlās kolonnās. HAp kristālrežģa vislielāko tilpumu aizņem O atomi [47].

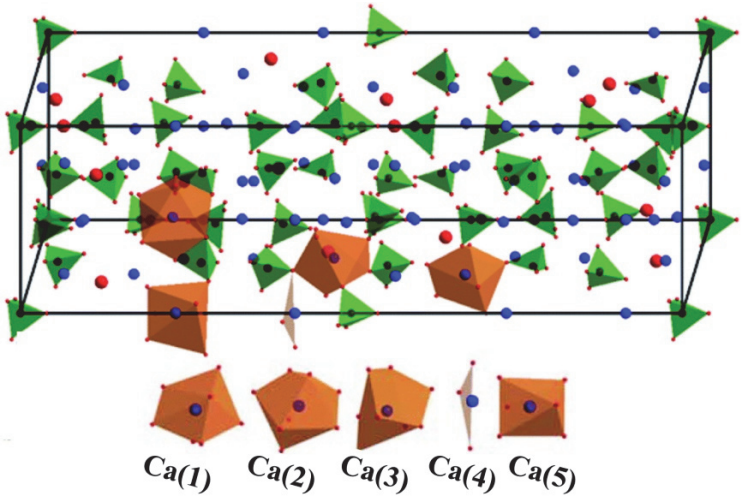


1.3. att. A - HAp kristālrežģa šūna: ● – O; ● – Ca; ● – P; ○ – H [79], B - dažādu Ca atomu koordinatīvais attēlojums HAp struktūrā [80]

TCP iespējamas trīs augstteperatūras polimorfās modifikācijas [81]:

1) β-TCP; $T \leq 1180$ °C;
2) α-TCP; 1180 °C $\leq T \leq$ 1430 °C;
3) α'-TCP; $T \geq 1430$ °C.

β-TCP raksturīgs romboedrāls kristāliskais režģis, kura elementāršūna satur 21 $Ca_3[(PO_4)_2]$ vienību (skat. 1.4. att.).

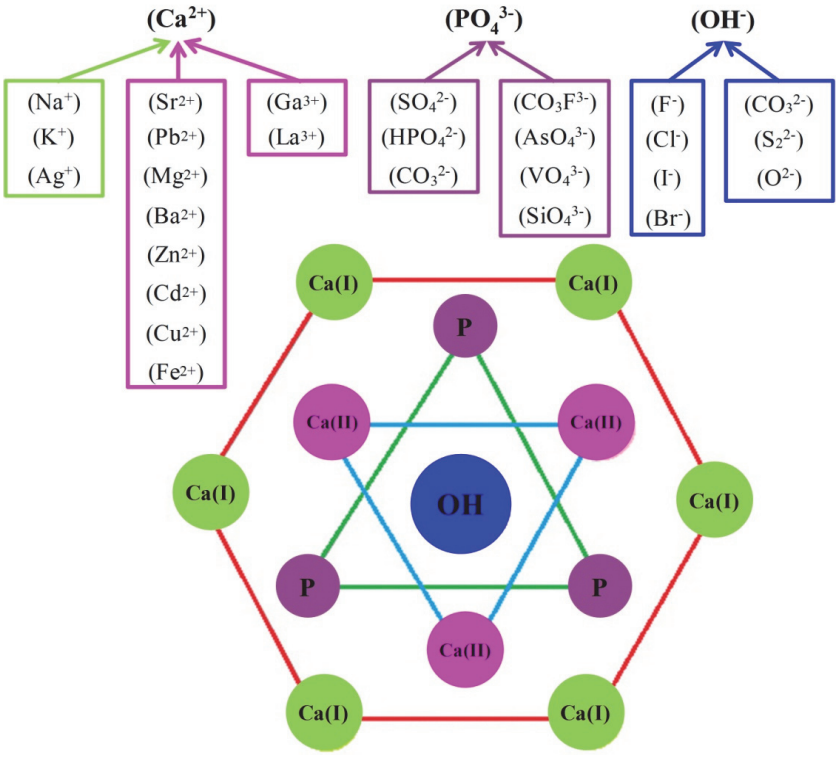


1.4. att. β-TCP kristālrežģa šūna: ● – O; ● – Ca; ● – P [82]

β-TCP kristāliskā struktūra tiek aprakstīta kā haotiski izkliedēti [PO_4] tetraedru slāņi, starp kuriem izvietojušies Ca atomi. Turklāt Ca atomi β-TCP kristālrežģī ieņem piecas telpiskās koordinācijas. Ca(4) vieta β-TCP struktūrā ir koordinēta ar trim skābekļa atomiem un tai raksturīgs daļējs okupācijas faktors (0,5). Savukārt Ca(1), Ca(2), Ca(3) un Ca(5) vietas ir pilnībā aizņemtas ar Ca atomiem un koordinētas ar attiecīgi septiņiem, astoņiem, astoņiem un sešiem O atomiem [81].

1.2.4. Ar izomorfiem aizvietotājiem modificēti CaP

Sintētisko CaP modificēšanu veic, iekļaujot CaP struktūrā izomorfus aizvietotājus jeb aizvietojot Ca, [PO_4] un/vai [OH] pozīcijas (skat. 1.5. att.) [76–78, 83–94]. Atkarībā no aizvietotās pozīcijas tiek izdalīta, tā saucamā, anjonā un katjonā CaP aizvietošana.



1.5. att. Aizvietošanas iespējas HAp heksagonālajā struktūrā [76–78, 83–94]

1.2.4.1. Anjonaizvietoti CaP

Anjonai aizvietošanai atbilst pilnīga vai daļēja CaP kristāliskajā struktūrā esošo [PO_4] tetraedru aizstāšana ar [SiO_4], [CO_3F], [SO_4], [AsO_4], [HPO_4], [VO_4], [CO_3], kā arī [OH] grupu aizstāšana ar [CO_3], F, [S_2], Cl, O, I, Br, [O_2]. Anjonās aizvietošanas gadījumā vairākums pētījumu, kas aprakstīti zinātniskajā literatūrā, veltīti bioloģiski nozīmīgo [CO_3], [SiO_4], F un Cl iekļaušanai sintētiskā HAp struktūrā [76–78, 83–104].

HAp struktūrā iekļaujot [CO_3] grupas, pastāv divas iespējamās aizvietošanas iespējas, respektīvi, [OH] grupas vietā «A-tipa» aizvietošana vai [PO_4] tetraedra vietā «B-tipa» aizvietošana, un iegūtie materiāli ir, attiecīgi, «A-tipa» karbonāthidroksilapatīts (A-CHAp) un «B-tipa» CHAp (B-CHAp). Sintētiskajos HAp ir iespējama arī vienlaicīga [PO_4] un [OH] grupu aizvietošana ar [CO_3], iegūstot «AB-tipa» CHAp (AB-CHAp). Bioloģiskie apatīti principā ir B-CHAp ar nelielu A-CHAp piemaisījumu saturu. HAp modificēšana ar [CO_3] veicina HAp kristalizācijas pakāpes samazināšanos un šķīdības palielināšanos. [CO_3] iekļaušana HAp struktūrā ir ierobežota, jo tiek destabilizēta HAp struktūra [85, 95].

Si ir būtisks mikroelements bioloģiskajos procesos. Tam ir īpaša nozīme vielmaiņas procesos, kas saistīti ar kaulu augšanu. Pierādīts, ka Si uzlabo un stimulē osteoblastu aktivitāti *in vitro* un sekmē HAp noārdīšanos *in vivo* [84]. HAp modificēšana ar Si notiek, aizvietojot [PO_4] grupas ar [SiO_4] grupām struktūrā. Literatūrā norādīts, ka HAp modificēšana ar [SiO_4] grupām izraisa kristalītu izmēru samazināšanos, kas savukārt noved pie materiāla šķīdības paaugstināšanās, uzlabojot tā bioloģisko saderību ar dzīvajiem audiem [85, 96]. Ar Si modificēta HAp uzlabotā bioloģiskā aktivitāte ir saistīta ar palielinātu struktūras defektu skaitu uz graudu robežvirsmām, kas tiek uzskatīts par šķīšanas sākumpunktu *in vivo* [83].

Struktūrā esošo [OH] grupu aizvietošana ar F stabilizē HAp fāzi [97]. Iekļaujot F HAp struktūrā, tiek sekmēta HAp kristāliskuma pakāpes paaugstināšanās. Pilnībā vai daļēji ar F aizvietotam HAp ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH,F)_2$) raksturīga zemāka šķīdība, augstāka termiskā un ķīmiskā stabilitāte salīdzinājumā ar neaizvietotu HAp [98, 99]. Salīdzinoši nesenos pētījumos konstatēts, ka (F^-) joni spēj stimulēt ārpus šūnas matricas formēšanos *in vitro* un uzlabot kaula un implanta saaugšanu *in vivo,* veicinot osteoblastu proliferāciju un vairošanos. (F^-) joni veicina cieto audu (emaljas, kaulu) defektu reģenerāciju, samazina un kontrolē zobu kariesa attīstību. Lai gan ir iespējams pilnībā aizvietot [OH] grupas HAp struktūrā ar F, ir nepieciešams pielāgot F saturu, lai optimizētu HAp implantu bioaktivitāti un kontrolētu (F^-) jonu izdalīšanos organisma vidē. Lielos daudzumos (F^-) joni var izraisīt nevēlamus efektus šūnu darbībā [98]. Turklāt HAp produktiem ar augstu F saturu novērota mehānisko īpašību pasliktināšanās, respektīvi, cietības un elastības moduļa pazemināšanās. Šīs izmaiņas ir saistītas ar materiāla blīvuma pazemināšanos līdz ar F satura pieaugumu [99].

Neskatoties uz to, ka Cl ir sastopams cieto audu sastāvā (~0,13 % (masas)), literatūrā publiskots salīdzinoši neliels skaits pētījumu par ar Cl modificēta HAp implantmateriālu izstrādi. Pētījumu rezultātā ir noskaidrots, ka Cl aizvieto [OH] grupas HAp struktūrā [100, 101]. Cl galvenā funkcija organismā ir skābas vides ($pH < 7$) nodrošināšana uz kaulu virsmas, kas

veicina osteoklastu aktivitāti un kaulu noārdīšanās procesus [102, 103]. Līdz ar to Cl iekļaušana sintētiska HAp implantmateriālu sastāvā pamatā tiek realizēta ar mērķi nodrošināt implantēšanas vietā optimālus apstākļus kaulu minerālu šķīšanai un organiskās matricas sagremošanai osteoklastu izdalīto skābo hidrolāžu darbības rezultātā. Pilnībā ar Cl aizvietots HAp, t. i., hlorapatīts (6,8 % (masas) Cl), kur visas [OH] grupas aizstātas ar Cl, netiek uzskatīts par perspektīvu kaulu implantmateriālu, jo saistīts ar risku radīt lokālu vides paskābināšanos implantēšanas vietā, kas noved pie nevēlami straujas kaulu noārdīšanās [104].

1.2.4.2. Katjonaizvietoti CaP

Metāliskajiem elementiem, kuru atomu rādiuss mazāks kā Ca, t. i., < 0,198 nm, pirmkārt ir tieksme stāties Ca(II) pozīcijā, bet, pieaugot ievadītā jona koncentrācijai materiālā, tiek aizvietota arī Ca(I) pozīcija. Na, K, Ag, t. i., elementu, kuru atomu rādiuss ir lielāks kā Ca, gadījumā, pirmā tiek aizņemta Ca(I) vieta HAp struktūrā [91].

Ca aizstāšana HAp struktūrā veicina saišu garumu izmaiņas starp centrālo atomu un to aptverošajiem O atomiem, kā Mg, Cu, Zn, Fe, Cr un Mn gadījumā tas parādīts 1.5. tabulā, kā arī izraisa centrālo atomu aptverošo grupu novietojuma maiņu (skat. 1.6. att.) [105, 106].

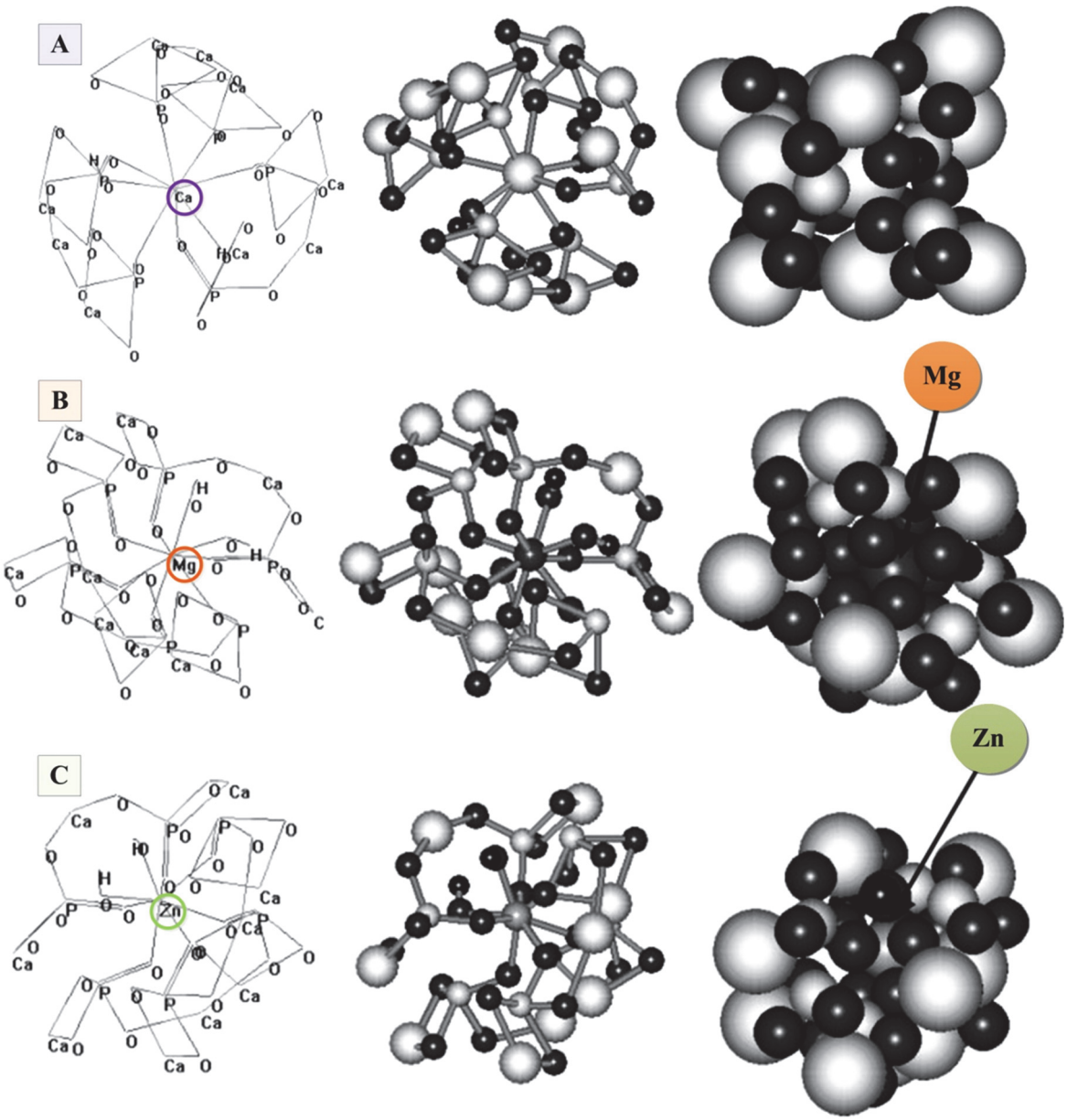
1.5. tabula

Saišu garumu[7] salīdzinājums starp centrālo atomu un to aptverošajiem O atomiem HAp molekulā [106]

Centrālais atoms	**Ca**	**Mg**	**Cu**	**Zn**	**Fe**	**Cr**	**Mn**
Atoma nr.	**Saišu garums, Å**						
*(1)-O(2)	2,4242	2,0832	1,9297	1,9897	1,9282	1,9351	1,8642
*(1)-O(3)	2,4259	2,0788	1,9154	1,9758	1,9136	1,9213	1,8956
*(1)-O(4)	2,4198	2,1049	2,0077	2,0273	2,0103	2,0099	1,9139
*(1)-O(5)	2,4244	2,0845	1,9419	2,0028	1,9413	1,9481	1,9468
*(1)-O(6)	2,4315	2,1152	2,0382	2,0370	2,0364	2,0399	1,9238
*(1)-O(7)	2,4297	2,0990	1,9702	2,0181	1,9705	1,9746	1,9378
*(1)-O(8) no OH	2,4085	2,0362	1,8648	1,9437	1,8653	1,8744	1,8957
*(1)-O(9) no OH	2,4111	2,0426	1,8789	1,9897	1,8781	1,8862	1,9276

* Centrālais atoms

[7] Saišu garumi aprēķināti, izmantojot molekulārā modelēšana ar *HyperChem* programmatūru.



1.6. att. HAp molekulas telpisks modelis ar A - Ca, B – Mg
un C – Zn kā centrālo atomu [106]

Īpašu interesi izpelnījies bioloģiskajā HAp sastopamo elementu, īpaši, Mg, Sr un Zn, potenciāls uzlabot HAp implantmateriālu bioaktivitāti [14, 83, 107–111].

Zn piemīt inhibitora loma HAp sintēzē, t. i., Zn iekļaušana struktūrā kavē HAp kristālu augšanu un pazemina HAp termisko stabilitāti. HAp kristāliem raksturīga regulāra forma, bet ar Zn modificēta HAp kristāli ir neregulāras formas un tiem piemīt pastiprināta tieksme aglomerēties. Turklāt aglomerātu izmēri pieaug līdz ar Zn satura palielināšanos HAp sintēžu produktos [83]. *Murakami et al.* pētījumos pieradīts, ka ar Zn modificēta HAp produkti, pateicoties to relatīvi augstajai mehāniskajai izturībai, ir piemēroti industriālai izmantošanai

[107]. *In vitro* un *in vivo* pētījumos pierādīts, ka Zn klātbūtne sekmē kaula saistīšanos ar implantmateriālu, kā arī samazina iekaisuma rašanās risku, pateicoties tam piemītošām antibakteriālām īpašībām [108].

Pierādīts, ka (Sr^{2+}) joniem ir milzīgs potenciāls osteoporozes ārstēšanā un kaulu mineralizācijas uzlabošanā [14]. Veikti pētījumi, kuros noskaidrots, ka Sr veicina kaulu veidošanos un mazina kaulu noārdīšanos. Pēdējos piecos gados starptautiski pētījumi pastiprināti ir vērsti uz Sr saturošu CaP kaulu aizvietotājmateriālu izstrādi [109]. Pateicoties Ca un Sr līdzīgai polaritātei un atomu izmēriem, attiecīgi, 0,198 nm un 0,215 nm, šie divi elementi ir salīdzinoši viegli savstarpēji aizvietojami HAp kristāliskajā režģī [110]. Ar Sr aizvietots HAp ir guvis starptautisku zinātnieku uzmanību, pateicoties tā kristāliskās struktūras, t. sk. starpatomu ķīmisko saišu un atomu telpisko izvietojumu kristālos, līdzībai ar nemodificētu HAp [111].

Proteīni, aminoskābes un citas organiskās vielas viegli adsorbējas uz HAp, kas noved pie baktēriju adsorbcijas un vairošanās uz HAp implantmateriālu virsmas [112]. Līdz ar to tiek pētītas potenciālas HAp modificēšanas iespējas ar tādiem elementiem, t. sk. Ag, Ce, kas piešķirtu materiālam antibakteriālas īpašības.

Ag raksturīga antibakteriāla iedarbība uz grampozitīvām un gramnegatīvām baktērijām, sēnītēm, vienšūnu organismiem un dažiem vīrusiem, tostarp arī uz antibiotiku izturīgām cilmēm. Būtiski, ka Ag piemīt zems toksiskums attiecībā pret zīdītāju šūnām un tas neizraisa mikrobu izturību. *In vitro* pētījumos noskaidrots, ka (Ag^{+}) joniem ir būtiska loma bakteriālās adhēzijas samazināšanai vai novēršanai uz ar Ag modificētiem HAp pārklājumiem [113].

Literatūrā atrodami pētījumi, kas apliecina, ka Ca aizvietošana ar Ce HAp struktūrā piešķir materiālam antibakteriālas īpašības. Pateicoties tam, ka Ce atoma rādiuss (0,185 nm) un *Pauling* elektronegativitāte (1,12) ir tuva Ca atoma rādiusam (0,198 nm) un *Pauling* elektronegativitātei (1,00), Ce ir iespējams salīdzinoši viegli iekļaut HAp kristālrežģī. Tādējādi tiek palielināta HAp fāzes šķīdība un materiālam piešķirtas antibakteriālās īpašības, kas veicinājis ar Ce modificēta HAp izmantošanu zobārstniecībā. Uzlabots antibakteriālais efekts uz *Lactobacillus* baktērijām sekmējis ar 0,08 % Ce modificēta HAp nanodaļiņu izmantošanu kā piedevu zobu higiēnas līdzekļos kariesa attīstības kavēšanai [114].

Pēdējos gados lielu interesi izsauc magnētisko nanodaļiņu izmantošana medicīnā, piemēram, lokālās zāļu piegādes sistēmās un diagnostikā. Šim nolūkam tiek izstrādāti specifiski nesēji, t. sk. ar Fe modificēta HAp nanodaļiņas. Nelielos daudzums (20 % (molu) attiecībā pret Ca) Fe pozitīvi ietekmē HAp īpašības, kuras ir svarīgas biomedicīniskai izmantošanai.

Aizvietojot Ca ar Fe, HAp kristāliskuma pakāpe, kristalītu izmēri, kristāliskā režģa parametri un elementāršūnas tilpums samazinās. Tas saistīts ar to, ka Fe atomu rādiuss ir mazāks Ca atomu rādiuss. Ar Fe aizvietota HAp nanodaļiņas ietekmē osteoblastu dzīvotspēju, tās var izmantot diagnostikā vai zāļu piegādē, turklāt novērots, ka Fe uzlabo osteoblastu adhēziju uz HAp implantmateriālu virsmas [115].

1.3. Mg saturoši biomateriāli

Mg loma dažādu organisma funkciju nodrošināšanā, kas uzskaitītas 1.2. tabulā, veicinājusi biomateriālu uz Mg bāzes attīstību vairāku desmitu gadu garumā. Līdz pat mūsdienām populārākais Mg lietojums medicīnā ir gan tīra Mg metāla, gan Mg sakausējumu, piemēram, ar Al/Zn (AZ91) vai ar Ca/Zn, formā kaulu defektu labošanai [116].

Biomateriālu modificēšana ar Mg tiek veikta, pievienojot to pamatsastāvam bioloģiski saderīgus Mg savienojumus, t. sk. MgP vai MgO, vai arī tieši iekļaujot Mg atomus attiecīgā savienojuma, piemēram, CaP, t. sk. HAp un β-TCP, kristāliskajā struktūrā. Turklāt, ņemot vērā Mg bioloģisko nozīmi, aktuāli kļuvuši pētījumi par tādu biomateriālu izstrādi, kas spētu atbrīvot (Mg^{2+}) jonus organisma vidē.

Pamatojoties uz publicētajiem *in vitro* un *in vivo* pētījumu rezultātiem, daži no perspektīvākajiem Mg saturošiem biomateriāliem, kā arī to priekšrocības un trūkumi medicīniskam lietojumam uzskaitīti 1.6. tabulā. Jāatzīmē, ka 1.6. tabulā sniegtais uzskaitījums nav uzskatāms par izsmeļošu, tomēr tiek ieskicētas nozīmīgākās tendences.

1.6. tabula

Mg saturoši materiāli medicīniskam lietojumam, to priekšrocības un trūkumi

Materiāla veids	Mg saturs	Priekšrocības (+) un/vai trūkumi (-)	Avots
Metālisks Mg vai to sakausējumi	≤ 100 % metālisks Mg	(+) augsta mehāniskā izturība; (-) strauja degradācija	[116]
Stikla keramika SiO_2-CaO-MgO	43,2 % (masas) MgO	(+) sasniegts *Junga* modulis (29,73 GPa), kas pielīdzināms kortikālajam kaulam; (+) Mg klātbūtne stimulē osteoblastu proliferāciju un diferencēšanos *in vitro*;	[117]
Kvartāra stiklkeramikas sistēma SiO_2–CaO–P_2O_5–MgO	5,0 % (molu) MgO	(+) salīdzinoši zemais Mg saturs uzlabo *in vitro* bioaktivitāti	[118]

Materiāla veids	Mg saturs	Priekšrocības (+) un/vai trūkumi (-)	Avots
Mg saturoši CaP kaulu cementi	0,0–1,2 mol $MgHPO_4 \cdot 3H_2O$	(+) sekmētta osteoblastu (MG-63) proliferācija; (+) efektīvāka kaulaudu augšana *de novo* implantēšanas vietā (*New Zealand* truši)	[119]
Mg saturoša HAp granulas	5,7 % (molu) Mg (attiecībā pret Ca)	(+) uzlabota osteokonduktivitāte un biorezorbcija *in vivo* testos (*New Zealeand* truši);	[121]
MgO un SrO saturošs β-TCP	1,0 % (masas) MgO	(+) β- → α-TCP polimorfās modifikācijas maiņa augstākās temperatūrās; (+) pastiprināta kaulu šūnu aktivitāte (proliferācija) *in vivo* testos (*Sprague-Dawley* žurkas);	[122]
Mg un F saturoši BCP pulveri	0,5–12,0 % (masas) Mg	(+) uzlabota biorezorbcija; (+) bioloģiski aktīvu (Mg^{2+}) un (F^-) jonu atbrīvošana organisma vidē	[123]

Metāliska Mg galvenā priekšrocība, salīdzinot ar citiem metāliskiem implantmateriāliem, piemēram, nerūsējošo tēraudu, titānu u.c., ir tā biorezorbcijas spēja organismā, kas nodrošina pakāpenisku noārdīšanos organismā, ļaujot veselajiem audiem aizstāt implantmateriālu. Metālisks Mg un Mg sakausējumi pirmo reizi bionoārdāmu implantu, t. i., vaskulāru stentu, formā un ortopēdiskam lietojumam tika izmantoti 19. gadsimta beigās. Pirmais Mg izmantošanu ortopēdisku implantu veidā ierosināja *Erwin Payr* [120]. Neskatoties uz gadu gaitā nostiprinātiem priekšstatiem par Mg bioloģisko saderību, pastāv metālisku Mg implantu toksicitātes risks, kas saistīts ar to neprognozējamu koroziju jeb sairšanu organisma vidē. Līdz ar to mūsdienās pētījumi galvenokārt ir vērsti uz Mg sakausējumu izstrādi, kas novērstu toksiskas audu atbildes rašanos dzīvā organismā pārāk intensīvas Mg implantu sairšanas un (Mg^{2+}) jonu izdalīšanās dēļ, kas novestu pie hipermagnēzijas[8].

Tiek uzskatīts, ka galvenais Mg un tā sakausējumu korozijas produkts, $Mg(OH)_2$, ir viens no iespējamiem faktoriem, kas stimulē kaulu augšanu *de novo* [124]. Implantējot $Mg(OH)_2$ cilindrus ar zemu biorezorbcijas pakāpi truša augšstilbā, novērota pastiprināta kaula veidošanās un kavēta kaula noārdīšanās. Šie rezultāti liecina, ka pastiprinātā kaulu augšana ap $Mg(OH)_2$ cilindriem ir saistīta ar atbrīvotajiem (Mg^{2+}) joniem. Minētajam atklājumam sekoja virkne pētījumu, kas apstiprināja (Mg^{2+}) jonu stimulējošo efektu uz osteoblastu aktivitāti. Pierādīts, ka

[8] Hipermagnēzija ir paaugstināts Mg saturs organismā.

(Mg^{2+}) joni veicina šūnu adhēziju uz biomateriāla virsmas [125–127], kā arī uzlabo osteoblastu proliferāciju [128–130], vairošanos [130], mineralizāciju [131] un angiogēnās[9] funkcijas [132]. *Zreiqat et al.* ierosināja, ka šūnu piesaistīšanās pie Mg saturošu biomateriālu virsmas notiek caur *α5β1*- un *β1*-integrīniem[10], kas ir (Mg^{2+}) jonu ierosināti fibronektīnu[11] receptori [125].

Pierādīts, ka, izmantojot Mg saturošus biomateriālus, ir iespējams mainītu kaulu dzīšanas un augšanas procesus kontrolētā veidā.

Mūsdienās daudzi pētījumi fokusēti uz ar Mg modificētu CaP kaulu cementu izstrādi ortopēdiskam lietojumam. Ar Mg modificēti CaP cementi *in vivo* apstākļos veicina labāku kaulšūnu vairošanos salīdzinājumā ar CaP cementiem, kas nesatur (Mg^{2+}) jonus [83, 133]. Pierādīts, ka tādu MgP kā $MgHPO_4 \cdot 3\,H_2O$ un $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22\,H_2O$ pievienošana kaulu cementos uzlabo to biosaderību ar osteoblastu kultūru, stimulē osteoblastu adhēziju un proliferāciju. Piemēram, Mg saturoša DCPD un struvīta jeb magnija amonija fosfāta ($NH_4MgPO_4 \cdot 6H_2O$) cementiem konstatēta augstāka osteoblastu aktivitāte salīdzinājumā ar CDHAp kaulu cementiem, jo Mg kaulu cementu sastāvā palielina šūnu aktivitāti [119].

Kontrolēta Mg iekļaušana CaP sastāvā var piešķirt implantmateriālam osteoinduktivitāti, izvairoties no iespējamām kaitīgām blakusparādībām, kas novērojamas, lietojot bioloģiski aktīvas vielas, piemēram, osteoporozes ārstēšanai. *In vivo* pētījumos ir konstatēts, ka HAp ar Mg piedevām uzrāda labākas osteogēnās īpašības, salīdzinot ar nemodificētu HAp [121]. Lai gan sākotnējie pētījumi šajā jomā ir daudzsološi, vēl ir daudz nezināmā par to, kā (Mg^{2+}) joni darbojas organisma vidē, kas padara šo par perspektīvu pētījumu jomu.

1.3.1. Ar Mg modificētu CaP sintēze

Zinātniskajā literatūrā visbiežāk aprakstīta CaP iegūšana, izmantojot ķīmiskās sintēzes metodes, piemēram, hidrotermisko sintēzi, sola-gēla metodi un ķīmisko suspensijas nogulsnēšanu, kas pieskaitāmas pie šķīduma ķīmiskajām metodēm, kā arī mehanoķīmisko metodi, kas tiek apzīmēta kā sausā ķīmiskā sintēzes metode [134]. Saskaņā ar publicētajiem datiem, veiksmīgi tiek realizēta Mg jonu iekļaušana dažādu CaP, t. sk. HAp, ap-TCP un CDHAp, struktūrā, izmantojot modificētas HAp sintēzes metodes, no kurām populārākās

[9] Angiogēni augšanas faktori un inhibitori kontrolē angioģenēzi, kas ir nozīmīgs process normālā fizioloģijā un slimību patoģenēzē. Angioģenēze ir jaunu asinsvadu veidošanās no iepriekš eksistējošiem.

[10] Integrīni ir membrānas proteīni, kas nodrošina šūnu mijiedarbību ar ārpussūnas matriksu.

[11] Fibronektīns ir glikoproteīns, kas sekmē šūnu proliferāciju un ietekmē diferenciācijas procesus.

uzskaitītas 1.7. tabulā [134–140]. Attiecīgās metodes tiek pielāgotas, lai realizētu aizvietotājjonu saturošu reaģentu pievienošanu sintēzes vidē, respektīvi, tiek variētas izejvielas, kā arī sintēzes tehnoloģiskie parametri.

1.7. tabula

Ar Mg modificētu CaP sintēzes metodes un tajās lietotie reaģenti

Produkts	**Prekursori**			**Metode**	**Avots**
	Ca	**P**	**Mg**		
Ar Mg modificēts HAp	CaO	H_3PO_4	$Mg(CH_3COO)_2$	suspensijas nogulsnēšanas metode	[134]
	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	$NH_4H_2PO_4$	$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$		[136]
	$Ca(NO_3)_2$	$(NH_4)_2HPO_4$	$Mg(NO_3)_2$		[137]
	$Ca(OH)_2$	H_3PO_4	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$		[121]
	$Ca(OH)_2$	$(NH_4)_2HPO_4$	$Mg(OH)_2$	mehanoķīmiskā-hidrotermālā sintēze	[138]
Ar Mg modificēts ap-TCP	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	$NH_4H_2PO_4$	$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	suspensijas nogulsnēšanas metode	[68]
	$Ca(CO)_3$	H_3PO_4	$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$		[139]
	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	$(NH_4)_2HPO_4$	$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$		[140]
Ar Mg modificēts CDHAp	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	$(NH_4)_2HPO_4$	$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	suspensijas nogulsnēšanas metode	[141]
	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	$(NH_4)_2HPO_4$	$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$		[142]

20. gadsimta 90-ajos gados pētījumi galvenokārt tika fokusēti uz ar Mg modificētu HAp sintēzi, izmantojot ķīmiskās suspensijas nogulsnēšanas metodi, lai sasniegtu maksimāli augstu HAp struktūrā iekļautā Mg saturu, saglabājot HAp stehiometriju un fāžu tīrību [143, 144]. Ziņojumi par maksimāli sasniedzamo Mg saturu HAp struktūrā ir pretrunīgi. Pāris pētījumu liecina, ka maksimālā Mg koncentrācija stehiometriska HAp struktūrā sasniedz vien 1,0 % (masas) [143, 144], tomēr citā pētījumā HAp struktūrā tika iekļauti pat 5,7 % (masas) Mg [121, 145]. Līdz pat mūsdienām visaugstāko HAp struktūrā iekļautā Mg koncentrāciju, t. i., ~28 % (masas), sasniegusi pētnieku grupa *Suchanek et al.*, izmantojot mehanoķīmisko-hidrotermālo sintēzes metodi, tomēr šādā ceļā iegūti sintēžu produkti raksturojas ar zemu tīrības pakāpi, jo satur izejvielu un blakusfāžu, t. sk. MgP, piemaisījumus [138]. Salīdzinoši mazāk literatūrā atrodama informācija par ar Mg modificēta ap-TCP un CDHAp sintēzi.

1.3.2. Ar Mg modificētu CaP strukturāls raksturojums

Saskaņā ar literatūru, Mg ietekme uz HAp fizikālķīmiskajām īpašībām ir sekojoša:

1) palielinās īpatnējais virsmas laukums [121, 136, 138],
2) samazinās kristāliskums un kristalītu izmēri [134, 136, 138],
3) pazeminās termiskās stabilitāte [136, 138],
4) paaugstinās šķīdība [121],
5) izmainās daļiņu morfoloģija no adatveida uz plākšņveida [134].

Ir izpētīts, ka Mg ievērojami palēnina HAp kristalītu nukleāciju un augšanu, kas rada lielāku kristalizācijas dīgļu skaitu, līdz ar to lielāku virsmas aktivitāti un biosaderību. Ca aizstāšana ar Mg veicina HAp kristāliskā režģa parametru samazināšanos, kas tiek skaidrota ar atomu rādiusu atšķirībām starp Mg un Ca, attiecīgi, 0,130 nm un 0,198 nm [146]. Tādu komplicētu pētniecības iekārtu izstrāde kā cietu vielu kodolmagnētiskā rezonanse un rentgenstaru absorbcijas spektroskopija ļāvusi detalizēti izpētīt un modelēt iespējamos mehānismus Mg iekļaušanai HAp struktūrā, novedot pie secinājumiem, ka Mg atomi pirmkārt aizņem Ca(II) vietu, kā arī Ca aizstāšana ar Mg HAp struktūrā ir ierobežota līdz ~10 % (molu). Turklāt, pieaugot Mg koncentrācijai, HAp struktūrā secīgi tiek aizvietota arī Ca(I) pozīcija [147]. Neskatoties uz ierobežoto Mg iekļaušanās daudzumu HAp kristālrežģī, kopējais Mg saturs no ūdens šķīduma izgulsnētā HAp var sasniegt līdz pat 30 % (molu), kas veicina amorfās fāzes rašanos un/vai Mg adsorbciju uz HAp kristālu virsmas. Uz virsmas adsorbēts Mg koordinē un saista lielāku ūdens molekulu skaitu salīdzinot ar Ca, tādējādi pastiprinot proteīnu adsorbciju. Vienlaicīga citu aizvietotāju, piemēram, [CO_3], F, iekļaušana HAp struktūrā veicina nestehiometriska HAp veidošanos ar bioloģiskajam HAp līdzīgām īpašībām, tomēr [CO_3] klātbūtne apgrūtina efektīvu Mg iekļaušanu HAp kristālrežģī [83].

β-TCP kristalizējas romboedrālā sistēmā, veidojot kristālrežģi, kurā ir Ca atomu vakances. Vakanču izmērs ir atbilstošs, lai režģī ieslēgtu elementus, kuru atomu rādiuss ir mazāks kā Ca, piemēram, Mg. Mg iekļaušana kristāliskajā struktūrā sekojoši izmaina β-TCP fizikālķīmiskās īpašības:

1) pazeminās īpatnējais virsmas laukumu [68],
2) samazinās kristalītu izmēri [68, 140],
3) paaugstinās termiskā stabilitāti [68, 140],
4) paaugstinās blīvums [140],
5) pazeminās šķīdība [139].

1.4. Dzīvo audu un CaP biokeramikas mijiedarbība un tās novērtēšana

Globālu klīnisko pētījumu [1, 40] rezultātā secināts, ka ideālam kaulu implantmateriālam jāuzrāda:

1) osteointegrācija - materiāla spēja veidot ķīmisko saiti ar kaula virsmu bez saistaudu starpslāņa veidošanās;
2) osteokonduktivitāte - materiāla spēja vadīt kaulaudu augšanu uz tā virsmas;
3) osteoinduktivitāte - ķermeņa apkārtējo audu mezenhimālo cilmes šūnu stimulācija un aktivācija, rezultātā pārveidojot tās par kaulaudu veidojošām šūnām;
4) osteoģenēze - jauna kaulu materiāla veidošanās.

Bioloģiskās saderības definīcija nosaka, ka dzīvā organismā implants mijiedarbojas ar šūnām, muskuļiem, saitēm, taukiem, kauliem un orgāniem, neizsaucot nevēlamu organisma atbildes reakciju, t. i., neradot kaitējumu organisma audiem un orgāniem [148]. CaP biokeramikai raksturīga bioloģiskā saderība [149], kas plaši pierādīta *in vitro*, *in vivo* un klīniskajos pētījumos. *In vitro* testi tiek bieži izmantoti, lai novērtētu potenciālo implantmateriālu bioloģisko saderību, pateicoties tam, ka tie ir lēti, viegli realizējami un atkārtojami salīdzinājumā ar *in vivo* testiem. Ir izstrādāts un standartizēts plašs klāsts *in vitro* testu, sākot no vienkāršākajiem bioaktivitātes pētījumiem mākslīgajos ķermeņa šķidrumos līdz citotoksicitātes testiem šūnu kultūrās. Līdz ar to ir svarīgi izvēlēties konkrētiem materiāliem piemērotākos *in vitro* testus, kas būtu saskaņā ar Starptautiskās Standartizācijas organizācijas (ISO; angļu: *International Organization for Standardization*) un ASV Pārtikas un zāļu pārvaldes (FDA; angļu: *US Food & Drugs Administration*) regulām. Kaulaudu inženierijas vajadzībām un potenciālo kaulu implantateriālu bioaktivitātes novērtēšanai bieži tiek praktizēti *in vitro* testi mākslīgajos ķermeņa šķidrumos. Dažādi mākslīgo ķermeņa šķidrumu veidi, kurus izmanto medicīnā un biomateriālu *in vitro* pētījumos, apkopoti 1.8. tabulā.

1.8. tabula

Mākslīgo ķermeņa šķidrumu veidi un to sastāvs (jonu *c* norādītas μmol/L) [150]

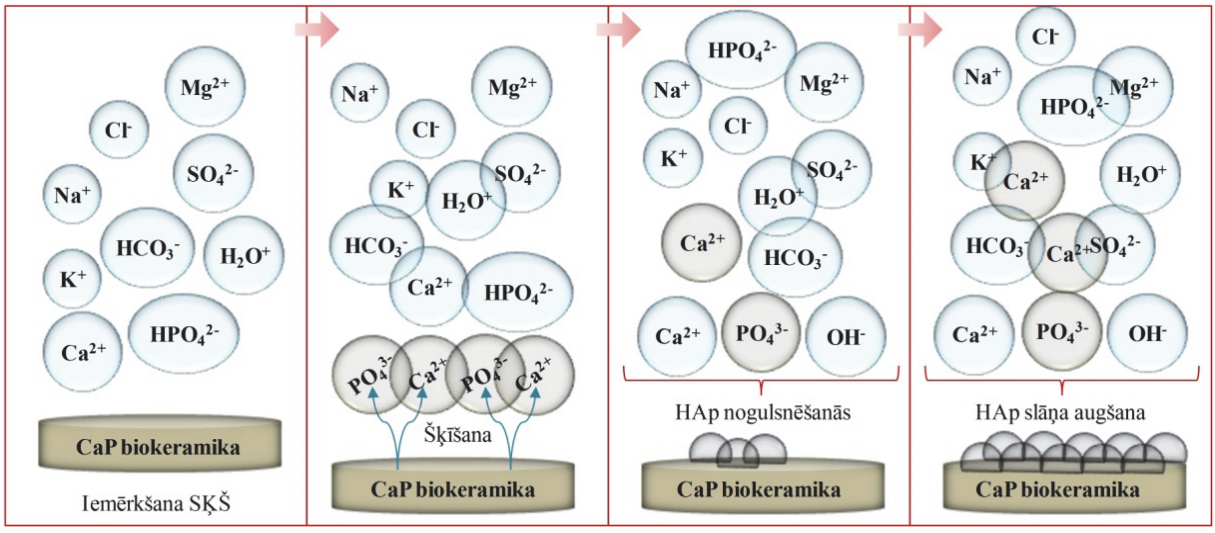
Šķidruma veids	**(Na^+)**	**(K^+)**	**(Mg^{2+})**	**(Ca^{2+})**	**(HPO_4^{2-})**	**(HCO^{3-})**	**(Cl^-)**	**(SO_4^{2-})**
Ārpussūnu šķidrums	142	5	1,5	2,5	1	27	103	0,5
Ringera šķidrums	113,6	1,88	-	1,08	-	2,38	115,3	-
Locke šķīdums	156,38	5,63	-	2,16	-	2,38	163,95	-
Ringera laktāts	130,66	4,02	-	1,4	-	-	109,48	-
Tiroda sāls šķīdums	149,12	2,68	0,53	1,8	0,33	11,9	144,23	-
Krebs-Henseleit buferšķīdums	143,4	5,88	1,25	2,52	1,18	25	128,2	1,25
Earle balansēts sāls šķīdums	143,6	5,37	0,83	1,8	1,04	26,2	125,3	0,83
Eagle barotne	140,9	5,4	1	1,8	1,1	23,8	126	-
Dulbecco modificēta *Eagle* barotne	127	5,33	0,81	1,8	0,906	44,05	90,8	-
Bachra šķīdums	145	5	0-10	3,75	1,67	22-111	133	-
Simulētais ķermeņa šķidrums (SĶŠ)	142	5	1,5	2,5	1	4,2	147,8	0,5
Mākslīgais urīns	111,09	42,04	3,2	4,43	20,58	-	134,12	16,19
Mākslīgās siekalas	11,88	5,36	-	5,41	5	-	23,02	0,02
Henk balansētais sāls šķīdums	141,6	5,81	0,81	1,26	0,78	4,065	144,8	0,81

Kaulu implantmateriālu, t. sk. biokeramikas, potenciālā **bioaktivitāte** bieži tiek novērtēta simulētajā ķermeņa šķidrumā (SĶŠ). Pētījumi ietver implantmateriāla izturēšanu SĶŠ noteiktu laika periodu, kā rezultātā tiek novērtēta biomimētiska[12] HAp slāņa augšanas kinētika uz

[12] Biomimētisks - imitē dabas realizētos procesus un struktūras.

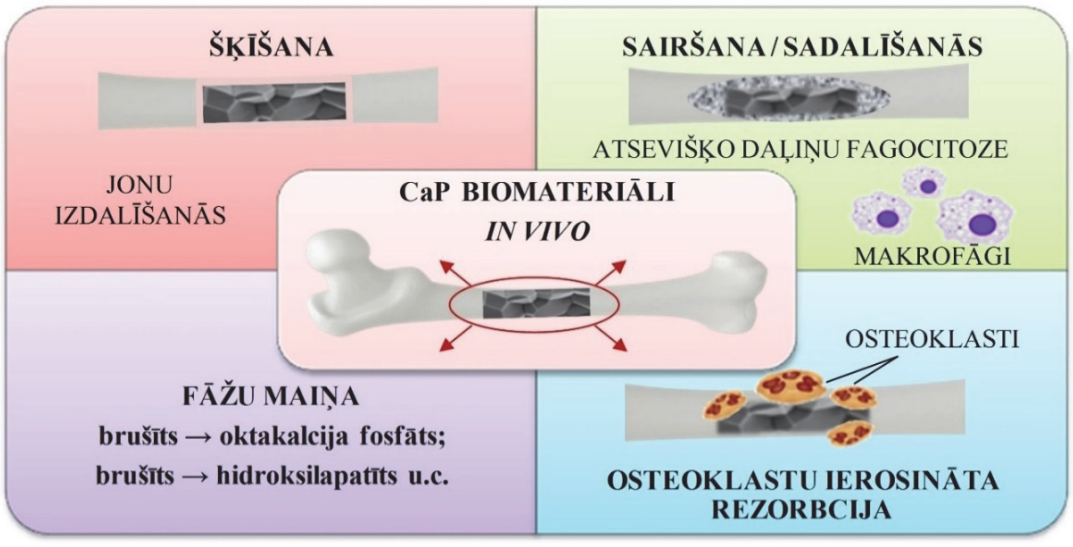
materiāla virsmas [150]. Biomimētisks HAp gan pēc sastāva, gan struktūras ir līdzīgs bioloģiskajam HAp kaulos un līdz ar to nodrošina uzlabotu dzīvo audu un implantmateriāla sasaisti. Tomēr saskaņā ar kristalizācijas teoriju, bioaktivitāte un biomimētiska HAp izgulsnēšanās SĶŠ ir divas dažādas parādības. Tādēļ, veicot *in vitro* pētījumus SĶŠ šķīdumos, ir svarīgi kontrolēt reakcijas apstākļus, t. sk. pH, temperatūru, jonu koncentrāciju un izturēšanas laiku, kas var ietekmēt biomimētiska HAp slāņa augšanu uz materiāla virsmas un, attiecīgi, sniegt patiesu vai maldinošu priekšstatu par materiāla bioaktivitāti *in vivo* [1, 151]. Termoķīmiskie izmeklējumi pierāda, ka SĶŠ sistēma ir nestabila un kļūst termodinamiski stabila, kristalizējoties HAp fāzei. Laiks, kas paiet, sistēmai kļūstot stabilai, ir nukleācijas laiks. Nukleāciju ietekmējošo faktoru izpratne ir svarīga, lai saprastu bioaktivitātes eksperimentu rezultātus, kurus iegūst SĶŠ *in vitro* pētījumos [152]. Kad materiāls ir ievietots SĶŠ, biomimētiska HAp slāņa izgulsnēšanās uz tā virsmas notiek dažādu ķīmisku reakciju, t. i., spontānās izgulsnēšanās, CaP kristālu nukleācijas un augšanas rezultātā. Virsmas ķīmijai ir svarīga loma šajos procesos. Tādējādi secināms, ka materiāla funkcionālās grupas ietekmē tā saistīšanos ar kaulu.

Biomimētiska HAp formēšanās process uz CaP biokeramikas virsmas galvenokārt ir atkarīgs no negatīvām grupām, t. i., negatīvu (OH^-) un (PO_4^{3-}) jonu esamības uz tās virsmas. Inkubācijas periodā pozitīvie, t. sk. (Ca^{2+}), joni no SĶŠ tiek piesaistīti brīvajām [OH] un [PO_4] grupām uz CaP materiāla virsmas. Tādējādi parauga virsma iegūst pozitīvu lādiņu, kas tālāk piesaista negatīvi lādētos, t. sk. (OH^-) un (PO_4^{3-}), jonus no SĶŠ. Šis process sekmē pakāpenisku biomimētiska HAp slāņa augšanu. Biomimētiska HAp slāņa formēšanās un augšana shematiski parādīta 1.7. attēlā [153].



1.7. att. Biomimētiska HAp slāņa formēšanās uz CaP biokeramikas virsmas SĶŠ

Klīniski visatzītākie implantmateriāli it tādi, kas organismā rezorbējas jeb uzsūcas un tiek pilnībā aizvietoti ar jaunizveidotiem funkcionāliem audiem. Biorezorbējošu implantmateriālu gadījumā, ir svarīgi novērtēt to biorezorbciju, ko arī parasti veic *in vitro* testos, mākslīgos ķermeņa šķidrumos. Optimālā gadījumā implantmateriāla biorezorbcijai, kad tas ir ievietots dzīvā organismā, jānorit kontrolētā veidā, pārveidojoties netoksiskos produktos, ko organisms var pārstrādāt vielmaiņas procesos un izdalīt caur normāliem fizioloģiskiem mehānismiem. Respektīvi, ideālam implantmateriālam būtu jāuzrāda saistīšanos ar kaulu, stimulējot jaunu kaulaudu veidošanos mijiedarbības vietā, kombinācijā ar salīdzinoši augstu biorezorbcijas pakāpi, nodrošinot balansu starp kaulu veidošanos un implantmateriāla biorezorbciju [154-155]. Piemēram, β-TCP biokeramika implantēta dzīvā organismā biorezorbējas un pakāpeniski, ieaugot kaulaudiem, implants tiek pilnībā aizvietots. Tomēr aktuālākie klīniskie pētījumi liecina, ka β-TCP raksturīga pārāk strauja biorezorbcija [154]. Kaulu implantmateriālu degradācijas kinētikai *in vivo* jābūt salīdzināmai ar kaula augšanas kinētiku. Respektīvi, tā nedrīkst pārsniegt jaunā kaula augšanas kinētiku. β-TCP ir šķīstošs, kamēr HAp ir stabils fizioloģiskos apstākļos [156]. CaP implantmateriālu degradācijas kinētika var tikt kontrolēta, izmantojot BCP biokeramiku, kas sastāv no fizioloģiskos apstākļos stabilās HAp un šķīstošās β-TCP fāzes [153, 157-160]. BCP degradācija ir atkarīga no β-TCP/HAp fāžu attiecības biokeramikas maisījumā, t. i., jo augstāka ir Ca/P molārā attiecība jeb augstāks HAp saturs, jo zemāka ir degradācijas pakāpe. Tādi raksturlielumi kā ķīmiskais sastāvs, kristāliskums, graudu izmērs, morfoloģija, ģeometriskais un īpatnējais virsmas laukums un defekti spēlē svarīgu lomu biokeramikas degradācijā. Degradācija fizioloģiskā vidē ir atkarīga arī no implantmateriāla fizikālās formas (pulverveida, blīvas vai porainas granulas vai keramikas pamatnes utt.) [48, 154].



1.8. att. Iespējamie kalcija fosfātu biomateriālu degradācijas mehānismi *in vivo*

CaP materiālu iespējamie degradācijas mehānismi *in vivo* parādīti 1.8. attēlā. CaP degradācija organismā notiek fizikālķīmiskas šķīšanas vai šūnu darbības jeb tā sauktās biorezorbcijas, kā arī abu minēto procesu rezultātā [161].

Šķīšana ir fizikālķīmisks process, kuru ietekmē tādi faktori kā materiāla šķīdība, virsmas laukuma attiecība pret tilpumu, vides pH, šķidruma konvekcija un temperatūra. CaP šķīdības atkarība no vides pH normālā fizioloģiskā, t. i., (36,5 ± 0,5) °C temperatūrā, ir noteicošs faktors implantmateriāla šķīšanai, kas, savukārt, ietekmē materiāla osteokonduktivitāti [162]. Implantmateriāli, atrodoties ķermeņa šķidrumos, tiek pakļauti nepārtrauktiem šķīšanas un izgulsnēšanās procesiem, t. i., jonapmaiņai, kombinācijā ar olbaltumvielu adsorbciju uz materiāla virsmas. CaP šķīdība ir apgriezti proporcionāla Ca/P molārajai attiecībai, fāzes tīrībai un kristalītu/graudu izmēriem, kā arī tā ir tieši saistīta ar implantmateriāla porainību un virsmas laukumu. CaP šķīšana *in vitro* ir atkarīga no izmantotā buferšķīduma veida un koncentrācijas, pH, piesātinājuma, kā arī no produkta fizikālķīmiskajām īpašībām, tai skaitā daļiņu izmēriem, porainības, ķīmiskā sastāva, kā arī kristāliskuma [163].

Biorezorbcija ir svarīgs implantmateriālus raksturojošs parametrs, kam ir liela ietekme materiāla un dzīvo audu mijiedarbībā jeb saites starp implantmateriālu un dzīvajiem audiem veidošanā. Biorezorbcija ir atkarīga no tādiem implantmateriāla parametriem kā virsmas laukums [164, 165], ķīmiskais sastāvs [166] un kristāliskums [167], izmērs, mikrostruktūra, kā arī porainība, poru izmēru sadalījums [168]. Papildus iepriekš minētajiem, arī klīniskajiem faktoriem, piemēram, kaula defekta izmēram un lokalizācijai, vispārējam pacienta veselības stāvoklim un vecumam ir svarīga loma implantmateriālu rezorbcijā. Biorezorbcija tiek iedalīta:

1) fizikālķīmisku šķīšanas procesu ierosinātā sairšana;
2) šūnu fagocītiskās aktivitātes procesu ierosinātā, kas ir īpaši svarīga kaulu implantmateriālu gadījumā.

CaP biorezorbcija organismā ir dažādu līdzsvarā neesošu vienlaicīgi vai savstarpēji neatkarīgi noritošu procesu kopums. Visbiežāk CaP implantmateriālu rezorbcija organismā tiek aprakstīta kā šūnu, t. i., osteoklastu un makrofāgu aktivitātes ierosināts bioloģisks process. Osteoklasti piesaistās pie implantmateriāla virsmas un izdala karboanhidrāzes enzīmu vai citu skābi, kā rezultātā rodas lokāla pH pazemināšanās uz ~4 - 5, kas ierosina CaP materiālu šķīšanu. CaP nanodaļiņas organismā var tikt pakļautas osteoklastu fagocitozei, proti, tās tiek ietvertas osteoklastu citoplazmā un likvidētas enzīmu iedarbības rezultātā. Pētījumos ir noskaidrots, ka β-TCP biorezorbējas galvenokārt fizikāli ķīmiskas šķīšanas dēļ un osteoklastu loma tajā ir nenozīmīga. Savukārt, HAp saturoša CaP materiālu rezorbcija galvenokārt notiek osteoklastu

aktivitātes dēļ. Iespējams, ka atšķirības degradācijas uzvedībā starp HAp un β-TCP fāzēm ir saistītas ar mikrovides pH izmaiņām attiecīgā materiāla šķīšanas laikā. β-TCP šķīstot, pH vērtība pie materiāla virsmas ir augstāka kā HAp šķīšanas gadījumā [169]. CaP degradācijas produkti pamatā ir (Ca^{2+}) un (PO_4^{3-}) joni. CaP degradācijas produkti organismā darbojas kā iekaisuma reakcijas kavējoši aģenti, tādējādi veicinot audu atjaunošanās procesus [170]. Ņemot vērā iepriekšminēto faktu, ar bioloģiski aktīviem elementiem modificētu CaP implantmateriāli var tikt izmantoti kā terapeitisko jonu nesēji, piešķirot tiem specifiskas, piemēram, antibakteriālas un antiosteoporotiskas īpašības.

Citosaderības novērtējums ir ļoti būtisks, izstrādājot materiālus kaulaudu reģenerācijai, jo tas parāda šūnu un materiāla mijiedarbību. Citosaderības novērtēšanas testi var atšķirties ar:

a) izmantoto šūnu veidu (osteoblasti, fibroblasti, kaulu smadzeņu šūnas u.c.);
b) iedarbības laiku (no 24 h līdz vairākām nedēļām);
c) vērtētajiem parametriem (morfoloģija, proliferācija, šūnu aktivitāte u.c.);
d) vērtēšanas metodēm (MTT tests, citotoksicitātes tests, diferencēšanas marķieru kvantificēšana, optiskās mikroskopija vai fluorescences mikroskopija u.c.).

In vitro testos pierādīts, ka CaP materiāli spēj veicināt cilvēku osteoblastisko šūnu adhēziju un proliferāciju, veicinot jauno kaulaudu veidošanos tieši uz implanta virsmas [171]. Tādējādi apkārt implantmateriālam neveidojas fibrozo audu kapsula, kā tas parasti notiek sintētisku materiālu, t. i., svešķermeni ievietojot mīkstajos audos. Imūnatbildes attīstības laikā lokālā bioloģiskā vide atšķiras no veselu audu bioloģiskās vides, jo svešķermenis izraisa atbildes reakciju, pieaug enzīmu, fibrozo daļiņu veidojošo olbaltumvielu un gigantisko šūnu skaits [50].

1.4.1. Mg ietekme uz CaP biokeramikas mijiedarbību ar dzīvajiem audiem

Mg iekļaušana kaulu implantmateriālos uz CaP bāzes ir svarīga vairāku iemeslu dēļ, ieskaitot dziļāku izpratni par dabīgā kaula biomineralizācijas procesu, materiāla bioaktivitātes paaugstināšanu un jonu piegādi, kas kavē kaulu slimību, t. sk. osteoporozes attīstību. Pateicoties Mg ietekmei uz CaP fizikālķīmiskajām īpašībām, modificēšana ar Mg var kalpot kā līdzeklis, lai kontrolētu CaP implantmateriālu bioloģisko saderību, t. i., nodrošinātu kaulaudu augšanai labvēlīgus apstākļus. Atgriežoties pie 1.3.2. apkašnodaļā apskatītās Mg ietekmes uz HAp un β-TCP struktūru, HAp modificēšana ar Mg izraisa kristalītu izmēru, elementārās šūnas parametru samazināšanos un šķīdības paaugstināšanos [48, 138, 154, 172]. Savukārt, iekļaujot Mg (ar

atoma rādiusu 0,135 nm) β-TCP struktūrā, kur tie aizstāj Ca ar rādiusu 0,198 nm, tiek palielināta β-TCP fāzes strukturālā stabilitāte un pazemināta tās šķīdība [65, 69, 83, 173].

Zinātniskajā literatūrā atrodami salīdzinoši daudz pētījumu, kas apstiprina Mg pozitīvo ietekmi uz CaP bioaktivitāti un mijiedarbību starp dabīgo kaulu un uz HAp bāzes veidotiem implantmateriāliem. *In vitro* pētījumos noskaidrots, ka Mg veicina bioloģiskā HAp formēšanos uz HAp biomateriālu virsmas mākslīgajos ķermeņa šķidrumos, kas ir viens no biomateriālu bioloģiskās saderības vērtēšanas kritērijiem. *Ko et al.* publicējis pētījumus, kas pierāda, ka HAp ar Mg saturu līdz 2 % (molu) raksturīga ievērojami labāka osteoblastu adhēzija uz virsmas, salīdzinājumā ar nemodificētu HAp, taču augstāka Mg koncentrācija izraisa pretēju efektu [174]. Savukārt, *Otsuka et al*. aprakstījis Mg saturošu CaP keramikas pozitīvo ietekmi uz jauna kaulu augšanu *in vivo*. *Landi et al.* novērojis paaugstinātu osteokonduktivitāti un biorezorbciju *in vivo* salīdzinājumā ar nemodificētu HAp [175].

Visu iepriekšminēto pētījumu rezultāti apstiprina, ka modificēšana ar Mg var kalpot kā līdzeklis implantmateriālu uz CaP bāzes bioloģiskās saderības uzlabošanai. Tomēr zinātniskajā literatūrā ir pieejama ierobežota informācija par sistemātiskiem salīdzinošiem pētījumiem par dažādu Mg koncentrācijas un HAp/β-TCP fāžu attiecību kombināciju ietekmi uz biokeramikas fizikālķīmiskajām īpašībām un bioloģisko saderību. Turklāt trūkst *in vitro* pētījumu, kas detalizēti izskaidrotu Mg saturošas CaP biokeramikas degradācijas procesus un to ietekmi uz materiāla bioloģisko saderību.

1.5. Mg loma cilvēka organismā

Mg ir viens no dzīvā organisma nozīmīgākajiem elementiem, un tas galvenokārt koncentrējas dentīnā un zobu emaljā, kā arī kaulaudos (60–65 %). Tas ir ceturtais visizplatītākais katjons cilvēka ķermenī pēc (Na^+), (K^+) un (Ca^{2+}) joniem. Zobu emalja satur 0,44 %, dentīns 1,23 % un kauls 0,72 % Mg. Atlikušie 35–40 % ir izkliedēti pārējā ķermenī, proti, muskuļu audos, nervos un citos mīkstajos audos, un ķermeņa šķidrumos [175]. Indivīdam novecojot, palielinās Mg saturs cilvēka organismā. Cilvēkam piedzimstot, Mg saturs organismā ir ~760 mg, pieauguša cilvēka ar ķermeņa masu ~70 kg organismā ir 22–26 g Mg [176]. Šim elementam ir liela nozīme gandrīz visās vielmaiņas starpreakcijās, kurās tas darbojas kā fosfora pārneses fermenta, proti, ATP, aktivētājs. Mg ir aktīvs fermentatīvo procesu katalizators. Mg sāļiem ir antiseptiska iedarbība. Tie paplašina asinsvadus, pazemina arteriālo spiedienu un holesterīna saturu asinīs, nomierina nervu sistēmu un tiem ir liela loma vēža profilaksē un ārstēšanā. Mg piedalās svarīgās ķermeņa funkcijās, ieskaitot muskuļu aktivitāti, palīdzot tiem

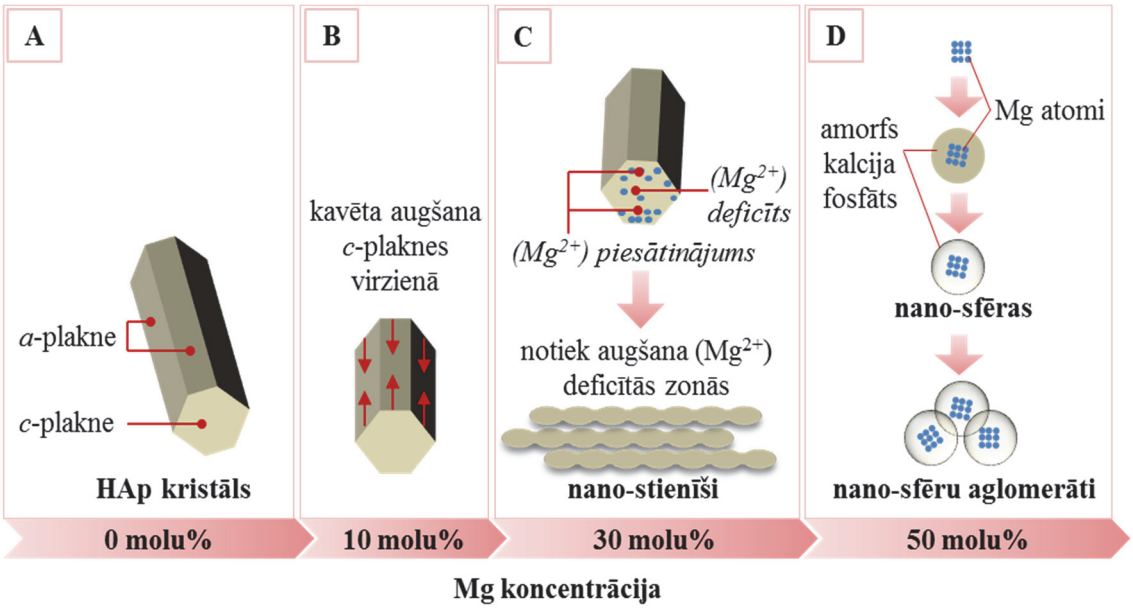
sarauties un izplesties, nervu sistēmas un stabilas sirdsdarbības uzturēšanā. Vairāk nekā 100 enzīmu darbībai organismā ir nepieciešams Mg, t. sk. ATP, kas ir enerģijas avots organismā notiekošiem procesiem, sintēzei un utilizāciju veicošo enzīmu darbībai [147]. Tāpat kā Ca, optimāls Mg saturs organismā nodrošina stiprus un veselīgus kaulus un samazina osteoporozes risku. Mg ir tieši saistīts ar mineralizāciju, stimulējot osteoblastu darbību.

Optimāla Mg diennakts deva pieaugušajiem ir ~0,7 g.

Mg trūkums jeb deficīts novērojams, ja ir nieru nepietiekamība, smagos badošanās vai hroniska alkoholisma gadījumos. (Mg^{2+}) jonu pārākums organismā izraisa minerālvielu apmaiņas traucējumus. (Mg^{2+}) jonu apmaiņas līdzsvara izjaukšana izraisa mirstību no sirds-asinsvadu un kuņģa-zarnu trakta slimībām. Mg deficīts jeb hipomagnēzija organismā ietekmē skeleta vielmaiņas procesus, traucējot osteoblastu un osteoklastu aktivitāti, respektīvi, kavējot kaulaudu normālu augšanu, un izraisa kaulu trauslumu un kaulu masas pazemināšanos, kam seko mehānisko īpašību pasliktināšanās. Tādējādi hipomagnēzija organismā ir tieši saistīta ar osteopēnijas jeb osteoporozes sākuma stadijas attīstību [177, 178]. Mg deficīts organismā izraisa membrānu disfunkciju jeb traucētu homeostāzi, paaugstinātu oksidatīva stresa uzņēmību, paaugstinātu sirds un asinsvadu slimību risku, kā arī elektrolītu - (K^{+}), (Na^{+}) un (Ca^{2+}) - disbalansa rezultātā pazemina šūnu aktivitāti.

Par spīti Mg pierādītajai bioloģiskajai aktivitātei, tā pastiprināta uzņemšana ar pārtiku vai medikamentiem var novest pie hipermagnēzijas organismā. Hipermagnēzija, kas ir paaugstināts Mg saturs organismā, veicina audzēju veidošanos [179, 180]. Hipermagnēzijas rašanās risks pastāv arī izmantojot Mg saturošus biomateriālus slimo vai bojāto kaulu labošanā un reģenerācijā. Jāņem vērā, ka paaugstināta Mg koncentrācija implantēšanas vietā būtiski ietekmē kaulu minerālās komponentes jeb bioloģiskā HAp morfoloģiju, kristāliskumu un augšanas ātrumu. Dažādu (Mg^{2+}) jonu koncentrāciju ietekme uz HAp kristalītu augšanu shematiski parādīta 1.9. attēlā. Literatūrā atrodamā informācija liecina, ka Mg iekļaušanās HAp kristāliskajā struktūrā ir ierobežota līdz 10 % (molu), saglabājot HAp fāzes tīrību [181]. Mg koncentrācija līdz 10 % (molu) kavē HAp kristalītu augšanu *c*-plaknes virzienā. Paaugstinot Mg saturu līdz 30 % (molu), tiek veicināta jonu adsorbcija un kristalītu virsmas, izraisot ar (Mg^{2+})-piesātinātu un (Mg^{2+})-deficītu zonu veidošanos. (Mg^{2+}) jonu adsorbcija uz HAp kristalītu virsmas kavē to tālāku augšanu - notiek HAp kristalītu augšana (Mg^{2+})-deficītās zonās, bet apstājas to augšana (Mg^{2+})-piesātinātas zonās. Respektīvi, notiek HAp kristalītu augšana divās dimensijās. Sasniedzot Mg koncentrāciju 50 % (molu), HAp kritalītu augšana tiek pilnībā apturēta. Pateicoties Mg adsorbcijai uz izveidojušos kristalītu virsmas, formējas

atomu sakārtojumi, kam raksturīga tuvā kārtība. Atomu sakārtojumi ar ACP apvalku veido dobu nano-sfēru aglomerātus. Secināms, ka Mg koncentrācija starp 30 % (molu) un 50 % (molu) veicina kristāliskās HAp fāzes pāreju amorfajā. Lai gan esošie rezultāti ir iegūti mākslīgos apstākļos un ir attālināti no reāliem *in vivo* apstākļiem, tie prezentē augstas Mg koncentrācijas toksisko efektu *in situ* implantēšanas vietā [182].



1.9. att. Mg koncentrāciju ietekme uz HAp kristālu augšanu

Izpētīts, ka Mg kavē ACP pārkristalizēšanos par HAp, kas, savukārt, veicina vitlokīta formēšanos organismā. Par vitlokītu dēvē organismā sastopamo minerālu, kas atbilst β-TCP kristāliskajai struktūrai, kurā Ca atomi daļēji aizstāti ar Mg atomiem. Vitlokīts sastopams dzīvā organismā gan veselos, gan patoloģiskos audos. Saskaņā ar jaunākajiem pētījumiem, vitlokīts atrodams arī veselajos organisma audos – kaulaudos, zobos. Vitlokīts ir sastopams zobakmens, urīnakmeņu, zobu kariesa, siekalu dziedzeru akmeņu sastāvā, kā arī osteoartrīta jeb deformējošās artrozes un mīksto audu pārkaļķošanās procesā. Patoloģisku pārkaļķotu audu izmeklējumos, konstatēts, ka bieži vitlokīts kļūdaini tiek attiecināts uz bioloģisko HAp, īpaši, tuberkulozes izraisītas distrofiskas pārkaļķošanās gadījumos [183]. Padziļināti pētījumi par vitlokīta formēšanos un īpašībām varētu paplašināt zināšanas par Mg lomu vielmaiņas procesos. Multidisciplināri, sasaistot histoloģiskos izmeklējumus un kristalogrāfiju, pētījumi sniegtu padziļinātu izpratni par vitlokīta lomu, piemēram, pārkaļķošanas procesos, kā arī pavērtu jaunas iespējas medicīniskajā diagnostikā.

LITERATŪRAS APSKATA KOPSAVILKUMS

CaP, t. sk. HAp un β-TCP, biokeramikai piemīt lieliska bioloģiskā saderība, bioaktivitāte un/vai biorezorbcija, kā arī osteokonduktivitāte, pateicoties šo implantmateriālu līdzībai ar kaulu un zobu minerālo komponenti, un tādējādi tā tiek plaši pielietota biomedicīnā [184]. Pirmo reizi komerciālu CaP implantmateriālu izmantošana fiksēta pirms ~40 gadiem [1]. Lai kontrolētu CaP implantmateriālu bioloģisko aktivitāti dzīvajā sistēmā, t. i., nodrošinātu kaulaudu reģenerācijai labvēlīgus apstākļus, ir svarīgi iegūt biokeramiku ar vēlamu ķīmisko un fāžu sastāvu [185]. Divfāžu sistēmas, t. i., BCP biokeramikas, izmantošana balstās uz optimālu līdzsvaru starp stabilo un bioaktīvo HAp fāzi un biorezorbējošo β-TCP fāzi, kas nodrošinātu kontrolētu biorezorbcijas kinētiku organismā [141]. Veiksmīgai bojāto kaulu labošanai ir svarīgi pilnībā izprast CaP implantmateriālu un bioloģiskās vides mijiedarbību.

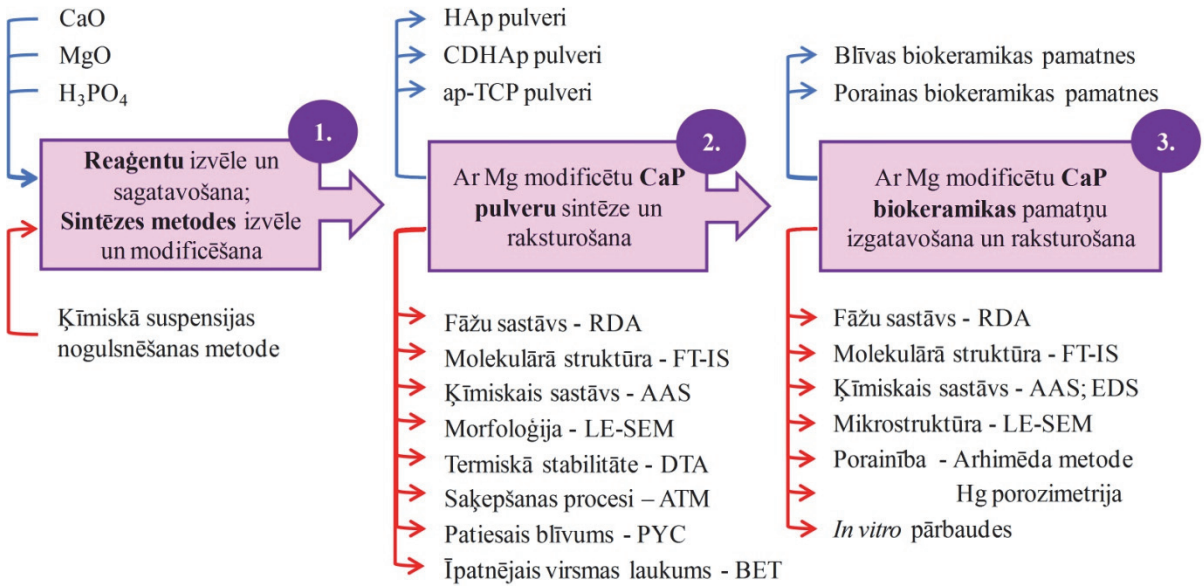
Pēdējās desmitgades pētījumos pierādīts, ka dažādus bioloģiski aktīvus elementus, t. sk. Mg, saturoši implantmateriāli stimulē jaunu kaulaudu veidošanos *de novo* implantēšanas vietā. Veicot literatūras analīzi, secināts, ka Mg saturoši implantmateriāli stimulē jaunu kaulaudu veidošanos osteoporozes skartajos kaulaudos [146]. Mg iekļaušana CaP struktūrā var būtiski ietekmēt attiecīgās biokeramikas fizikālķīmiskās īpašības, kas savukārt nosaka šī materiāla bioaktivitāti. Tomēr zinātniskajā literatūrā ir pieejama ierobežota informācija par sistemātiskiem, salīdzinošiem pētījumiem par dažādu Mg koncentrāciju un HAp/β-TCP fāžu attiecību kombināciju ietekmi uz biokeramikas fizikālķīmiskajām un bioloģiskajām īpašībām.

Pamatojoties un literatūras analīzi, tika izvirzīts mērķis eksperimentālā pētījuma ietvaros izstrādāt ar Mg modificētu CaP biokeramikas pamatnes un izpētīt Mg satura, kā arī HAp/β-TCP fāžu attiecības ietekmi uz osteoblastu un osteogēno cilmes šūnu aktivitāti mijiedarbībā ar izstrādātajām CaP biokeramikas pamatnēm. Lai sasniegtu šo mērķi, plānots veikt detalizētus biokeramikas fizikālķīmisko īpašību un *in vitro* pētījumus.

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

2.1. Eksperimentālā darba shēma un izmantotais laboratorijas aprīkojums

Eksperimentālā darba principiāla shēma parādīta 2.1. attēlā un izmantotais laboratorijas aprīkojums uzskaitīts 2.1. tabulā.



2.1. att. Eksperimentālā darba principiāla shēma

2.1 .tabula

Eksperimentālajā darbā izmantotais laboratorijas aprīkojums

Aprīkojums	**Nosaukums un raksturojums**
Mufeļkrāsns	Nabertherm LHT 08/17 $T_{max\ darba}$ = 1650 ºC Precizitāte ± 3 ºC
Analītiskie laboratorijas svari	Kern 770 m_{max} = 220 g m_{min} = 0,0001 g
Ūdens dejonizators	Adrona Crystal
Planetārās bumbu dzirnavas	FRITCH planetary mill PULVERISETTE 5 50- 400 apgr./min V_{darba} = 10–900 mL Ahāta maļķermeņi, Ø10 mm
Laboratorijas reaktors	IKA EUROSTAR Power Control-Visc P7 V_{darba} = 500-2000 mL T_{darba}= 20-230 ºC Enkurveida maisītājs, 8–290 apgr./min

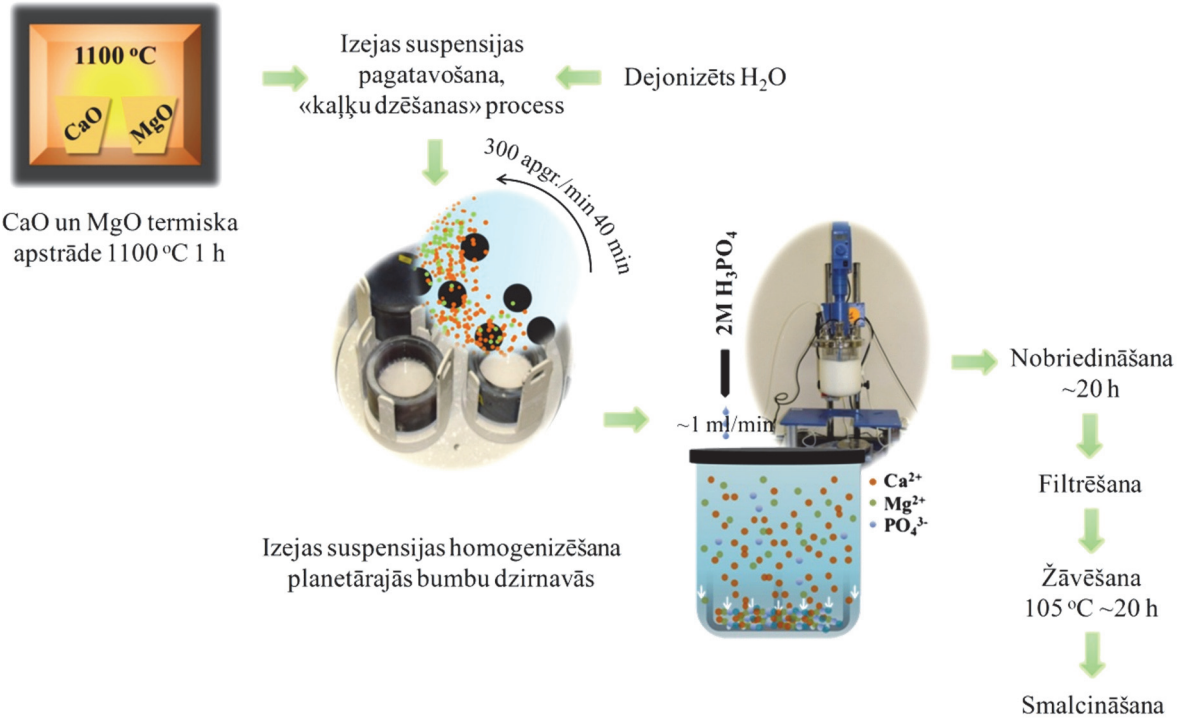
Aprīkojums	Nosaukums un raksturojums
Laboratorijas elektriskā plītiņa ar temperatūras sensoru	IKA RCT basic *T* precizitāte ar sensoru ± 1 ºC T_{darba} = 20-310 ºC
Titrēšanas sistēma	TITRONIC® $V_{stikla\ tvertnei}$ = 1000 mL $V_{biretei}$ = 20 mL Dozēšana 0,01–999,99 mL Dozēšanas precizitāte 0,15% no nominālā *V*
pH-metrs	ino Lab pH720 pH_{darba} = 0 - 14 T_{darba} = -5–105 ºC *pH* precizitāte ± 0,01 *T* precizitāte ± 1 ºC Kalibrēšanas šķīduma precizitāte ± 0,1
Filtrēšanas sistēma	Bunzena kolba, Bihnera piltuve, vakuumsūknis
Universālā krāsns, inkubators	Memmert Excellent T_{max} = 220 °C Precizitāte ± 1 ºC
Multifunkcionālā prese ar hidraulisko cilindru	P/O/WEBER PW 40 PK max spiediena spēks 100 kN
Vibrējošie sijāšanas sieti	FRITSCH analysette 3
Atomabsorbcijas spektrometrs (AAS)	Varian SpetrAA880
Rentgendifraktometrs (RDA)	PANalyticalX'Pert Pro
Automātiskā sorbcijas iekārta (*Brunauera-Emeta-Tellera* metode) (BET metode)	QUADRASORB SI Kr
Lauka emisijas skenējošais elektronu mikroskops (LE-SEM)	Tescan Mira\LMU
Piknometrs (PYC)	Micrometrics AccuPyc 1330; Micrometrics AccuPyc 1340
Furjē transformāciju infrasarkanais spektroskops (FT-IS)	Varian 800 FT-IR Scimitar Series
Diferenciāltermiskais analizators (DTA)	BAHR Thermoanalyse DTA 703
Augsttemperatūras mikroskops (ATM)	EMO-1750/30-K
Hg porozimetrs	Quantochrome Pore Master
Titrēšanas stacija	Mettler Toledo, Titration Excellence T50
Kalcija jonu selektīvais elektrods (Ca-ISE)	Mettler Toledo, perfectION™

2.2. Ar Mg modificētu CaP biokeramikas pamatņu izgatavošana

2.2.1. Ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursoru sintēze

Ar Mg modificētu CaP – HAp, CDHAp un ap-TCP sintēzes veiktas, izmantojot RTU Rūdolfa Cimdiņa Rīgas Biomateriālu inovāciju un attīstības centrā izstrādātu metodi, kas piemērota gan nemodificētu, gan modificētu CaP iegūšanai [186]. Katra sintēze atkārtota vismaz 3 reizes. Sintēzes procesa shēma parādīta 2.2. attēlā.

Metode balstīta uz neitralizācijas reakciju starp $Ca(OH)_2$ un H_3PO_4. Ar Mg modificēti CaP pulveri sintezēti no kalcija oksīda (CaO, *puriss*., 85 %, *Fluka*, Vācija), magnija oksīda (MgO, *reagent-grade*, *ES/Scharlau*, Spānija) un 2 M H_3PO_4 (75 % H_3PO_4 šķīdums, *puriss*., *Sigma-Al*drich, Vācija) ūdens šķīduma. Dažāds Mg saturs sintēžu produktos nodrošināts, mainot sintēzes vidē pievienotā Mg prekursora (MgO) daudzumu. Pievienotā Mg prekursora daudzumi izvēlēti ar mērķi iegūt aizvietotus HAp, CDHAp un ap-TCP produktus ar zemu, tuvu dabīgajā kaulā esošajam (~1 % (masas)) Mg saturam. MgO apjoms norādīts % (masas) attiecībā pret Ca prekursora – CaO, daudzumu sintēzes vidē.



2.2. att. Ar Mg modificētu CaP pulveru sintēzes procesa principiāla shēma

Sintēžu produktu apzīmējumi un attiecīgajās sintēzēs pievienotā MgO daudzumi, kā arī attiecīgo sintēžu svarīgākie tehnoloģiskie parametri uzrādīti 2.2. tabulā.

2.2. tabula

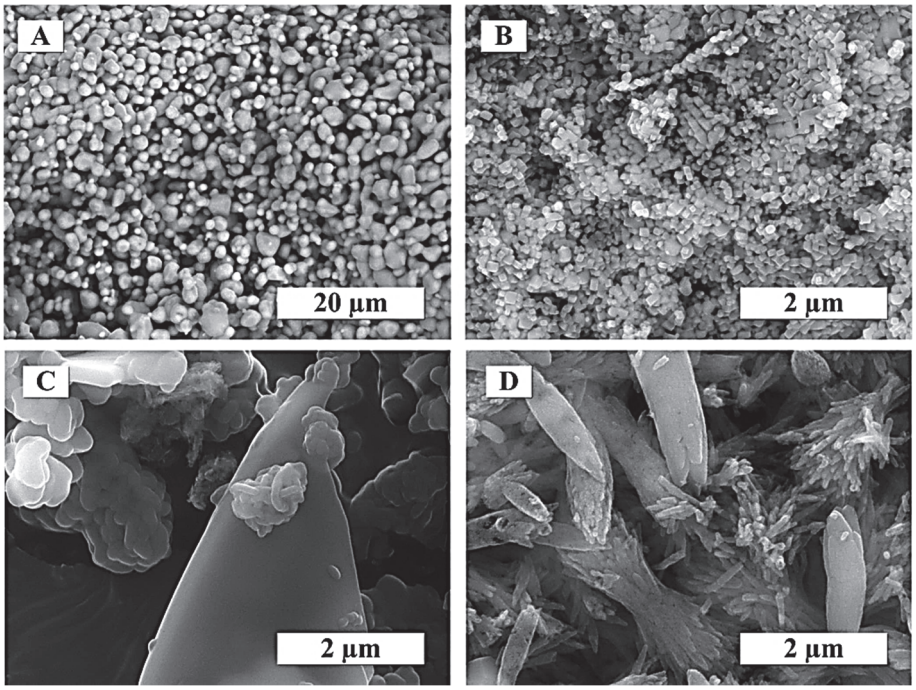
Ar Mg modificētu CaP prekursoru pulveru sintēžu beigu pH, T un sintēzes vidē pievienotais Mg prekursora daudzums

Fāžu sastāvs	**Sintēžu produktu apzīmējums**	***pH*$_{beigu}$**	***T*, °C**	**Plānotā HAp/β-TCP attiecība pēc augsttemperatūras apstrādes (1100 °C, 1 h)**	**(Ca + Mg)/P izejas suspensijā**	**Pievienotā MgO daudzums, % (masas)**	**Plānotais Mg saturs, % (masas)**
HAp	HAp	8,8 ± 0,1	45	100/0	1,67	0	0
	1.0 Mg-HAp					1,0	0,34
	2.0 Mg-HAp					2,0	0,68
	3.0 Mg-HAp					3,0	1,02
CDHAp	BCP (80/20)	7,3 ± 0,1	45	80/20	1,63	0	0
	1.0 Mg-BCP (80/20)					1,0	0,34
	2.0 Mg-BCP (80/20)					2,0	0,68
	BCP (70/30)	7,0 ± 0,1	45	70/30	1,61	0	0
	1.0 Mg-BCP (70/30)					1,0	0,34
	2.0 Mg-BCP (70/30)					2,0	0,68
	BCP (60/40)	5,9 ± 0,1	45	60/40	1,60	0	0
	1.0 Mg-BCP (60/40)					1,0	0,34
	2.0 Mg-BCP (60/40)					2,0	0,68
ap-TCP	β-TCP	6,0 ± 0,1	25 jeb «istabas»	0/100	1,50	0	0
	1.0 Mg-β-TCP					1,0	0,34
	2.0 Mg-β-TCP					2,0	0,68
	3.0 Mg-β-TCP					3,0	1,02

2.2.1.1. Izejas suspensijas pagatavošana

Sintēzes pirmais posms ir izejas suspensijas sagatavošana.

Ar mērķi uzlabot izejvielu reaģētspēju, kā arī, lai atbrīvotos no adsorbētā H_2O un CO_2, komerciālie CaO (skat. 2.3. att. (A)) un MgO (skat. 2.3. att. (B)) pulveri pirms sintēzes termiski apstrādāti 1100 ^oC.



2.3. att. A – komerciālā CaO, B – komerciālā MgO, C – «kaļķu dzēšanas» procesā iegūtas izejas suspensijas un D - planetārajās bumbu dzirnavās (300 apgr./min 40 min) homogenizētas izejas suspensijas LE-SEM mikrofotogrāfijas

Izejas $Ca(OH)_2$ vai $Ca(OH)_2/Mg(OH)_2$ suspensijas ar (Ca^{2+}) un (Mg^{2+}) kopējo molāro koncentrācija 0,15 mol/L pagatavotas, izmantojot «kaļķu dzēšanas» procesu, cieto fāzi disperģējot dejonizētā H_2O (elektrovadītspēja 5,5 µS/m). CaO un/vai MgO pulvera un ūdens mijiedarbības rezultātā veidojas $Ca(OH)_2/Mg(OH)_2$ suspensija (skat. 2.3. att. (C)). Lai nepieļautu maisījuma pārkaršanu ūdens pievienošanas procesā («kaļķu dzēšanas» procesā), destilētā H_2O pievienošana veikta vienmērīgi, nepārtraukti maisot reakcijas maisījumu, līdz CaO un MgO ir pilnībā izreaģējuši un iegūta $Ca(OH)_2/Mg(OH)_2$ suspensija, par ko liecina reakcijas vides temperatūras pazemināšanās līdz istabas temperatūrai. $Ca(OH)_2/Mg(OH)_2$ suspensija iegūta smalkdispersu daļiņu aglomerātu formā, kā arī satur lielus plākšņveida $Ca(OH)_2$ un/vai $Mg(OH)_2$ kristālus, kas, iespējams, radušies lēnas CaO un/vai MgO reakcijas

ar H_2O rezultātā. Lai novērstu heterogēnas suspensijas veidošanos un iegūtu homogēnu daļiņu lieluma sadalījumu, kā arī novērstu aglomerātu veidošanos, papildus tika veikta «kaļķu dzēšanas» procesā iegūtās izejas suspensijas homogenizēšana, maļot planetārajās bumbu dzirnavās (*FRITSCH planetary mill PULVERISETTE 5*) 40 min ar ātrumu 300 apgr./min. Pēc apstrādes planetārajās bumbu dzirnavās iegūta izejas suspensija ar sferulītveida[13] kristālu morfoloģiju (skat. 2.3. att. (D)).

2.2.1.2. Nogulsnēšanās reakcijas realizēšana

Pēc izejas suspensijas homogenizēšanas veikta nogulsnēšanās reakcija laboratorijas reaktorā (*IKA EUROSTAR Powercontrol*), kas aprīkots ar enkurveida maisītāju. Kopējais sintēzes darba tilpums ir 2 L. Lai nodrošinātu 2 M H_3PO_4 ūdens šķīduma vienmērīgu un kontrolētu pievienošanu izejas suspensijai, izmantota titrēšanas sistēma (*TITRONIC®*). Skābes šķīdums sintēzes vidē pievienots pilienveidā (~1 mL/min) līdz tiek sasniegts nepieciešamais pH_{beigu} HAp, CDHAp un ap-TCP, attiecīgi HAp, β-TCP vai BCP prekursoru, stehiometrijas iegūšanai, kā norādīts 2.2. tabulā. Reakcijas maisījuma *pH* kontrolēšanai izmantots pH-metrs (*inoLab pH720*). Reakcijas maisījums tiek nepārtraukti maisīts ar ātrumu 100 apgr./min. Ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas prekursori jeb ap-TCP pulveri iegūti, realizējot nogulsnēšanās reakciju 25 ºC jeb «istabas» temperatūrā. Savukārt, HAp un CDHAp pulveru iegūšanai nodrošināta paaugstināta, konstanta reakcijas maisījuma temperatūra, t. i., 45 ºC. HAp un CDHAp sintēžu gadījumā, konstantas reakcijas maisījuma temperatūras nodrošināšanai, laboratorijas reaktora trauks ievietots ūdens vannā un sildīts, izmantojot ar temperatūras sensoru aprīkotu elektrisko plītiņu (*IKA RCT basic*).

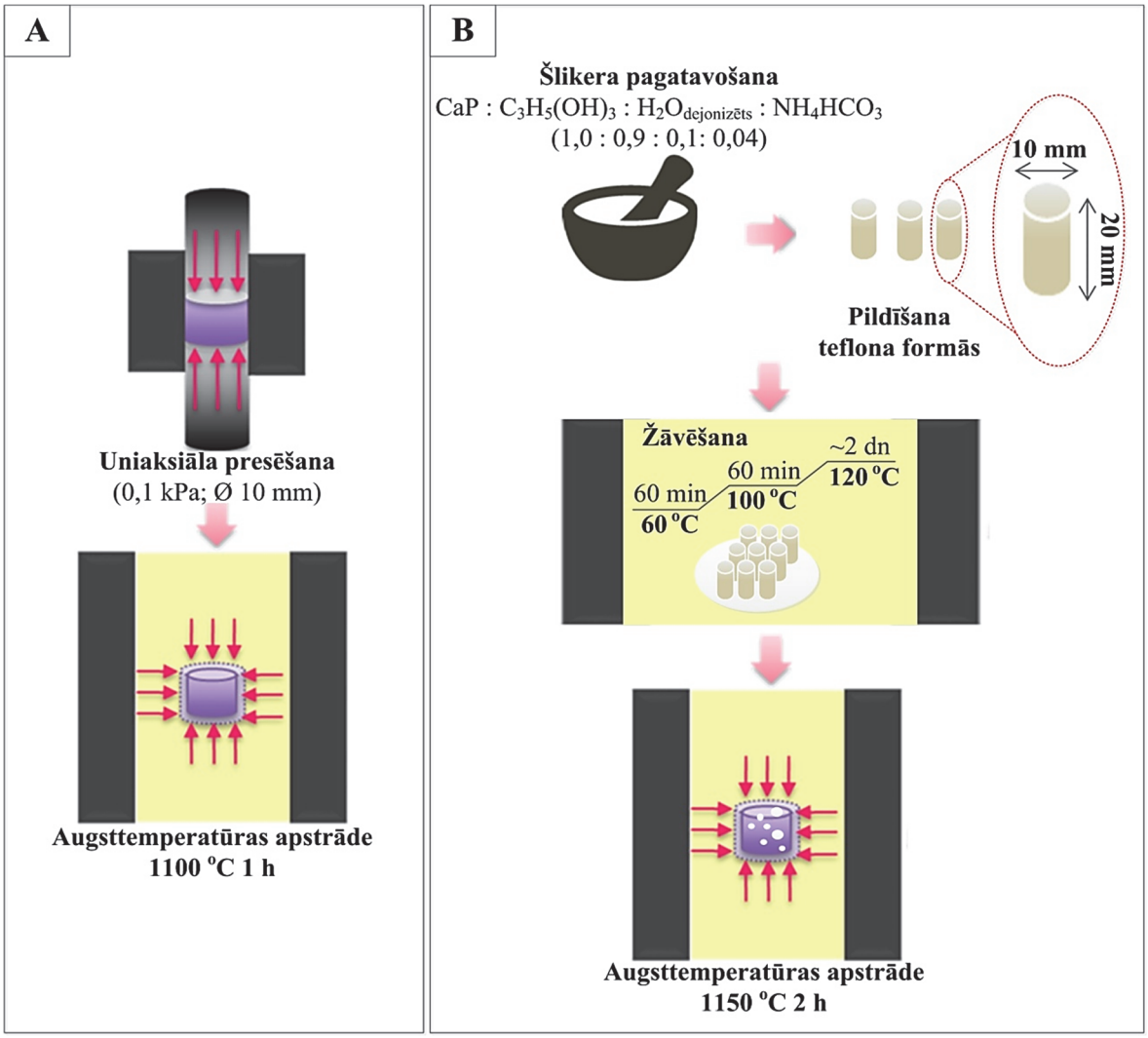
Pēc pH_{beigu} sasniegšanas, reakcijas maisījums stabilizēts 1 h, nepārtraukti maisot, kam seko iegūto nogulšņu nobriedināšana ~20 h. Pēc nobriedināšanas nogulsnes filtrē, izmantojot filtrēšanas sistēmu ar Bunzena kolbu, Bihnera piltuvi un vakuumsūkni. Nofiltrētās nogulsnes žāvē žāvskapī (*Memmert Excellent*) 105 ºC ~ 20 h. Izžāvētās nogulsnes saberž piestā, iegūstot pulverveida materiālu, kas turpmāk izmantots biokeramikas pamatņu izgatavošanai.

2.2.2. Ar Mg modificētu CaP biokeramikas pamatņu izgatavošana

Ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursoru pulveri izmantoti gan blīvu, gan porainu biokeramikas pamatņu izgatavošanai. Blīvas biokeramikas pamatnes iegūtas, prekursoru

[13] Sferulītveida kristāli – adatveida kristalīti, kas aug no kristalizācijas centra.

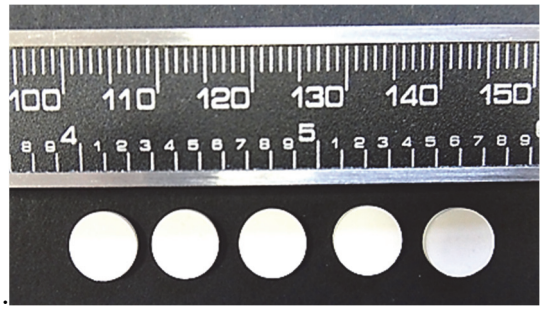
pulverus uniaksiāli presējot, un sekojošu iegūto presķermeņu augsttemperatūras apstrādi, kā ilustrēts 2.4. attēlā (A). Savukārt, porainas biokeramikas pamatnes izstrādes, izmantojot viskozas masas uzputošanas metodi un zaļķermeņu augsttemperatūras apstrādi, principiāla shēma parādīta 2.4. attēlā (B).



2.4. att. A – blīvu un B – porainu ar Mg modificētu CaP biokeramikas pamatņu iegūšanas principiāla shēma

2.2.2.1. Blīvu biokeramikas pamatņu izgatavošana

Saskaņā ar 2.4. attēlā (A) parādīto principiālo shēmu, uniaksiāli presējot, izmantojot multifunkcionālo presi (*P/O/WEBER PW 40 PK*) (F = 10 kN) ar hidraulisko cilindru (d = 10 mm) iegūti ar Mg modificētu HAp, CDHAp un ap-TCP presķermeņi. Pēc presķermeņu augsttemperatūras apstrādes (gaisā) mufeļkrāsnī (*Nabertherm LHT 08/17*) 1100 °C ar izturēšanas laiku 1 h, iegūti cilindriskas formas biokeramikas pamatnes (skat. 2.5. att.).



2.5. att. Ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursoru pulveru presķermeņi pēc augsttemperatūras apstrādes 1100 ºC 1 h

2.2.2.2. Porainu biokeramikas pamatņu izgatavošana

Porainu ar Mg modificētu CaP biokeramikas pamatņu izgatavošanai izmantota adaptēta viskozās masas uzputošanas metode, kuras principiāla shēma parādīta 2.4. attēlā (B) [187].

Prekursoru pulverus sijā, izmantojot vibrējošos sijāšanas sietus (*FRITSCH analysette 3*). Poraino pamatņu izgatavošanai izmantota frakcija ar daļiņu izmēru zem 100 μm. Viskozā masa iegūta, samaisot prekursora pulveri, glicerīnu (> 99,8%, *M* = 92,09 g/mol, SIA «BIO-VENTA», Latvija), dejonizētu H_2O un NH_4HCO_3 (≥ 99 %, *Sigma-Aldrich*, Vācija). Glicerīns izmantots ar mērķi iegūt plastisku šlikeri. Poru veidojošais aģents šajā metodē ir NH_4HCO_3, kura daļiņu izmērs ir 100–300 μm. Attiecīgais CaP pulveris pakāpeniski pievienots glicerīna un dejonizēta H_2O maisījumam, nepārtraukti maisot, līdz iegūst homogēnu, viskozu masu. Viskozo masu pilda teflona formiņās, kuru augstums ~20 mm un diametrs ~10 mm. Paraugus žāvē žāvskapī, pakāpeniski paaugstinot temperatūru, lai ierosinātu viskozās masas uzputošanu, temperatūras (60 ºC) ietekmē sadaloties NH_4HCO_3, kam seko zaļķermeņu žāvēšana: 60 ºC, 1 h → 100 ºC, 1 h → 120 ºC, ~2 diennaktis. Porainos zaļķermeņus apdedzina mufeļkrāsnī «Nabertherm LHT 08/17», gaisa vidē, 1150 ºC izturot 1 h.

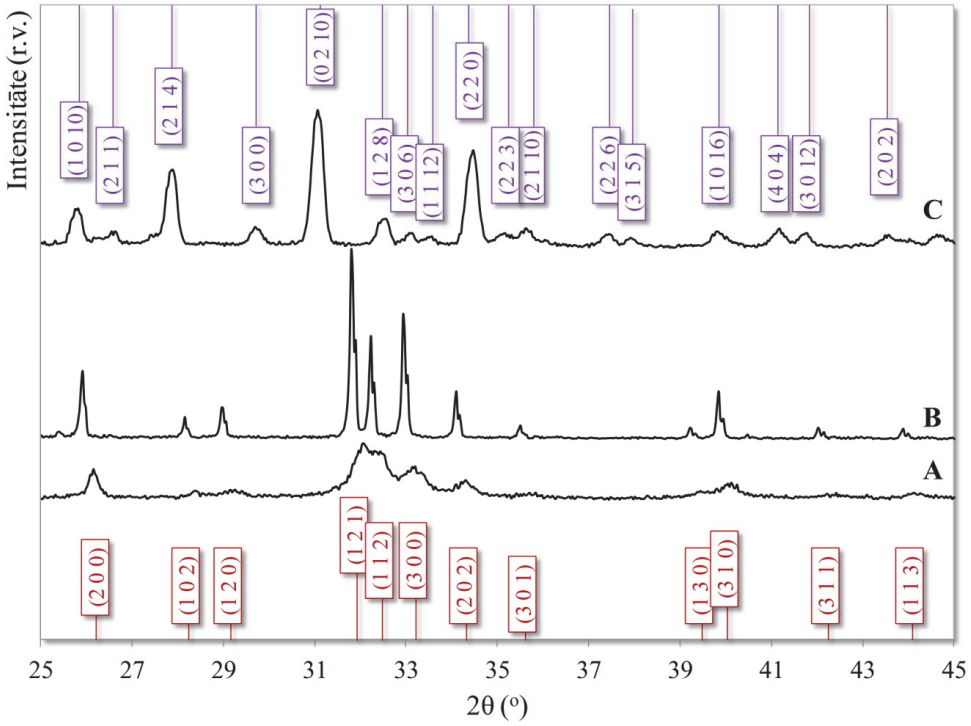
2.3. Sintēžu produktu fizikālķīmisko īpašību raksturošanai izmantotās metodes

2.3.1. Rentgenstaru pulverdifrakcija

Ar Mg modificētu CaP produktu kristālisko fāžu sastāva un kristāliskuma analīze veikta, izmantojot RDA. Eksperimentālā darbā paraugu analīzei izmantots rentgenstaru difraktometrs (*PANalytical, X'Pert PRO*) ar vara (Cu) Kα starojumu (λ = 1,5406 Å), spriegumu 40 kV un anodstrāvu 30 mA. RDA ainas uzņemtas rotējošā režīmā, izmantojot daudzpunktu detektoru,

2θ diapazonā no 5° līdz 70° ar skenēšanas soli 0,0334°. Rentgenogrammu apstrādei un analīzei izmantota datorprogramma *X'Pert Data Viewer*.

Kristālisko fāžu identifikācijai izmantota Starptautiskā difrakcijas datu cantra datu bāze PDF-2/2005. HAp fāzes identifikācijai izmantots datubāzes ieraksts Nr. 01-072-1243, β-TCP fāzes identifikācijai - ieraksts Nr. 00-009-0169 (skat. 2.6. att.).



2.6. att. A - sintezēta un B - augsttemperatūrā apstrādāta HAp raksturīgo difrakcijas maksimumu indeksi saskaņā ar PDF-2/2005 datubāzes ierakstu Nr. 01-072-1243, un C – β-TCP raksturīgo difrakcijas maksimumu indeksi saskaņā ar PDF-2/2005 datubāzes ierakstu Nr. 00-009-0169

Biokeramikas prekursoru pulveru vidējais kristalītu izmērs (tilpuma mērs) tika aprēķināts pēc Šērera vienādojuma (2.1):

$$D = \frac{k \cdot \lambda}{FWHM \cdot cos\theta}, \qquad (2.1)$$

kur D – vidējais kristalītu izmērs, nm;

k – kristalītu formas faktora konstante (iegareniem apatīta kristalītiem – 0,9);

λ – rentgenstara viļņa garums, nm (Cu Kα starojumam λ = 0,15406 nm);

$FWHM$ – difrakcijas maksimuma pilns pusplatums pie pusintensitātes, rad;

Ar Mg modificēto CaP biokeramikas prekursoru pulveru RDA ainās kristalītu izmēru aprēķinam tika izvēlēts maksimums (2 0 0) pie 25,9° 2θ, jo tas ir izolēts, t. i., nepārklājas ar

citiem maksimumiem difrakcijas ainās, un salīdzinoši smailāks par citiem difrakcijas maksimumiem (skat. 2.6. att.). Šis maksimums uzrāda HAp kristāliskās struktūras augšanu *c*-ass virzienā, t. i., garumā, veidojot adatveida formu [188]. Jāatzīmē, ka Šērera vienādojumu vidējā kristalītu izmēra noteikšanai izmanto kristalītiem, kuru izmēri ir 10–100 nm robežās, kā arī tajā netiek ņemtas vērā kristāliska režģa mikrodeformācijas.

Kristāliskuma pakāpe (X_C), kas atbilst kristāliskās fāzes frakcijai CaP paraugu tilpumā, aprēķināta pēc sekojošas formulas (2.2):

$$X_C = 1 - \frac{V_{112/300}}{I_{300}} \cdot 100, \quad (2.2)$$

kur X_C - kristāliskuma pakāpe, %;

$I_{3\,0\,0}$ - difrakcijas maksimuma (3 0 0) intensitāte;

$V_{1\,1\,2/3\,0\,0}$ - iedobes intensitāte starp difrakcijas maksimumiem (1 1 2) un (3 0 0).

Ar Mg modificētu BCP biokeramikas kvantitatīva fāžu sastāvs jeb HAp un β-TCP procentuālais saturs aprēķināts saskaņā ar ISO 13779-3:2008(E) standartu, izmantojot HAp un β-TCP raksturīgo, savstarpēji nepārklājošos RDA maksimumu integrētās intensitātes[14], pēc sekojošas formulas (2.3):

$$R = \frac{I_{\beta-\mathrm{TCP}}}{I_{\mathrm{HAp}} + I_{\beta-\mathrm{TCP}}}, \quad (2.3)$$

kur R - β-TCP masas daļas maisījumā, %;

I_{HAp} – HAp difrakcijas maksimuma (1 2 1) integrētā intensitāte;

$I_{\beta\text{-TCP}}$ – β-TCP difrakcijas maksimuma (0 2 10) integrētā intensitāte.

Pēc ISO 13779-3:2008(E) standartā aprakstītā paņēmiena tika konstruēta kalibrācijas līkne. Sagatavoti HAp un β-TCP mehāniski maisījumi ar fāžu sastāvu no 0 % līdz 100 % HAp. Izmantojot sagatavoto maisījumu RDA ainas izveidota kalibrācijas līkne divfāžu maisījumu analīzei. Mērījumiem tika izvēlēti katras fāzes difrakcijas maksimumi ar visaugstāko relatīvo intensitāti (100 %), t. i., HAp gadījumā (1 2 1) pie ~32° 2θ un β-TCP gadījumā (0 2 10) pie ~31° 2θ. HAp un β-TCP RDA maksimumu augstumi un pusplatumi noteikti, izmantojot datorprogrammu *X'Pert Data Viewer*.

[14] Integrētā intensitāte ir maksimuma augstuma (bez fona trokšņa) un maksimuma pusplatuma (maksimuma platums pie ½ pīķa augstuma) reizinājums.

2.3.2. Furjē transformāciju infrasarkanā spektroskopija

Sintezēto un augsttemperatūrā apstrādāto ar Mg modificētu CaP produktu molekulārā struktūra analizēta, izmantojot Furjē transformāciju infrasarkano spektroskopiju (FT-IS). Darbā izmantota FT-IS iekārta (*Varian 800 FT-IR Scimitar Series*). Paraugu IS spektri reģistrēti diapazonā no 4000–400 cm^{-1} ar precizitāti 4 cm^{-1}, veicot 50 skenēšanas. Paraugu sagatavošanai izmantotas divas metodes:

1) KBr tabletes presēšanas metode. Tablešu pagatavošanai iesvērts 0,300 g KBr un 0,003 g sasmalcināta pētāmā parauga un kopējā masa malta dzirnavās 1 min. Pirms infrasarkanā spektra uzņemšanas, sapresētās tabletes žāvētas 105 ºC ~20 h.
2) Pavājinātās pilnīgās atstarošanas (ATR) paraugu turētājs (*Gladi ATR™*). Metodē nav nepieciešama īpaša parauga sagatavošana. ATR metodē tiek detektētas izmaiņas, kas notiek ar infrasarkano starojumu, tam atstarojoties no parauga. Infrasarkanais starojums noteiktā leņķī tiek virzīts uz optiski blīvo dimanta kristālu ar augstu atstarošanas indeksu, uz kura ciešā kontaktā ar kristālu novietots nemodificēts paraugs. Vairākkārt atstarojoties, stars nonāk uz detektora un tiek reģistrēts spektrs.

   Spektru apstrāde veikta ar lietotājprogrammu *Varian Resolutions*.

2.3.3. Lauka emisijas skenējošā elektronu mikroskopija

Sintezēto un augsttemperatūrā apstrādāto ar Mg modificētu CaP produktu morfoloģijas, mikrostruktūras pētījumi veikti, izmantojot uzņēmuma lauka emisijas skenējošo elektronu mikroskopu (LE-SEM) (*TESCAN Mira/LMU Schottky*). Attēli uzņemti gan sekundāro, gan atstaroto elektronu režīmā. LE-SEM mikrofotogrāfiju uzņemšanai izmants paātrināšanas spriegums diapazonā 3–30 kV ar darba distanci 5–10 mm.

Suspensijas paraugi uznesti uz priekšmetstikliņa un izžāvēti 105 ºC ~20 h. Biokeramikas paraugus analīzei sagatavo laužot. Izmantojot uzputinātāju (*Emitech K550X*), paraugi pirms analīzes pārklātiar Au slāni 15 nm biezumā elektrovadītspējas nodrošināšanai. Citas paraugu sagatavošanas procedūras pirms analīzes netika veiktas, lai saglabātu to oriģinālo formu un nesabojātu virsmu. Ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursoru pulveru, kā arī biokeramikas paraugu raksturojošo objektu, proti, daļiņu un graudu, dimensijas mērītas, izmantojot lietotājprogrammu *VegaTC*.

2.3.5. Atomabsorbcijas spektroskopija

Mg koncentrācijas mērījumiem CaP produktos darbā izmantots liesmas AAS (*Varian SpetrAA880*). Paraugu sagatavošana un Mg satura noteikšana paraugā veikta saskaņā ar LVS ISO 7980:2000 standartu pie 285,2 nm viļņa garuma, sadedzinot acetilēna gāzē. Izmantota lampas strāva 10,0 mA un viļņa garums 460,7 nm. Metodes Mg detektēšanas robeža ir 0,0006 g/kg.

2.3.6. Diferenciāltermiskā analīze

Sintezēto ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursoru pulveru termiskās stabilitātes pētījumiem izmantota diferenciāltermiskās analīzes (DTA) iekārta (*BAHR Thermoanalyse DTA 703*). Kā standartmateriāls izmantots alumīnija oksīds (Al_2O_3), 30 mg sintezētā CaP parauga un 30 mg Al_2O_3. paraugi karsēti līdz 1350 ºC, ar temperatūras celšanas ātrumu 10 ºC/min un dzesēšanas ātrumu 20 ºC/min. Iekārtas izšķiršanas spēja ir 0.01º, precizitāte ± 2 %. Mērījumi veikti gaisa atmosfērā.

DTA līknes šajā darbā dotas kā termopāra sprieguma diferences funkcija no standartvielas temperatūras. Standartvielas temperatūra dota Celsija grādos (ºC) un apzīmēta ar *T*. Termopāra sprieguma diference dota mikrovoltos (mV) un apzīmēta ar saīsinājumu *DTA*.

2.3.7. Augsttemperatūras mikroskopija

Sintezēto ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursoru pulveru saķepšanas procesu pētījumiem tika izmantota ATM, lai noteiktu CaP saķepšanas temperatūru, paraugu lineāro sarukumu un Mg ietekmi uz iepriekšminētajiem parametriem. Formēts analizējamā materiāla cilindrs (eksperimentālais paraugs), kuru ievieto karsēšanas kamerā (krāsnī). Parauga iesvars ir aptuveni 20 mg. Kā saistviela parauga cilindrveida formas iegūšanai izmantots izopropanola šķīdums. Paraugu pētīšanai izmantots augsttemperatūras mikroskops (*EMO-1750/30-K*), kur paraugi tika karsēti gaisa atmosfērā līdz 500 ºC ar ātrumu 80 ºC/min, pēc tam līdz 1450 ºC ar ātrumu 15 ºC/min.

2.3.8. Piknometrija

Ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursoru pulveru, respektīvi, HAp, CDHAp un ap-TCP, patiesais blīvums (ρ_{PYC}) tika mērīts, izmantojot pikometru (PYC; *Micromeritics AccuPyc 1330*), katram paraugam veicot 99 analītiskos ciklus un par patiesu pieņemot vidējo

aritmētisko vērtību. Iegūtās vērtības tika izmantotas daļiņu vidējā izmēra (d_{BET}) aprēķināšanai, izmantojot īpatnējā virsmas laukuma (SSA_{BET}) mērījumu datus.

2.3.9. N_2 sorbtometrija

Sintezēto ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursoru pulveru SSA_{BET} noteikts ar automātisko sorbcijas iekārtu (*QUADRASORB SI Kr*). SSA_{BET} ir izstrādājuma virsmas laukums (gan ārējā, gan iekšējā virsma), kas attiecināts pret izstrādājuma masas vienību. Praktiski tiek noteikta pieejamā izstrādājuma virsma, kas ir atkarīga no metodē izmantojamās vielas (adsorbāta molekulārā izmēra). Gāzes adsorbcijas–desorbcijas jeb Brunauera-Emeta-Tellera (BET) metode ir visplašāk izmantotā analīzes metode cietu materiālu/vielu virsmas laukuma un poru izmēru noteikšanai. Tā ļauj novērtēt poru izmērus plašā diapazonā no 0,35 nm līdz > 100 nm, ieskaitot pilnu mikro-, mezo- un makro- poru diapazonu [186].

Lai atbrīvotu eksperimentālo paraugu virsmu no mitruma un citiem piemaisījumiem, kas sorbējas uz virsmas no gaisa, tika izmantota degazācija, kas veikta ar iekārtu *Autosorb Degasser Model AD-9* un tai izvelētas 9 mm apaļas paraugu šūnas. Analizējamā parauga masa ~0,3 g. Degazācija veikta istabas temperatūrā (~25 °C) 24 h. Kā inertā analīzes gāze tika izmantots slāpeklis N_2 un spiediens, kādam tika pakļauts materiāls bija robežās no 0,1463 kPa līdz 101,6328 kPa.

Izmantojot patiesā blīvuma mērījumu rezultātus un BET īpatnējās virsmas laukuma rezultātus, aprēķināti daļiņu vidējais izmērs, izmantojot formulu (2.4):

$$d_{\mathrm{BET}} = \frac{6}{(\rho_{\mathrm{PYC}} \times SSA_{\mathrm{BET}})}, \tag{2.4}$$

kur d_{BET} – daļiņu vidējais izmērs, nm;

ρ_{PYC} – pulverveida parauga patiesais blīvums, g/cm^3;

SSA_{BET} - adsorbenta (parauga) īpatnējais virsmas laukums, m^2/g

2.3.10. Arhimēda metode

Blīvu un porainu ar Mg modificētu CaP biokeramikas pamatņu porainība noteikta saskaņā ar EN 993-1:1995 standarta metodi, kas balstīta uz Arhimēda likumu. Arhimēds formulējis likumu, saskaņā ar kuru uz katru ķermeni, kas iegremdēts šķidrumā vai gāzē, darbojas spēks (hidrostatiskais cēlējspēks jeb Arhimēda spēks), kas skaitliski vienāds ar ķermeņa izspiestā šķidruma vai gāzes svaru.

Porainība raksturo poru daudzumu materiāla ieņemtajā tilpumā un nosaka to dobumu/poru daudzumu, caur kuriem ūdens var iespiesties dziļāk substrātā. Poru daudzums, izvietojums, izmēri un forma lielā mērā ietekmē keramikas īpašības un vienlaicīgi paver iespēju mērķtiecīgi ietekmēt un iegūt keramikas materiālus ar noteiktām īpašībām un funkcionālu daudzveidību [189].

Atvērtās porainības (P_A), kopējās porainības (P_K) un šķietamā blīvuma ($\rho_{šķ}$) noteikšanai biokeramikas pamatnes tika nosvērtas uz analītiskajiem svariem (m_0). Pēc tam tās vakuumētas 15 min (eksikatorā) līdz spiedienam 600 mbar. Vakuumētās pamatnestika pārlietas ar H_2O tā, lai tās pilnībā pārklātu, un izturētas traukā pie dotā spiediena 20 min. Pēc tam vakuumu pārtrauca un pamatnes izturētas H_2O vēl 20 min, lai tās pilnībā piesātinātos. Piesūcinātās pamatnes tika nosusinātas ar mitru drānu (ja izmanto sausu drānu, tad mitrums daļēji aiziet arī no ārējām porām) un nosvērtas uz analītiskajiem svariem (*Kern 770*) ar precizitāti ±0,001 g.

Vispirms nosver pamatnes gaisā (m_1) un tad nosaka pamatņu masu H_2O (m_2). Kopējā porainība nosaka, cik lielu daļu (%) no materiāla tilpuma aizņem slēgtās poras un poras, kas savienotas ar apkārtējo vidi.

P_A nosaka, izmantojot formulu (2.5):

$$P_A = \frac{m_1 - m_0}{m_1 - m_2} \cdot 100, \quad (2.5)$$

kur P_A – atvērtā porainība, % (tilpuma);

m_0 – sausas pamatnes masa, g;

m_1 – ar ūdeni piesūcinātas pamatnes masa, g;

m_2 – ar ūdeni piesūcinātas pamatnes masa ūdenī, g.

P_K nosaka, izmantojot formulu (2.6):

$$P_K = 100 - \frac{\rho_{šķ} \cdot 100}{\rho_t}, \quad (2.6)$$

kur P_K - kopējā porainība, % (tilpuma);

$\rho_{šķ}$ - šķietamais blīvums, g/cm^3;

ρ_t - fāzes teorētiskais blīvums aprēķināts, izmantojot formulu (2.7).

$$\rho_t = \frac{1}{(1 - X_{HAp})/\rho_{\beta-TCP} + X_{HAp}/\rho_{HAp}}, \quad (2.7)$$

kur ρ_{HAp} - HAp fāzes teorētiskais blīvums 3,15 g/cm^3 [190];

X_{HAp} – HAp fāzes procentuālais saturs biokeramikā, %;

$\rho_{\beta\text{-TCP}}$ – β-TCP fāzes teorētiskais blīvums 3,07 g/cm^3 [190].

Blīvums ir vielas fizikāla konstante, kas atkarīga no tās uzbūves, kristālisku vielu gadījumā no atomu sablīvējuma kristālos. To nosaka kā attiecību starp vielas masu un tās tilpumu, neskaitot poras. Šķietamais blīvums ($\rho_{šķ}$) jeb tilpummasa ir ķermeņa masas attiecība pret tā tilpumu, ieskaitot poras. Ja ķermenī nav poru, tā $\rho_{šķ}$ vienāds ar tā patieso blīvumu. Biokeramikas pamatņu šķietamais blīvums aprēķināts, izmantojot formulu (2.8):

$$\rho_{šķ} = \frac{m_0}{(m_1 - m_2)}, \tag{2.8}$$

kur $\rho_{šķ}$ – šķietamais blīvums, g/cm³;

m_0 – sausas pamatnes masa, g;

m_1 – ar ūdeni piesūcinātas pamatnes masa, g;

m_2 – ar ūdeni piesūcinātas pamatnes masa ūdenī, g.

Biokeramikas pamatņu tilpuma lineārais sarukums (S_V) aprēķināts, izmantojot formulu (2.9):

$$S_V = \frac{V_0 - V_1}{V_0} \cdot 100 = \frac{\pi \cdot R_0^2 \cdot H_0 - \pi \cdot R_1^2 \cdot H_1}{\pi \cdot R_0^2 \cdot H_0} \cdot 100, \tag{2.9}$$

kur S_v – tilpuma sarukums, %;

V_0 – pamatnes tilpums pirms augsttemperatūras apstrādes, mm³,

V_1 – pamatnes tilpums pēc augsttemperatūras apstrādes, mm³,

R_0 – pamatnes rādiuss pirms augsttemperatūras apstrādes, mm,

R_1 – pamatnes rādiuss pēc augsttemperatūras apstrādes, mm,

H_0 – pamatnes augstums pirms augsttemperatūras apstrādes, mm,

H_1 – pamatnes augstums pēc augsttemperatūras apstrādes, mm.

P_A, P_K, $\rho_{šķ}$ un S_V noteikšanai tika izmantoti paralēli mērījumi vismaz 5 biokeramikas pamatnēm. Par reālām vērtībām tika pieņemti vidējie aritmētiskie lielumu. Jāņem vērā, ka mērījumu metode nedod absolūtās lielumu vērtības, bet tikai raksturīgās vērtības, kas ir cieši saistītas ar mērījumu metodes darbības principiem un kas var savstarpēji nesakrist, salīdzinot dažādas mērījumu metodes.

2.3.11. Dzīvsudraba porozimetrija

Porainu ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas pamatņu poru izmēru sadalījuma noteikšanai izmantots porozimetrs (*Quantachrome PoreMaster*), kas nodrošina spiedienu līdz 60 000 psia, mērījumu intervālu poru diametriem no 950 μm līdz 6,4 nm. Analīzei izmantotā

eksperimentālā parauga masa 0,3–1,0 g. Dzīvsudraba iespiešanās porozimetrija ir plaši pielietota metode, lai noteiktu poru kopējo tilpumu, poru izmērus mezo- un makro- poru diapazonā, kā arī īpatnējās virsmas laukumu. Metode balstīta uz neslapējoša šķidruma (piliena kontakta leņķis > 90°) iespiešanos materiāla porās. Tā kā dzīvsudrabs praktiski neslapē nevienu materiālu, tad tas nedifundē porās un ir nepieciešams izmantot paaugstinātu spiedienu, pēc kura mērījumiem tiek veikti poru izmēru aprēķini pēc Vašburna vienādojuma [191]. Porainības noteikšanai izmantoti gan zemspiediena, gan augstspiediena dzīvsudraba iespiešanās diapazons. Aprēķinos tiek iegūts poru rādiuss, kas atbilst ekvivalentai cilindriskai porai, kas tiktu piepildīta dotajā spiedienā. Jāņem vērā, ka tiek mērīti tikai poru ieeju izmēri un neņemta vērā poru formu heterogenitāte un dzīvsudraba kontakta leņķa atkarība no materiāla. Poru izmērus nosaka atkarībā no iespiedušā dzīvsudraba daudzuma noteiktā spiedienu diapazonā.

2.4. *In vitro* pārbaudes

2.4.1. Biokeramikas šķīdības pētījumi

Ar Mg modificētu CaP biokeramikas šķīdības pētījumi veikti saskaņā ar EN ISO 10993-14:2001 standartu, eksperimentāli novērtējot (Ca^{2+}) un (Mg^{2+}) jonu izdalīšanos no biokeramikas paraugiem tris(hidroksimetil)aminometāna - sālsskābes (TRIS-HCl) buferšķīdumā, kompleksonometriski titrējot eksperimentālos šķīdumus ar 0,01 M EDTA.

TRIS-HCl buferšķīduma pagatavošanai tika izšķīdināti 13,25 g tris(hidroksimetil) aminometāna (TRIS) 500 mL dejonizēta ūdens, kas iepriekš uzsildīts līdz (36,5 ± 0,5) ^{o}C (T nodrošināta konstanta visu buferšķīduma pagatavošanas laiku). Pēc tam, pievienojot 1 M sālsskābes (HCl) ūdens šķīdumu, buferšķīduma pH noregulēts līdz (7,4 ± 0,1). Visbeidzot buferšķīdumam pievienots dejonizētais ūdens līdz 1 L tilpumam.

Blīvas biokeramikas pamatnes ievietotas (40 ± 1) mL TRIS-HCl šķīdumā, sterilos polietilēna paraugu konteineros. Konteineri ar eksperimentālajiem paraugiem ievietoti inkubatorā/kratītajā (36,5 ± 0,5) ^{o}C, kur eksperimentālie šķīdumi nepārtraukti maisīti ar ātrumu 50 apgr./min, lai imitētu ķermeņa šķidrumu plūsmu *in vivo*. TRIS-HCl šķīdums nomainīts ik pēc 24 h, saglabājot izreaģējušos šķīdumus (Ca^{2+}) un (Mg^{2+}) jonu koncentrāciju mērīšanai.

Kompleksonometriskajā titrēšanā izmanto etilēdiamīntetraetiķskābi (EDTA), kas ir lielmolekulārs savienojums un ar metāla joniem veido iekšējos kompleksos savienojumus [192]. Šajā gadījumā nosakāmie metāla joni ir (Ca^{2+}) un (Mg^{2+}) joni, kas ar EDTA veido

bezkrāsainus kompleksus savienojumus. EDTA kompleksonometriskā titrēšanas procesā notiekošās reakcijas var aprakstīt ar vienādojumiem (2.10) un (2.11).

$$Ca^{2+} + EDTA^{4-} \leftrightarrow Ca[EDTA]^{2-} \quad (2.10)$$

$$Mg^{2+} + EDTA^{4-} \leftrightarrow Mg[EDTA]^{2-} \quad (2.11)$$

Kad visi joni ir saistījušies ar EDTA, tad titrēšanas sistēmā ir sasniegts ekvivalences punkts, kuru detektē potenciometriski, izmantojot jonu selektīvo elektrodu, kas darbojas kā beigu punkta detektors. Potenciometrs sastāv no diviem elektrodiem, kas ir ievietoti analizējamajā šķīdumā. Pirmais elektrods ir references elektrods, kura potenciāls iepriekš ir zināms, bet otrais elektrods ir selektīvais elektrods, kas reaģē uz jonu aktivitātes izmaiņu analizējamajā šķīdumā, līdz ar to mainās tā potenciāls [193]. Jāņem vērā, ka EDTA reakcijas ar metālu joniem ietekmē vides pH. Metālu joni, kas cieši saistās ar EDTA, jātitrē skābā vidē, piemēram, cinka joni (Zn^{2+}). Bet metālu joni, kas reaģē vājāk ar EDTA, jātitrē bāziskā vidē, piemēram, (Ca^{2+}) un (Mg^{2+}) joni. Minimālā pH vērtība, pie kuras var titrēt (Ca^{2+}) jonus ar EDTA, ir ~8, bet (Mg^{2+}) joniem ~10.

Izmantojot automātisko titratoru (*Metler Toledo*) un (Ca^{2+}) jonu selektīvo elektrodu (*DX240 Ca-ISE*), iespējams veikt (Ca^{2+}) un (Mg^{2+}) jonu kvantitatīvu noteikšanu, jo *DX240 Ca-ISE* jonu selektīvais elektrods ir jūtīgs gan pret šķīdumā esošiem (Ca^{2+}), gan (Mg^{2+}) joniem. Pirms analīzes veikšanas paraugiem pievieno 1 mL acetilacetona - TRIS buferšķīduma (pH 8,5). Tas ir nepieciešams, lai palielinātu (Ca^{2+}) un (Mg^{2+}) jonu izšķirtspēju, mainot $Ca[EDTA]^{2-}$ un $Mg[EDTA]^{2-}$ kompleksu stabilitātes konstantes, un panāktu, ka vispirms ar EDTA reaģē visi šķīdumā esošie (Ca^{2+}) joni un tikai pēc tam (Mg^{2+}) joni. Titrēšanas gaitā tiek reģistrēts patērētais titranta tilpums. Titrants tiek pievienots analizējamam šķīdumam dinamiski, respektīvi, lai nodrošinātu vienmērīgu potenciāla izmaiņu (dE = 1 mV), kā arī paraugam tiek pievienots mainīgs EDTA daudzums (dV_{min} = 0,001 mL; dV_{max} = 0,1 mL). Par patiesu pieņemta vidējā aritmētiskā vērtība starp trīs paralēlajiem eksperimentālajiem paraugiem no katras sērijas.

2.4.2. Biokeramikas pētījumi simulētajā ķermeņa šķidrumā

Mākslīgie ķermeņa šķidrumi, no kuriem populārākais ir SĶŠ (skat. 1.4. apakšnodaļu), pirmo reizi tika izmantots ar mērķi analizēt fizioloģiskā vidē notiekošās izmaiņas uz bioaktīvās stikla keramikas virsmas. Joprojām biomateriālu *in vitro* testus SĶŠ izmanto kā efektīvu bioaktivitātes novērtējuma metodi, proti, biomimētiska HAp slāņa veidošanās spējas

novērtēšanai uz analizējamā implantmateriāla virsmas mijiedarbībā ar SĶŠ šķīdumu. Šāda pieeja ļauj prognozēt implantmateriālu bioaktivitāti *in vivo.*

Biokeramikas *in vitro* biokativitātes testi SĶŠ tika veikti, vadoties pēc ISO 23317:2012, saskaņā ar kuru SĶŠ sastāvā esošo jonu koncentrācijas uzskaitītas 2.3.tabulā. SĶŠ pagatavots pēc *Kokubo et al.* metodes [194]. SĶŠ pagatavošanai izmantotie reaģenti, pievienošanas secība un to daudzumi apkopoti 2.4. tabulā. Paraugi tika izturēti SĶŠ 7 un 21 diennakti. Analizēti trīs paralēlie eksperimentālie paraugi no katras ar Mg modificētas CaP biokeramikas sērijas.

2.3. tabula

ISO 23317:2012 norādītās jonu koncentrācijas SĶŠ

Joni	**Koncentrācija, · 10^{-3} mol/L**
(Na^+)	142,0
(K^+)	5,0
(Mg^{2+})	1,5
(Ca^{2+})	2,5
(Cl^-)	147,8
(HCO^{3-})	4,2
(HPO_4^{2-})	1,0
(SO_4^{2-})	0,5

2.4. tabula

SĶŠ pagatavošanai izmantotie reaģenti, to daudzums un pievienošanas secība

Secība	**Reaģents**	**Daudzums**
1.	NaCl	8,035 g
2.	$NaHCO_3$	0,355 g
3.	KCl	0,225 g
4.	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0,231 g
5.	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,311 g
6.	1,0 M HCl	39 mL
7.	$CaCl_2$	0,292 g
8.	Na_2SO_4	0,072 g
9.	TRIS	6,118 g
10.	1,0 M HCl	0 - 5 mL

Katram paraugam izmantoti 30 mL SĶŠ. SĶŠ pētījumi veikti (36,5 ± 0,5) °C, eksperimentālos šķīdumus nepārtraukti maisot inkubatorā-kratītājā ar ātrumu 50 apgr./min. Pēc 7 un 21 diennakts biokeramikas paraugi izņemti no eksperimentālajiem šķīdumiem, izžāvēti, un izvērtēta jauna materiāla jeb biomimētiska HAp slāņa veidošanās uz biokermikas virsmas, izmantojot LE-SEM mikrofotogrāfijas.

2.4.3. Biokeramikas citotoksicitātes novērtēšana šūnu kultūrās

Citotoksicitātes testiem blīvas ar Mg modificētu CaP biokeramikas pamatnes tika sterilizētas tvaikā (134 ºC, 25 min).

Ar Mg modificēta HAp un β-TCP biokeramikas citotoksicitātes novērtēšana tika veikta, izmantojot osteoblastu šūnu līniju *MG63-GFP*. Šūnu barotnes pagatavotas 20 % (tilpuma) govs embriona serumu (FBS, angļu val.: *Fetal Bovine Serum*), suspendējot DMEM (*Dulbecco* modificēta *Eagle* barotne), kas sekojoši suplementēta ar 500 µl N-2-hidroksietilpiperazīna-N'-2-etānsulfoskābes (HEPES). Katrai pamatnei uzsētas ~200 000 šūnu, un tās inkubētas (36,5 ± 0,5) ºC. Šūnu augšanas dinamika otrajā (pēc 48 h) un trešajā dienā (pēc 72 h) tika novērtēta vizuāli, izmantojot fluorescences mikroskopiju. Pēc 72 h ekspozīcijas dzīvo šūnu skaits noteikts, izmantojot DNS kvantificēšanas metodi (*CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit, Invitrogen, C7026*). Šūnu skaita noteikšanas testa pamatā ir zaļa fluorescentā krāsviela (*CyQUANT® GR dye*), kuras fluorescence ievērojami pastiprinās pēc saistīšanās ar nukleīnskābēm. Fluorescences mērījumi veikti ar daudzmodālu mikroplašu nolasītāju (*Infinite 200®PRO, TESCAN*). Sešas pamatnes no katras biokeramikas sērijas uznestas uz 96 lauku mikroplates: 50 µl parauga pievienoti 150 µL 1,33x *CyQUANT®* darba šķīduma (kopējais paraugu atšķaidījums – 80 reizes). Šūnu skaita noteikšanai katram paraugam veikti trīs tehniskie atkārtojumi. Pēc 72 h ekspozīcijas, paraugi tika dehidratēti dažādas koncentrācijas etanola šķīdumu sērijās un žāvēti gaisā, LE-SEM mikrofotogrāfiju uzņemšanai, lai novērtētu šūnu piesaistīšanos biokeramikas pamatņu virsmai.

Ar Mg modificētu BCP biokeramikas citotoksicitātes novērtēšana veikta, izmantojot osteogēno cilmes šūnu līniju *MC3T3-E1*. Biokeramikas paraugi 24 h inkubēti α-MEM (angļu val.: *Minimal Essential Medium*) šūnu kultūru barotnē ar 10 % (tilpuma) FBS. Inkubētie biokeramikas paraugi ievietoti imunoloģiskajā platē ar 48 lauciņiem (trīs paraugi no katras sērijas), un uzsētas ~20 000 šūnas, kam pievienots 50 µL šūnu kultūras barotnes, un pēc 15 min suspendētas 250 µL šūnu kultūras barotnes. Citotoksicitātes pētījumi veikti 36,5 ± 0,5 ºC un 5 % CO_2. Ekspzīcijas laiks – 168 h, pēc 72 h ekspozīcijas šūnu vide tika atjaunota. Pēc 168 h ekspozīcijas dzīvo šūnu skaits noteikts, mērot MTT samazināšanos, kas ir kolorimetriska analīzes metode, kas nosaka šūnu dzīvotspēju, citostatisko aktivitāti, analizējot šūnu vielmaiņas aktivitāti jeb mērot šūnu spēju reducēt vitālo krāsvielu MTT.

Kā «pozitīvā kontrole» citotoksicitātes pētījumos tika izmantota šūnu kultūru plate bez parauga.

3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

Eksperimentālajā daļā, izmantojot ķīmiskās suspensijas nogulsnēšanas metodi, no MgO, CaO un H_3PO_4, sintezēti ar Mg modificēti CaP – HAp, CDHAp un ap-TCP – pulveri ar dabīgajam kaulam tuvu Mg saturu, t. i., ar Mg saturu līdz ~1 % (masas) [3]. Sintezētie pulveri izmantoti ar Mg modificētu CaP, respektīvi – HAp, BCP un β-TCP, blīvu un porainu biokeramikas pamatņu ar variējamu un reproducējamu fāžu un ķīmisko sastāvu izgatavošanai, izmantojot attiecīgi uniaksiālu presēšanu vai *in situ* viskozas masas uzputošanas metodi un sekojošu augsttemperatūras apstrādi, kā aprakstīts 2.2.2. apakšnodaļā.

3.1. Biokeramikas prekursoru pulveru raksturojums

Sekojošajās apakšnodaļās sniegts ar Mg modificētas CaP biokeramikas prekursoru pulveru fizikālķīmisks raksturojums, novērtējot Mg satura ietekmi uz attiecīgo produktu īpašībām, t. i., ķīmisko un fāžu sastāvu, molekulāro struktūru, kristāliskuma pakāpi, kā arī morfoloģiju, termisko stabilitāti un saķepšanu, kas ir noteicošas biokeramisko implantmateriālu izgatavošanā, kā arī fizikālķīmisko un bioloģisko īpašību raksturošanā.

3.1.1. Ķīmiskā, fāžu un molekulārā sastāva pētījumi

Patiesās Mg koncentrācijas sintēžu produktos noteiktas ar AAS. Rezultāti izvērtēti, pamatojoties uz salīdzinājumu starp teorētisko un ar AAS izmērīto Mg saturu sintēžu produktos (skat. 3.1. tabulu).

Neatkarīgi no (Ca + Mg)/P molārās attiecības sintēzes izejas suspensijā jeb teorētiskās (Ca + Mg)/P attiecības, Mg saturs CaP produktos pieaug līdz ar Mg prekursora koncentrācijas palielināšanu sintēzes vidē. Sintēžu produktos, kas pagatavoti bez papildus (Mg^{2+}) jonu avota pievienošanas izejas suspensijā, izmērītā Mg koncentrācija (līdz (0,33 ± 0,04) % (masas)) rodas no MgO piemaisījumiem komerciālajā CaO (≥ 97 %, *purum*, *Fluka*, Vācija), par kuru precīzu saturu ražotājs informāciju nav sniedzis, tomēr secināms, ka tas nepārsniedz 3 %. Patiesais Mg saturs sintēžu produktos ir tuvs teorētiskajam. Novirzes no teorētiskā Mg satura skaidrojamas ar to, ka daļa no MgO, kas disociēts jonos sintēzes maisījumā, nepiedalās reakcijas norisē un tiek aizvākts no sintēžu produktiem ar filtrātu.

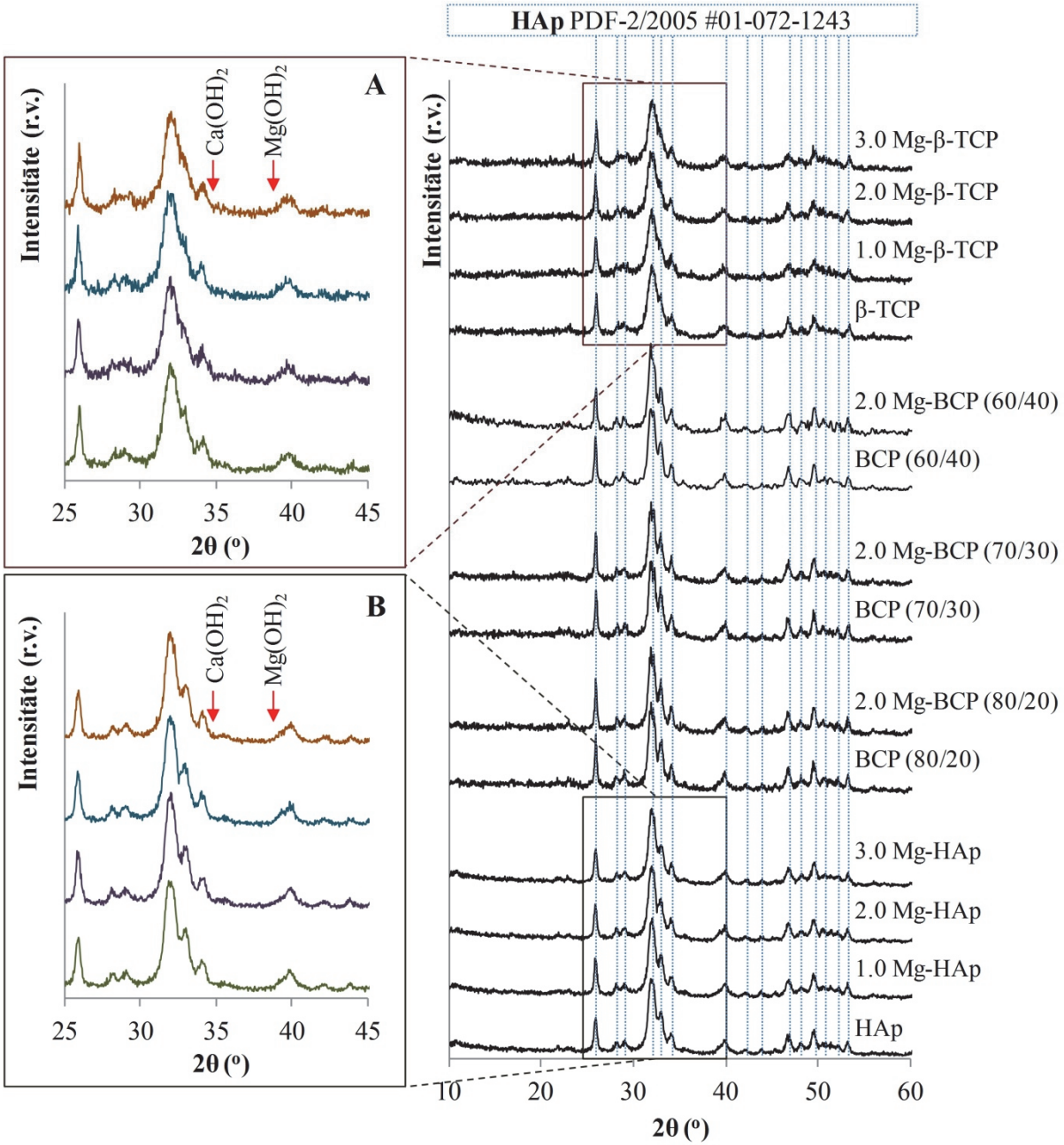
3.1. tabula

Teorētiskais un patiesais Mg saturs CaP sintēžu produktos

	Sintēžu produktu apzīmējums	Teorētiskā (Ca+Mg)/P molārā attiecība	Teorētiskais Mg saturs, % (masas)	Patiesais Mg saturs, % (masas)
HAp	HAp	1,67	0	0,21 ± 0,02
	1.0 Mg-HAp		0,34	0,43 ± 0,09
	2.0 Mg-HAp		0,68	0,64 ± 0,10
	3.0 Mg-HAp		1,02	0,83 ± 0,19
CDHAp	BCP (80/20)	1,63	0	0,32 ± 0,04
	1.0 Mg-BCP (80/20)		0,34	0,31 ± 0,04
	2.0 Mg-BCP (80/20)		0,68	0,69 ± 0,08
	BCP (70/30)	1,61	0	0,33 ± 0,04
	1.0 Mg-BCP (70/30)		0,34	0,51 ± 0,06
	2.0 Mg-BCP (70/30)		0,68	0,75 ± 0,09
	BCP (60/40)	1,60	0	0,28 ± 0,04
	1.0 Mg-BCP (60/40)		0,34	0,36 ± 0,04
	2.0 Mg-BCP (60/40)		0,68	0,64 ± 0,08
ap-TCP	β-TCP	1,50	0	0,25 ± 0,03
	1.0 Mg-β-TCP		0,34	0,32 ± 0,04
	2.0 Mg-β-TCP		0,68	0,56 ± 0,08
	3.0 Mg-β-TCP		1,02	0,67 ± 0,08

Fāžu sastāva un kristāliskuma analīze balstīta uz RDA ainās identificēto maksimumu atbilstību raksturīgajiem HAp fāzes maksimumiem 2θ robežās no 10º līdz 60º, kā arī uz raksturīgo RDA maksimumu intensitāti un platumu. Detektēto maksimumu, dupletu vai tripletu analīze sniedz informāciju par sintēžu produktu fāžu tīrību, kristāliskuma pakāpi, kā arī kristalītu izmēriem.

Visi sintēžu produkti uzrāda nanokristāliska HAp fāzei raksturīgas RDA ainas, par ko liecina relatīvi zemas intensitātes, plati RDA maksimumi (skat. 3.1. att.) [195]. RDA ainās iezīmējas HAp fāzei raksturīga plata RDA josla (skat. 3.1. att.(A)) vai maksimumu triplets (skat. 3.1. att.(B)) diapazonā no 31º līdz 35º 2θ un atsevišķs maksimums pie ~26º 2θ. Saskaņā ar Starptautiskā difrakcijas datu centra datu bāzes PDF-2/2005 ieraksta Nr. 01-072-1243 datiem, visi RDA maksimumi atbilst rentgentīrai HAp fāzei, t. i., sintezēto pulveru RDA ainās nav detektēti izejas materiālu, t. i., $Ca(OH)_2$ un/vai $Mg(OH)_2$, raksturīgie maksimumi, kas norāda, ka viss sintēžu produktos detektētais Mg saturs ir iekļāvies CaP struktūrā. Visi sintēžu produkti ar Mg saturu līdz ~1 % (masas) uzrāda līdzīgas RDA ainas un nav konstatētas raksturīgo RDA maksimumu nobīdes, t. i., pozīcijas maiņa.



3.1. att. Ar Mg modificētu ap-TCP, CDHAp un HAp RDA ainas: A - ap-TCP produktu RDA ainas raksturīgajā diapazonā, B – HAp produktu RDA ainas raksturīgajā diapazonā

Vizuāli novērojamas sintēžu produktu kristāliskuma pakāpes būtiskas izmaiņas, ja izejas suspensiju (Ca + Mg)/P molārā attiecība ir 1,50 (ap-TCP) un 1,67 (HAp), kā parādīts 3.1. attēlā (A, B). Tas saistīts ar to, ka ap-TCP produktu sintēze veikta istabas temperatūrā, bet HAp un CDHAp produktu – paaugstinātā temperatūrā, t. i., 45 ºC. Literatūrā atrodamā informācija apstiprina, ka paaugstināta sintēzes temperatūra veicina kristalītu augšanu, kas atspoguļojas produktu RDA ainās, RDA maksimumu intensitāšu pieauguma ziņā, īpaši, diapazonā no 31 º

līdz 35 º 2θ. Respektīvi, paaugstināta sintēzes temperatūra veicina CaP produktu kristāliskuma pakāpes palielināšanos [196-198]. Sintezēto pulveru kristāliskuma pakāpju (X_C) (aprēķinātas no RDA datiem) kvantitatīvs salīdzinājums sniegts 3.2.tabulā.

3.2. tabula

Ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursoru pulveru kristāliskuma pakāpe

	Sintēžu produktu apzīmējums	X_C, %
HAp	HAp	40
	1.0 Mg-HAp	36
	2.0 Mg-HAp	37
	3.0 Mg-HAp	38
CDHAp	BCP (80/20)	54
	1.0 Mg-BCP (80/20)	54
	2.0 Mg-BCP (80/20)	56
	BCP (70/30)	51
	1.0 Mg-BCP (70/30)	52
	2.0 Mg-BCP (70/30)	52
	BCP (60/40)	44
	1.0 Mg-BCP (60/40)	44
	2.0 Mg-BCP (60/40)	49
ap-TCP	β-TCP	32
	1.0 Mg-β-TCP	38
	2.0 Mg-β-TCP	41
	3.0 Mg-β-TCP	43

Pamatojoties uz literatūras datiem un RDA rezultātiem, veikta analīze un piedāvāti sekojoši iespējamie Mg jonu/atomu un CaP mijiedarbības mehānismi:

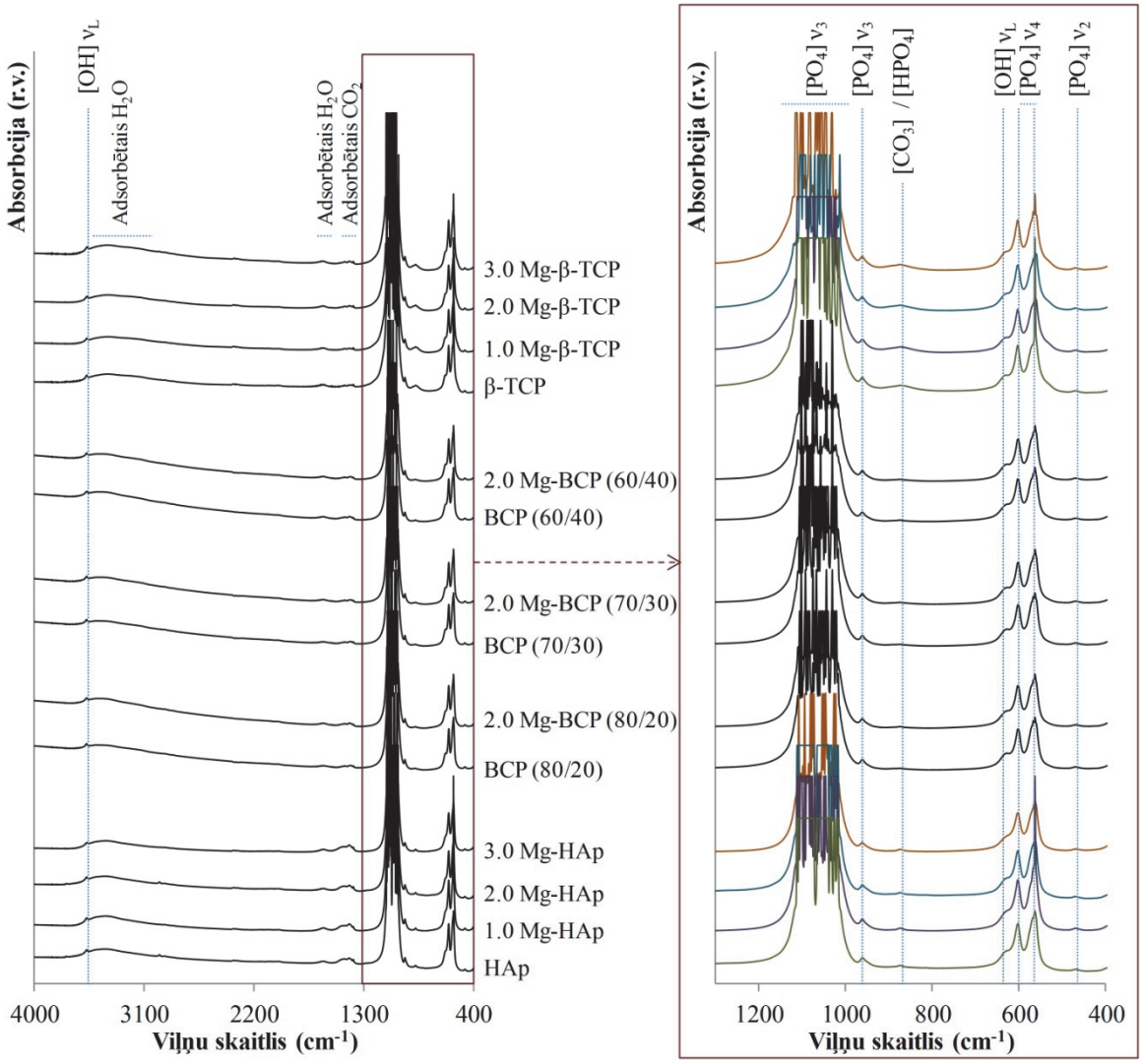
1. Sintezētie CaP pulveri praktiski visos gadījumos ir HAp ar Ca deficītu jeb CDHAp, kam raksturīga relatīvi zema kristāliskuma pakāpe, un to kristāliskā struktūra pilnībā neatbilst trīsdimensiju tālam sakārtojumam. Līdz ar to sintēžu produktu kristāliskais režģis satur vakances, kas var tikt aizpildītas ar sintēžu vidē ievadītajiem Mg atomiem. Mg, kura atoma rādiuss – 0,130 nm, stājoties Ca ar atoma rādiusu – 0,198 nm vietā, izsauc kristāliskās struktūras izmaiņas, kuru raksturs, savukārt, atkarīgas no Mg satura [145]. Minētās izmaiņas atspoguļotos attiecīgajās RDA ainās, t. i., raksturīgo RDA maksimumu pozīciju vai intensitāšu izmaiņu veidā [199]. Promocijas darbā sintezēto pulveru RDA ainās augstākminētās izmaiņas netika novērotas, kas ļauj secināt, ka produktu

kristāliskajā struktūrā Ca atomi var tikt aizvietoti ar Mg atomiem, saglabājot HAp fāzes oriģinālo kristālisko struktūru, ja Mg saturs nepārsniedz 1 % (masas).

2. Mg atomiem ir tieksme absorbēties uz CaP kristalītu virsmas, kavējot to tālāku augšanu un veicinot amorfas fāzes veidošanos sintēžu produktu sastāvā [137]. Šeit piedāvātais mehānisms izskaidrotu turpmāk aprakstītos sintezēto pulveru BET mērījumu rezultātus (skat. 3.3. att.), kas liecina par sintēžu produktu daļiņu vidējā izmēra samazināšanos līdz ar Mg satura pieaugumu.

Lai kvalitatīvi apliecinātu sintēžu produktu piederību apatīta klases savienojumiem, izmantota FT-IS analīze, un iegūtie spektri parādīti 3.2. attēlā. Rezultātu analīze pamatojas uz paraugu saišu svārstību absorbcijas joslu atbilstību apatīta fāzes raksturīgo funkcionālo grupu absorbcijas joslu atrašanās vietai spektrā, kā arī uz absorbcijas joslu vizuālo izskatu, t. i., intensitāti un platumu, kas norāda uz tādām analizējamā parauga īpašībām kā fāžu tīrība un molekulārās struktūras izmaiņas.

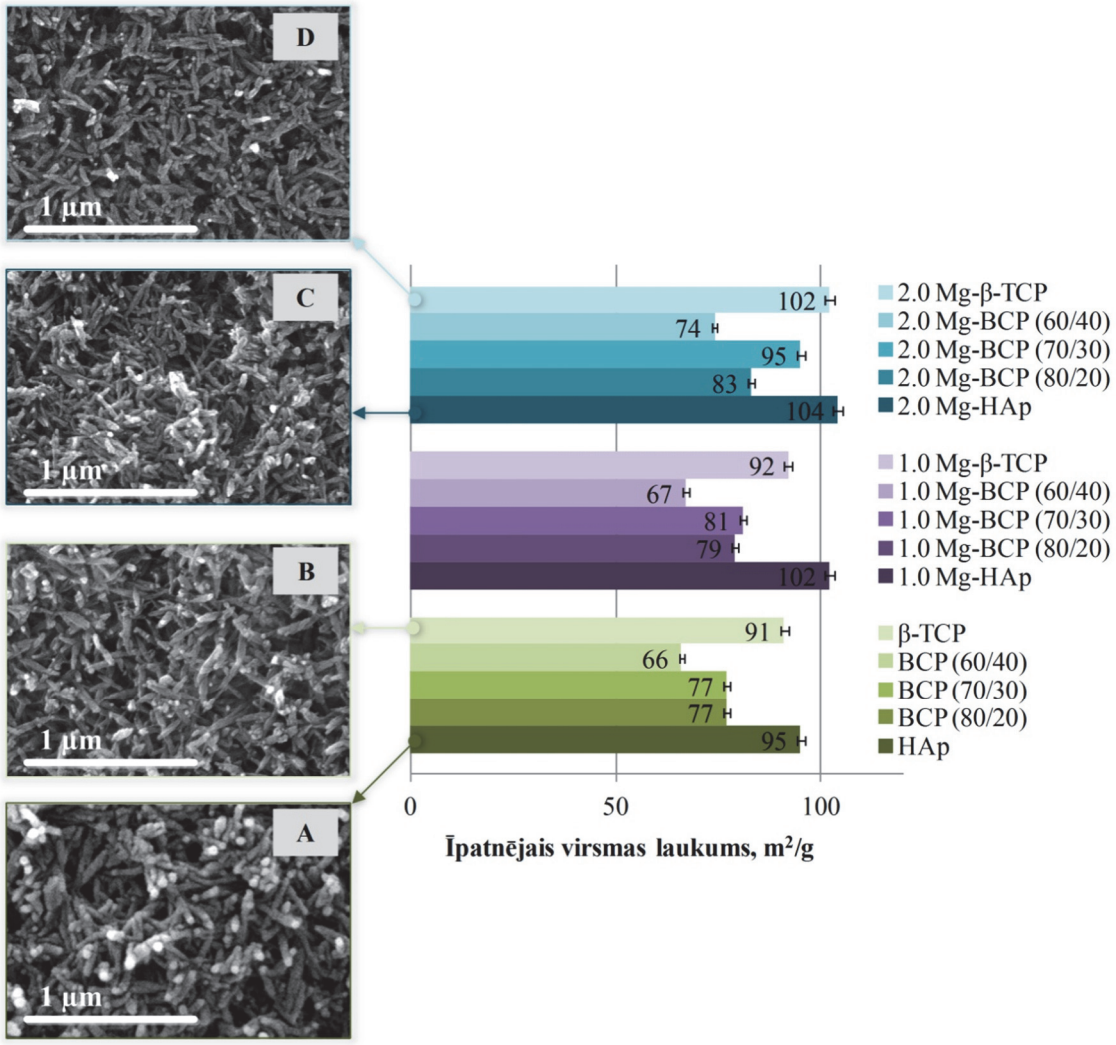
Visos CaP biokeramikas prekursoru pulveru FT-IS spektros detektētas HAp fāzei raksturīgās funkcionālo grupu, t. i., fosfātu grupu [PO_4] pie 560, 570, 950 cm^{-1} un apgabalā no 960 cm^{-1} līdz 1210 cm^{-1}, kā arī hidroksilgrupu [OH] pie 630 cm^{-1} un 3570 cm^{-1}, absorbcijas joslas. Papildus jau minētajām spektros redzamas arī absorbcijas joslas, kas atbilst adsorbētam H_2O un CO_2, kā arī absorbcijas josla pie 875 cm^{-1}, kas, saskaņā ar literatūras datiem, var atbilst gan karbonātgrupu [CO_3], gan hidrogēnfosfātgrupu [HPO_4] svārstībām [200]. Zemas intensitātes [CO_3] grupu absorbcijas josla pie 875 cm^{-1} radusies no sintēzes vidē izšķīdušā atmosfēras oglekļa dioksīda (CO_2), un [HPO_4] grupu klātbūtne liecina par Ca deficītu HAp struktūrā. Respektīvi, atmosfēras CO_2 izšķīstot bāziskajā sintēzes vidē, veidojas (CO_3^{2-}) joni, kas aizņem (PO_4^{3-}) vietu HAp kristāliskajā režģī, veicinot B-tipa [CO_3] aizvietošanos [201]. Ar Mg modificēta HAp un CDHAp produktu gadījumā nav konstatētas izmaiņas līdz ar Mg satura pieaugumu. Savukārt, ar Mg modificēta ap-TCP produktu gadījumā novērota [CO_3]/[HPO_4] grupu absorbcijas joslas paplašināšanās, salīdzinot ar attiecīgo HAp un CDHAp produktu spektriem. Tas liecina, ka ap-TCP produktiem piemīt zemāka strukturālā sakārtotība. Aprakstītais novērojums sakrīt ar RDA datiem, kas apstiprina, ka ap-TCP gadījumā tiek iegūti produkti ar zemāku kristāliskuma pakāpi, pateicoties zemākai sintēzes temperatūrai.



3.2. att. Ar Mg modificētu ap-TCP, CDHAp un HAp FT-IS spektri

3.1.2. Morfoloģijas un īpatnējā virsmas laukuma pētījumi

Tādas biokeramikas fizikālķīmiskās īpašības kā porainība, virsmas raupjums u.c., kas ir noteicošas bioloģisko īpašību novērtēšanā, ir atkarīgas no prekursoru pulveru morfoloģijas, t. i., daļiņu izmēra, formas un aglomerācijas, jo tās ietekmē attiecīgo pulveru saķepšanas un graudu sablīvēšanās procesus. Līdz ar to tika noteikts sintēžu produktu jeb biokeramikas prekursoru pulveru īpatnējais virsmas laukums (SSA_{BET}), izmantojot N_2 adsorbciju jeb BET metodi, un pētīta morfoloģija, t. i., daļiņu forma, izmērs un aglomerācija, izmantojot LE-SEM (skat. 3.3. att.).



3.3. att. Ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursoru pulveru īpatnējais virsmas laukums un LE-SEM mikrofotogrāfijas: A – HAp, B – β-TCP, C – 2.0 Mg-HAp un D – 2.0 Mg-β-TCP

Neatkarīgi no (Ca + Mg)/P molārās attiecības izejas suspensijā, ar Mg modificētu CaP sintēžu produktu LE-SEM mikrofotogrāfijas (skat. 3.3. att. (A-D)) uzrāda tipisku, HAp fāzei raksturīgu nanoizmēra adatveida daļiņu morfoloģiju [202]. Visi produkti ir aglomerētā stāvoklī, kas neļauj viennozīmīgi spriest par individuālu daļiņu raksturīgajām iezīmēm. Respektīvi, sintēžu produktu nanoizmēra daļiņas vāju van der Vālsa spēku ietekmē savstarpēji mijiedarbojas, izveidojot primāros un sekundāros aglomerātus [203]. Vizuāli novērtējot, var secināt, ka iegūtie CaP biokeramikas prekursoru pulveri sastāv no garenas formas adatveida daļiņām vai primārajiem aglomerātiem, kuru dimensijas, t. i., garums ir 150–200 nm, un platums ir 25–50 nm.

Prekursoru pulveru primāro daļiņu vidējie izmēri (d_{BET}) aprēķināti, balstoties uz SSA_{BET} mērījumu un PYC patiesā blīvuma (ρ_{PYC}) mērījumu rezultātiem. Iegūto vērtību salīdzinājums ar vidējiem kristalītu izmēriem (D), kas iegūti, izmantojot RDA datus un Šērera vienādojumu (skat. 2.3.1. apakšnodaļu), sniegts 3.3. tabulā.

3.3. tabula

Ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursora pulveru vidējie daļiņu un kristalītu izmēri

	Parauga apzīmējums	ρ_{PYC}, g/cm^3	d_{BET}, nm	D, nm
HAp	HAp	2,80	22	22
	1.0 Mg-HAp	2,79	21	23
	2.0 Mg-HAp	2,78	21	23
	3.0 Mg-HAp	2,76	22	21
CDHAp	BCP (80/20)	2,77	28	33
	1.0 Mg-BCP (80/20)	2,78	27	31
	2.0 Mg-BCP (80/20)	2,80	26	30
	BCP (70/30)	2,77	28	29
	1.0 Mg-BCP (70/30)	2,76	27	29
	2.0 Mg-BCP (70/30)	2,78	23	30
	BCP (60/40)	2,80	32	34
	1.0 Mg-BCP (60/40)	2,79	32	32
	2.0 Mg-BCP (60/40)	2,78	29	31
ap-TCP	β-TCP	2,76	24	30
	1.0 Mg-β-TCP	2,83	23	29
	2.0 Mg-β-TCP	2,82	21	27
	3.0 Mg-β-TCP	2,81	20	26

Salīdzinot LE-SEM morfoloģijas pētījums un kristalītu izmēra aprēķinus, kas apkopoti 3.3. tabulā, secināms, ka LE-SEM redzamās adatveida daļiņas ir primārie kristalītu aglomerāti. BET metodes rezultāti liecina par primāro daļiņu izmēru samazināšanos līdz ar Mg satura pieaugumu CaP biokeramikas prekursoru pulveros. Salīdzinot ar analogu Mg saturu modificētu HAp un ap-TCP pulveru daļiņu vidējos izmērus, novērots, ka iegūtās vērtības ir tuvas, savukārt ar Mg modificēta CDHAp pulveru gadījumā d_{BET} vērtības ir par ~25 % augstākas. Iespējamais skaidrojums aprakstītajiem novērojumiem sniegts 3.1.1. apakšnodaļā, analizējot RDA ainas.

Veicot kristalītu izmēru aprēķinus, izmantojot Šērera vienādojumu, konstatēts, ka iezīmējas tendence līdz ar Mg satura pieaugumu pazemināties kristalītu izmēriem c-ass virzienā. Iegūtie rezultāti sakrīt ar BET metodes mērījumiem un ir saskaņā ar *Ren et al.* veiktajiem matemātiskās modelēšanas pētījumu rezultātiem, kur, izmantojot blīvuma

funkcionālo teoriju[15], noskaidrots, ka daļēja Ca atomu aizstāšana ar Mg HAp struktūrā izsauc kristāliskā režģa parametru izmaiņas [181]. Konstatēts, ka līdz ar Mg satura pieaugumu samazinās kristalītu izmēri gan *a*-ass, gan *c*-ass virzienā. Savukārt, *Farzadi et al.* [204] pētījumos konstatēts, ka HAp kristālrežģa parametri palielinās, struktūrā iekļaujot Mg. Šīs neatbilstības var izskaidrot režģa parametru atkarību no izvēlētās HAp sintēzes metodes. Dažādas HAp sintēzes metodes var veicināt dažādu hidratācijas līmeņu un, iespējams, citu defektu rašanos materiālos.

3.1.3. Termiskās stabilitātes un saķepšanas procesa pētījumi

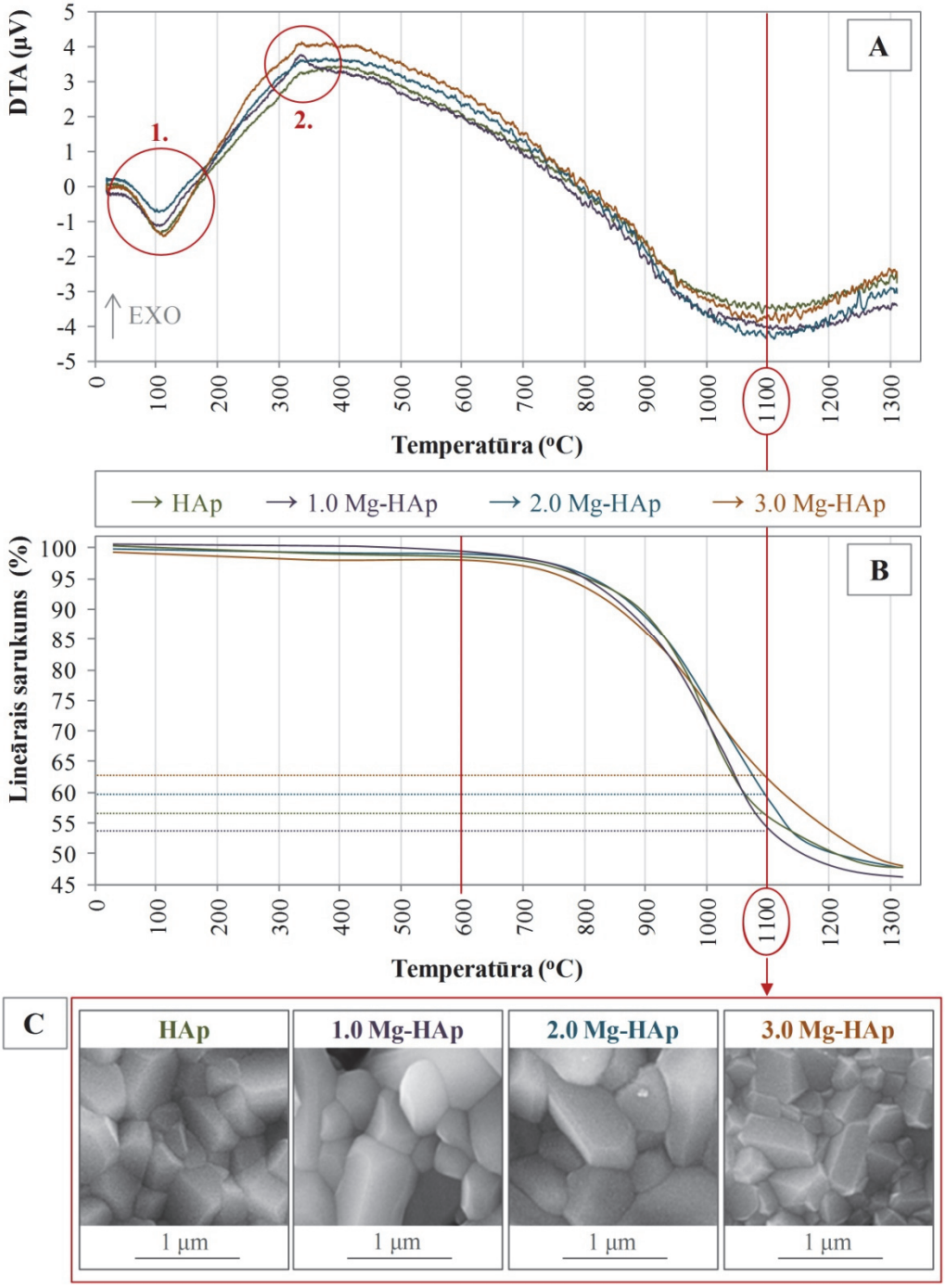
Biokeramikas prekursoru pulveriem veikti termiskās stabilitātes pētījumi ar DTA. Iegūtie dati sniedz iespēju prognozēt fāžu tīrību pēc augsttemperatūras apstrādes, kā arī novērtēt Mg ietekmi uz CaP raksturīgajiem siltumefektiem.

Ar Mg modificētu HAp un ap-TCP pulveru termiskās stabilitātes pētījumos līdz 1350 °C eksperimentāli iegūtajās DTA raksturlīknēs (skat. 3.4. att. (A) un 3.5. att. (A)) iezīmējas līdzīgi siltumefekti. Visos gadījumos DTA līknēs novērotais endotermiskais efekts, t. i., siltumefekts Nr. 1, temperatūras intervālā no ~50 °C līdz ~200 °C attiecināms uz adsorbētā atmosfēras H_2O un CO_2 aizvadīšanu.

Ar Mg modificēta HAp DTA līknes, kas parādītas 3.4. attēlā (A), līdz 1350 °C neuzrāda citus būtiskus endotermiskos efektus. Eksotermiskais efekts pie ~350 °C, t. i., siltumefekts Nr. 2 ar Mg modificēta HAp DTA raksturlīknēs norāda uz HAp fāzes kristalizēšanos [205]. Saskaņā ar literatūrā publicētajiem datiem HAp termiskā stabilitāte atkarīga no Mg satura. Palielinot Mg saturu virs 1 % (masas), ~800 °C notiek pakāpeniska HAp sadalīšanās β-TCP vai ar Mg aizvietotā β-TCP (Mg-β-TCP) jeb vitlokīta fāzē, t. i., HAp termiskā stabilitāte samazinās tieši proporcionāli Mg saturam [133, 135]. Līdz ar to, lai saglabātu fāzes tīrību, HAp tika modificēts, ar Mg saturu līdz ~1 % (masas), kas ir kritiska HAp fāzes termiskās stabilitātes saglabāšanai [206]. Ar Mg modificēta HAp DTA līknēs nav novērojami būtiski endotermiskie un/vai eksotermiskie efekti, kas norādītu uz HAp fāzes sadalīšanos, apliecinot, ka HAp ar Mg saturu līdz (0,83 ± 0,19) % (masas) ir termiski stabils līdz 1350 °C. Tomēr jāņem vērā, ka neliela β-TCP satura gadījumā, pārejas HAp → β-TCP intensitāte var nebūt pietiekami augsta,

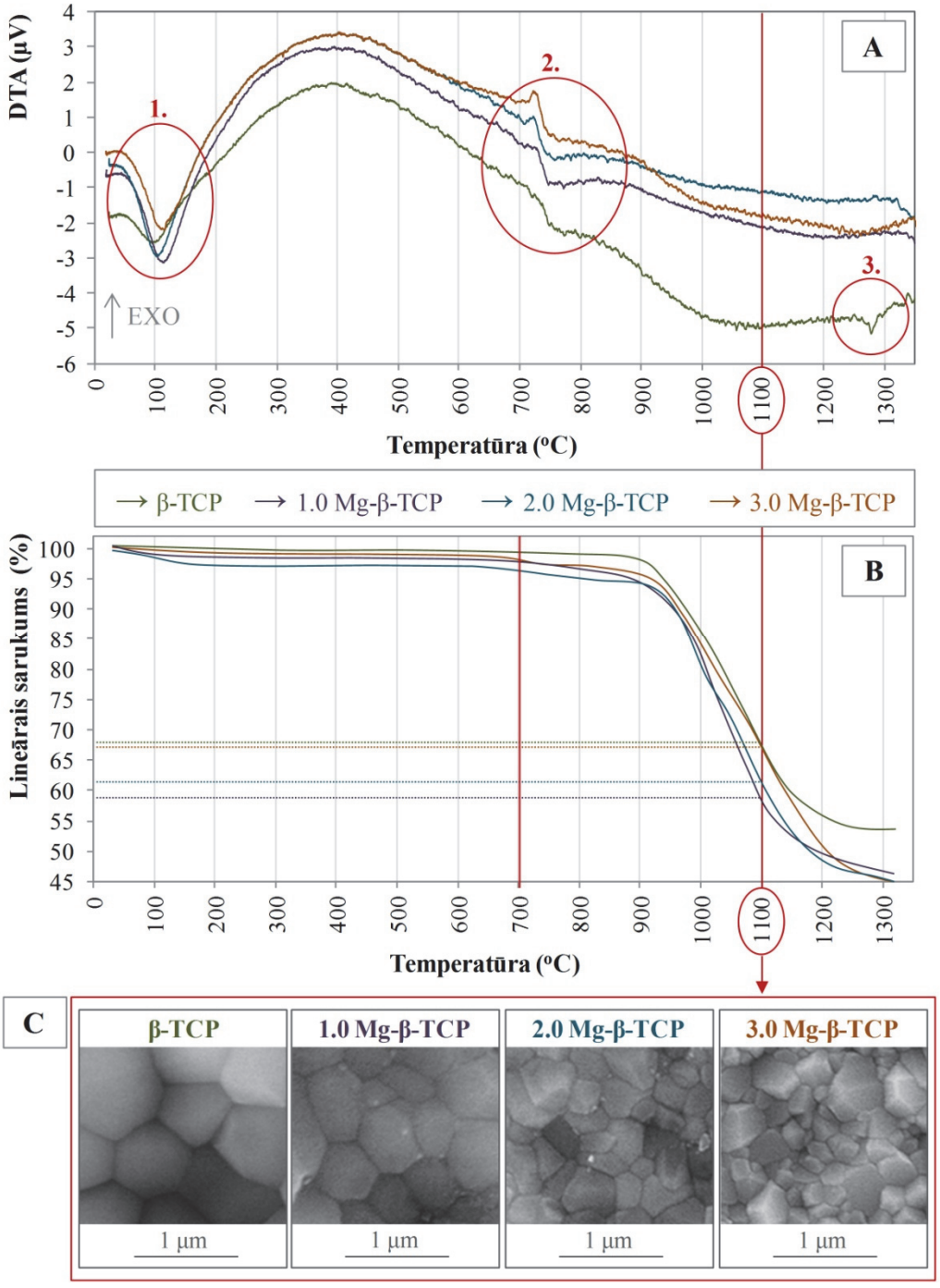
[15] Blīvuma funkcionālā teorija - skaitļošanas kvantu mehānikas modelēšanas metode, ko izmanto fizikā, ķīmijā un materiālzinātnē multi-komponenešu sistēmu elektronisko struktūra, īpaši, atomu, molekulu un kondensēto fāžu prognozēšanai.

lai izraisītu siltumefektu, kas iezīmētos DTA raksturlīknēs, tādējādi, lai apstiprinātu ar Mg modificēta HAp biokeramikas fāžu tīrību, papildus jāveic augsttemperatūrā apstrādātu sintēžu produktu fāžu sastāva analīze (skat. 3.2. apakšnodaļu).



3.4. att. Ar Mg modificēta HAp: A - DTA līknes, B – dilatometriskās līknes, C – LE-SEM mikrofotogrāfijas pēc termiskās apstrādes 1100 °C 1 h

Ar Mg modificēta ap-TCP DTA līknēs, kas parādītas 3.5. attēlā (A), detektētie siltumefekti Nr. 2, t. i., efekti temperatūras intervālā no ~700 ºC līdz ~800 ºC attiecināmi uz ap-TCP transformāciju uz β-TCP fāzi. DTA līknēs transformācija ap-TCP → β-TCP iezīmējas kā eksotermiska reakcija, kam seko tūlītēja endotermiska reakcija [205].



3.5. att. Ar Mg modificēta ap-TCP: A - DTA līknes; B – dilatometriskās līknes; C – LE-SEM mikrofotogrāfijas pēc termiskās apstrādes 1100 ºC 1 h

Novērots, ka līdz ar Mg satura pieaugumu ap-TCP paraugos, pieaug arī eksotermiskā efekta intensitāte. Saskaņā ar *Combes et al.* teoriju, eksotermiskais efekts rodas amorfai vielai ieņemot termodinamiski izdevīgāku stāvokli, t. i., amorfās komponentes struktūrvienību sakārtotības palielināšanās jeb kristalizācijas rezultātā. Turklāt starp eksotermiskā efekta intensitāti un amorfās komponentes saturu pastāv tieši proporcionāla sakarība [207]. Tādējādi secināms, ka Mg satura pieaugums veicina amorfas fāzes veidošanos ap-TCP pulveros. Ap-TCP, kas iegūts bez papildus Mg avota pievienošanas sintēzes vidē jeb β-TCP paraugu DTA līknēs tika detektēts endotermisks efekts pie ~1280 ºC, t. i., siltumefekts Nr. 3, kas radies TCP transformācijas no β- uz α-polimorfu modifikāciju rezultātā [67, 68]. Pieaugot Mg saturam ap-TCP līdz (0,67 ± 0,08) % (masas), parēja β-TCP → α-TCP DTA raksturlīknēs netiek novērota, kas liecina, ka Mg stabilizē β-TCP fāzi, un polimorfu maiņa notiek virs 1350 ºC [208].

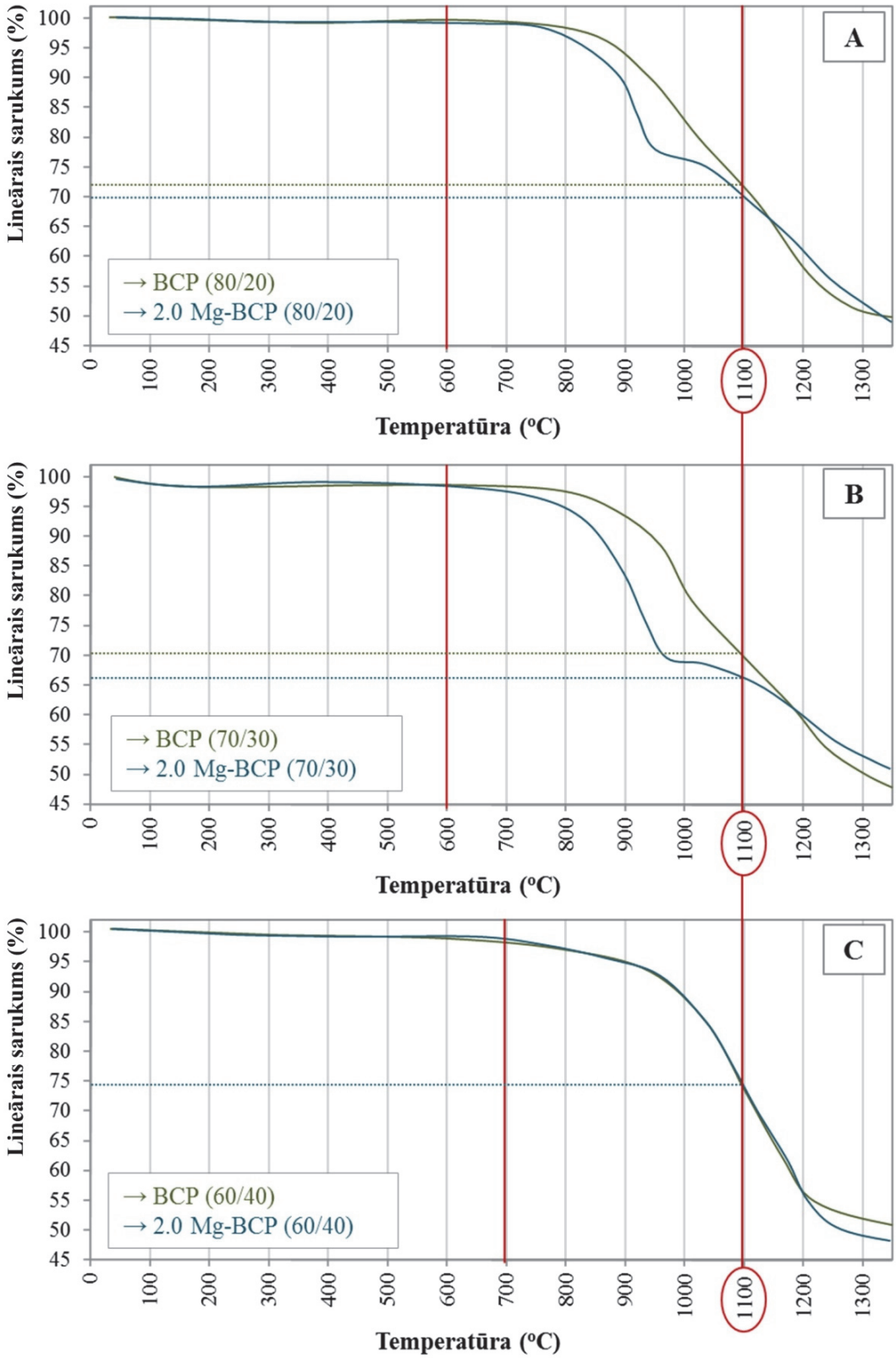
Saķepšanas procesa izpētei ar Mg modificētu CaP prekursoru pulveriem veikti dilatometriskie pētījumi. Eksperimentālie paraugi tika analizēti, izmantojot ATM, kas sniedz informāciju par vielas tilpuma atkarību no temperatūras.

Ar Mg modificētu HAp un ap-TCP ATM jeb dilatometrisko līkņu, kas parādītas attiecīgi 3.4. attēlā (B) un 3.5. attēlā (B), analīze ļauj secināt, ka saķepšanas procesu mehānisms šiem CaP sintēžu produktiem ir līdzīgs. Savstarpēji salīdzinot HAp un ap-TCP pulveru dilatometriskās līknes, novērojams, ka HAp gadījumā saķepšana norit zemākā temperatūrā nekā ap-TCP gadījumā. HAp paraugu saķepšanas process visos gadījumos, neatkarīgi no Mg satura, sākas ~600 ºC, un intensīvākā saķepšana jeb straujākais sarukums, novērojams temperatūras intervālā no ~950 ºC līdz ~1050 ºC (skat. 3.4. att. (B)). Savukārt, ap-TCP produktu gadījumā saķepšanas procesa sākums detektēts ~700 ºC, un straujākais sarukums – no ~950 ºC līdz ~1150 ºC (skat. 3.5. att. (B)). Ar Mg modificēta ap-TCP pulveriem dilatometriskajās līknēs novērojama intensīva saķepšana jeb straujš tūlītējs sarukums saķepšanas sākumposmā, ~700 ºC. Šis novērojums ir saskaņā ar DTA līknēs (skat. 3.5. att. (A)) detektēto ap-TCP → β-TCP fāžu pāreju, kas ietver amorfās komponentes kristalizēšanos, ko pavada straujšs sarukums [205]. Gan ar Mg modificēta HAp, gan ap-TCP produktiem virs 1300 ºC sarukšana praktiski nenotiek, un var uzskatīt, ka saķepšanas process ir beidzies. Jāatzīmē, ka HAp gadījumā visi produkti neatkarīgi no Mg satura sasniedz 45–50 % sarukumu. Savukārt, ap-TCP gadījumā līdz ar Mg saturu ievērojami pieaug eksperimentālo paraugu sarukums. Proti, paraugiem, kas pagatavoti, pievienojot sintēzes vidē papildus Mg avotu, saķepšana norit pilnīgāk. Respektīvi, ja β-TCP gadījumā tiek sasniegts ~45 % sarukums, tad 1.0 Mg-β-TCP, 2.0 Mg-β-TCP un 3.0 Mg-β-TCP – ~55 %. Tas skaidrojams ar β-TCP

eksperimentālo paraugu DTA līknē detektēto TCP polimorfo modifikāciju maiņu jeb β-TCP → α-TCP pāreju ~1280 ºC, veidojoties divkomponenšu sistēmai, kas kavē graudu sablīvēšanos komponenšu dažādo komponenešu saķepšanas procesu, kā arī graudu izmēru un formas atšķirību dēļ. Aprakstītais novērojums ir par pamatu tam, ka β-TCP biokeramikas izmantošana biomedicīnas vajadzībām ir ierobežota dēļ tās zemās mehāniskās izturības. β-TCP biokeramikas iegūšana augstākās temperatūrās, kas veicinātu labāku graudu sablīvēšanos un sekojošu mehānisko īpašību uzlabošanu, ir apgrūtināta, jo temperatūras intervālā no 1120 ºC līdz 1290 ºC notiek aprakstītā TCP polimorfo modifikāciju maiņa [135, 136]. Šie rezultāti ļauj secināt, ka ar Mg modificēta ap-TCP prekursoru izmantošana biokeramikas izstrādē, veicinātu blīvākas biokeramikas ar uzlabotām mehāniskajām īpašībām iegūšanu, kas īpaši svarīgi porainas biokeramikas gadījumā.

Turpmāk darbā tiks analizēti biokeramikas paraugi, kas saķepināti 1100 ºC. Ar Mg modificētu HAp gadījumā termiskā apstrāde 1100 ºC izraisa eksperimentālo paraugu sarukumu robežās no 45 % līdz 50 %, savukārt, ar Mg modificētu ap-TCP gadījumā – no 35 % līdz 45 %. Turklāt augsttemperatūrā apstrādātu sintēžu produktu LE-SEM mikrofotogrāfijas liecina, ka Mg satura pieaugums paraugos, veicina garenu, heterogēna izmēra un formas graudu veidošanos un uzlabo to sablīvēšanos.

Veicot ar Mg modificēta CDHAp produktu dilatometriskos pētījumus, līknēs tika novērotas būtiskas saķepšanas procesu atšķirības, mainoties gan (Ca + Mg)/P molārajai attiecībai, gan Mg saturam (skat. 3.6. att.). Respektīvi, ja (Ca + Mg)/P molārā attiecība ir 1,63 un 1,61, tad ar Mg modificētu CDHAp produktu dilatometriskās līknēs novērojams, ka Mg satura pieaugums veicina divpakāpju saķepšanas procesu (skat. 3.6. att. (A) un (B)). Ar Mg modificēta HAp produktu gadījumā saķepšana sākas ~600 ºC, kam seko relatīvi straujš sarukums par ~25 % un ~30 %, attiecīgi, paraugu 2.0 Mg-BCP (80/20) un 2.0 Mg-BCP (70/30) gadījumā. Pirmais saķepšanas etaps, kas sasniedz maksimumu pie ~950 ºC, attiecināms uz mazāko daļiņu sakārtošanos termodinamiski izdevīgākā pozīcijā jeb kristalizēšanos, un tas pārklājas ar otro saķepšanas etapu, kas atbilst pamata saķepšanas procesam. Šeit aprakstītie novērojumi korelē ar BET rezultātiem, kas liecina par daļiņu vidējā izmēra pazemināšanos līdz ar Mg satura pieaugumu produktos, īpaši, ar (Ca + Mg)/P molāro attiecību 1,61. Secināms, ka prekursora pulveriem ar mazākām daļiņām saķepšanas process notiek efektīvāk.



3.6. att. Ar Mg modificēta CDHAp produktu ar (Ca + Mg)/P molāro attiecību A – 1,63, B – 1,61 un C – 1,60 dilatometriskās līknes

Jāatzīmē, ka CDHAp produktiem, kas sintezēti bez papildus Mg avota pievienošanas sintēzes vidē, attiecīgi paraugiem BCP (80/20) un BCP (70/30), pie 950 ºC konstatēts relatīvi zems, proti, ~10 %, sarukums. Pazeminoties sintēžu produktu (Ca + Mg)/P molārajai attiecībai līdz 1,60, saķepšanas mehānisms ir līdzīgs ap-TCP saķepšanai (skat. 3.6. att. (C)), kas sākas ~700 ºC, un vienmērīga sarukšana un sablīvēšanās turpinās līdz 1300 ºC, sasniedzot 50–55 % sarukumu. 1100 ºC visi produkti neatkarīgi no Mg satura un (Ca + Mg)/P molārās attiecības sasniedz (30 ± 5) % sarukumu.

Iegūtie rezultāti apstiprina, ka CaP sintēžu produktu termiskā stabilitāte ir atkarīga galvenokārt no stehiometriskā un ķīmiskā sastāva, bet saķepšana ir sarežģīts process un atkarīgs no tādiem fizikālķīmiskiem parametriem kā homogenitāte, īpatnējais virsmas laukums un pulveru daļiņu izmērs [209]. Saskaņā ar BET metodes mērījumu rezultātiem, palielinoties Mg saturam prekursoru pulveros, pieaug to SSA_{BET} un attiecīgi samazinās d_{BET}. Atspoguļotie rezultāti apstiprina, ka līdz ar prekursoru pulveru d_{BET} pazemināšanos tiek veicināti saķepšanas un graudu sablīvēšanās procesi.

3.2. Biokeramikas fizikālķīmisko īpašību raksturojums

Promocijas darbā pētīts ar Mg modificētu CaP prekursoru potenciāls lietojums izmantošanai gan blīvas, gan porainas biokeramikas izstrādē. Pakļaujot biokeramikas prekursoru, t. i., ar Mg modificētu HAp, CDHAp un ap-TCP, presķermeņus augsttemperatūras apstrādei, iegūti, attiecīgi, blīvas ar Mg modificētu HAp, BCP un β-TCP biokeramikas pamatnes, kas izmantotas *in vitro* pārbaudēm, proti, šķīdības, *in vitro* biokativitātes un citotoksicitātes novērtēšanai.

Nereti kaulu aizvietotājmateriālus, t. sk. biokeramiku, izgatavo porainu, lai uzlabotu integrāciju ar kaulaudiem [40]. Izpētīts, ka trīsdimensionāla poraina struktūra, kas analoga dabīgā kaula matricai un kam raksturīga caurejošā jeb atvērtā porainība ar poru izmēriem robežās 100–500 μm, veicina kaulaudu ieaugšanu implantmateriālā, nodrošinot ķīmisko sasaisti starp materiālu un kaulu, kā arī mehānisko fiksāciju [210, 211]. Aprakstītais porainas biokeramikas potenciāls un sistemātisku pētījumu trūkums par Mg satura ietekmi uz porainas CaP biokeramikas, kas izgatavotas ar adaptētu viskozās masas uzputošanas metodi [187], raksturojumu promocijas darba ietvaros rosināja izstrādāt porainas ar Mg modificētu CaP biokeramikas pamatnes un izpētīt to fizikālķīmiskās īpašības.

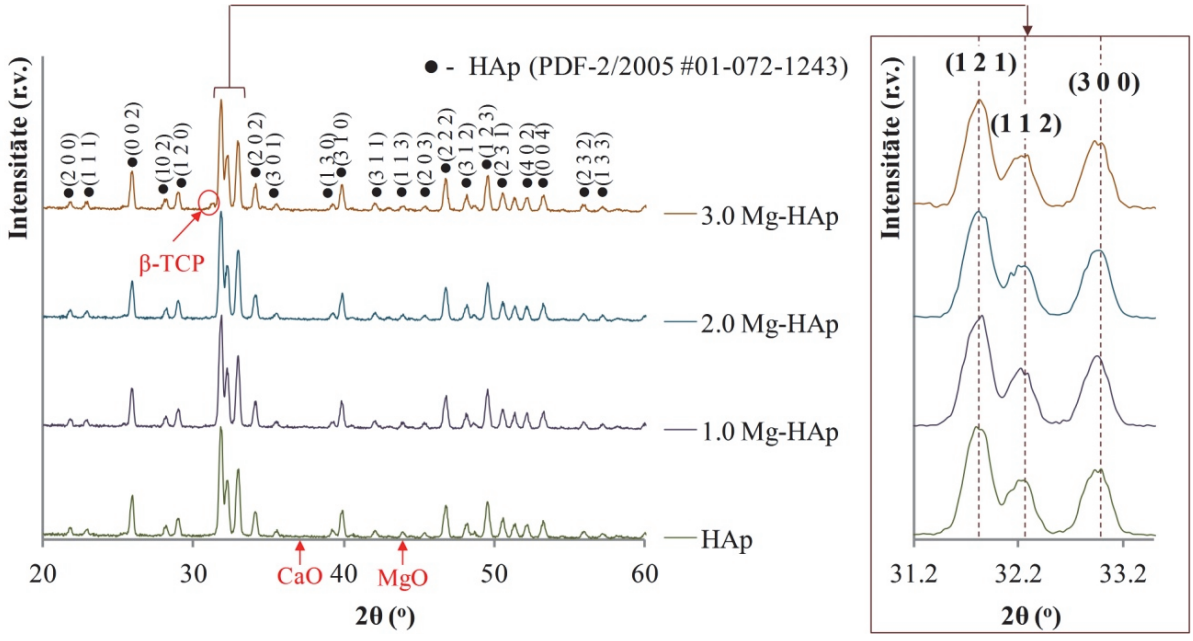
Sekojošajās apakšnodaļās aplūkota Mg satura ietekme uz CaP biokeramikas kvalitatīvo un kvantitatīvo fāžu sastāvu, kā arī molekulāro struktūru. Lai pārliecinātos par izstrādātās biokeramikas fāžu tīrību un izslēgtu bioloģisko saderību nelabvēlīgi ietekmējošu kristālisku fāžu, t. i., izejas materiālu, kā arī MgP un/vai CaP blakusproduktu, piemaisījumu klātbūtni, tika analizētas RDA ainas un salīdzinātas ar Starptautiskā difrakcijas datu centra datu bāzes PDF-2/2005 ierakstiem. Saskaņā ar ISO 13175-3 HAp kristalogrāfisko struktūru raksturo PDF-2/2005 ieraksts Nr. 01-072-123, savukārt, β-TCP – PDF-2/2005 ieraksts Nr. 00-009-0169. Modifikācijas izraisīto nobīžu identificēšanai HAp, BCP un β-TCP molekulārajā struktūrā tika veikta attiecīgo FT-IS spektru analīze.

Tādas biokeramikas īpašības kā šķīdība jeb jonu izdalīšanās, bioaktivitāte un citotoksicitāte jeb šūnu atbildes reakcija, ietekmē ne vien eksperimentālo paraugu ķīmiskais un fāžu sastāvs un molekulārā struktūra, bet arī nākamajās apakšnodaļās atspoguļotās struktūras pazīmes, t. i., mikrostruktūra, porainība un virsmas topogrāfija.

3.2.1. Ar Mg modificēta HAp biokeramikas fizikālķīmisko īpašību raksturojums

3.2.1.1. Ar Mg modificēta HAp biokeramikas fāžu un molekulārais sastāvs

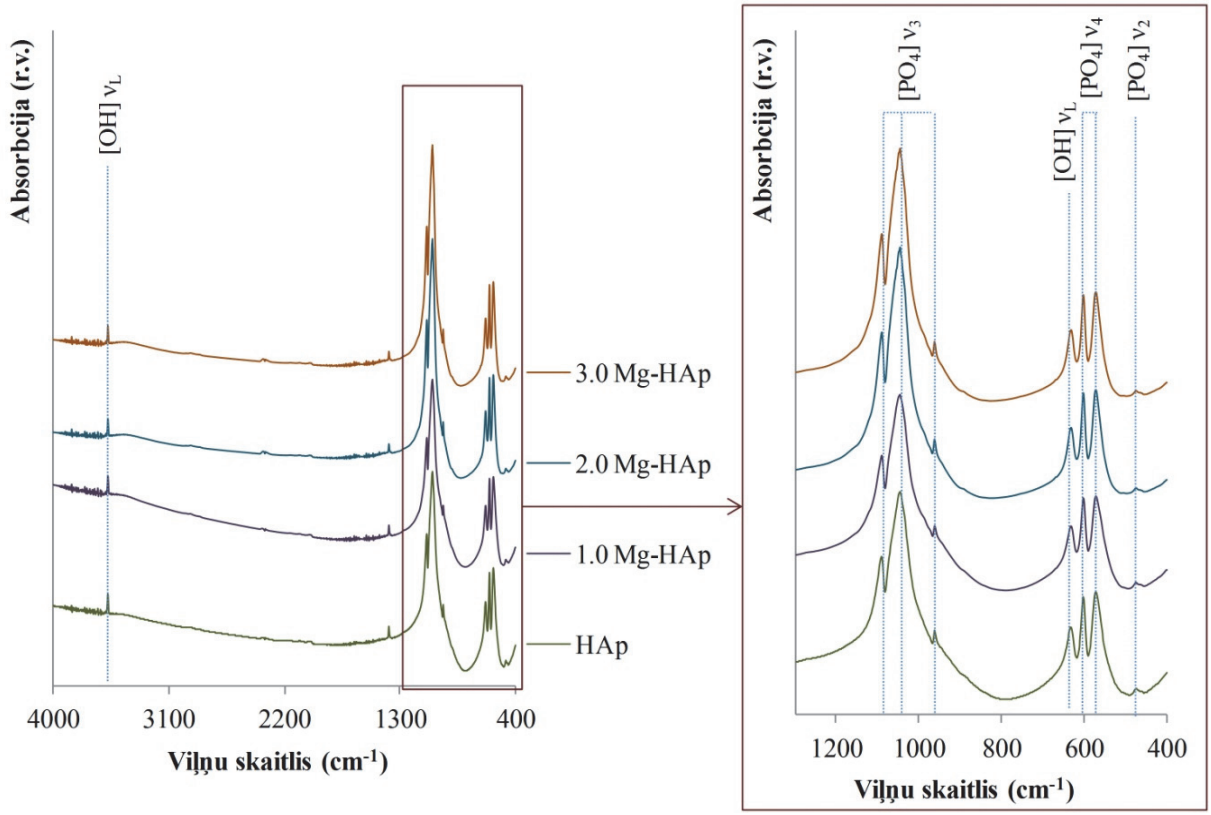
Salīdzinot RDA ainas pirms (skat. 3.1. att. (B)) un pēc (skat. 3.7. att.), novērots, ka ar Mg modificēta HAp biokeramikas prekursoru augsttemperatūras apstrāde izsauc HAp raksturīgo RDA maksimumu sašaurināšanos un intensitātes pieaugumu, kas liecina par kristalītu izmēru un kristāliskuma pakāpes palielināšanos.



3.7. att. Ar Mg modificēta HAp biokeramikas RDA ainas

Izejmateriālu, t. i., CaO un MgO, raksturīgie maksimumi nevienā no RDA ainām nav detektēti, kas ļauj secināt, ka minētie piemaisījumi nepastāv vai to koncentrācija produktos ir zem RDA metodes detektēšanas robežas, t. i., < 2 % (masas). Tādējādi, ar Mg modificēta HAp biokeramikas fāžu sastāva analīze apliecina, ka kopējais blakusfāžu, t. i., CaO un MgO, saturs ir zemāks kā 5 % (masas), izpildot ISO 137790-3 standarta fāžu tīrības prasības CaP implantmateriāliem. Ar Mg modificēta HAp biokeramikas RDA ainās identificētie maksimumi pilnībā atbilst rentgentīrai HAp fāzei, ja Mg saturs nepārsniedz (0,64 ± 0,10) % (masas). Kā redzams 3.7.attēlā, Mg saturam produktos sasniedzot (0,83 ± 0,19) % (masas) (3.0 Mg-HAp), produktiem pēc augsttemperatūras apstrādes 1100 °C uzņemtajās RDA ainās detektēti gan HAp fāzes raksturīgie maksimumi, gan β-TCP fāzes raksturīgais maksimums pie 2θ ~31°, kas liecina par β-TCP un/vai Mg-β-TCP (vitlokīta) fāzes klātbūtni 3.0 Mg-HAp produktos. RDA ainas nesniedz precīzu informāciju par to, vai produktos veidojas β-TCP vai Mg-β-TCP fāze, jo abu vielu raksturīgie RDA maksimumi pārklājas. β-TCP/Mg-β-TCP fāžu klātbūtne liecina, ka modificēšana ar Mg noteiktā koncentrācijā veicina HAp termiskās stabilitātes pazemināšanos, kas korelē ar literatūrā publicēto informāciju [135, 136, 206]. Pamatojoties uz šo parādību, literatūrā atrodami pētījumi, kuru mērķis ir ar Mg modificētu BCP izstrāde, nodrošinot precīzu HAp struktūrā iekļautā Mg koncentrācijas kontroli [141].

Augsttemperatūrā apstrādātu ar Mg modificēta HAp biokeramikas paraugu FT-IS spektri (skat. 3.8. att.) ievērojami atšķiras no sintezēto pulveru FT-IS spektriem, kas parādīti 3.2. attēlā. Ar Mg modificēta HAp biokeramikas paraugu FT-IS spektros detektēti intensīvi, HAp raksturīgo [PO_4] grupu saišu svārstībām, t. i., valentām simetriskām svārstībām pie 471 cm^{-1} (ν_2), valentām asimetriskām svārstībām reģionā no 900–1200 cm^{-1} (ν_3) un deformācijas svārstībām pie 570 cm^{-1} un 601 cm^{-1} (ν_4), kā arī [OH] grupu saišu valentām svārstībām pie 631 cm^{-1} un 3573 cm^{-1} (ν_L), atbilstoši absorbcijas joslu maksimumi. Likumsakarīgi, pēc augsttemperatūras apstrādes izzūd [CO_3]/[HPO_4] grupu absorbcijas joslas (skat. 3.2. att.), kas liecina par viegli gaistošo [CO_3] grupu izzušanu un CDHAp fāzes transformāciju par stehiometrisku HAp fāzi. Nav novērojama attiecīgo absorbcijas joslu maksimumu novietojuma un/vai intensitātes maiņa līdz ar Mg satura pieaugumu HAp biokeramikā, kas liecina, ka Mg aizvieto Ca, neizsaucot būtiskas nobīdes, piemēram, saišu garuma izmaiņas, HAp molekulārajā struktūrā. Tādējādi secināms, ka Mg modifikācija sekmē HAp fāzes veidošanos ar tādām pašām molekulārās struktūras iezīmēm kā nemodificēta HAp gadījumā.



3.8. att. Ar Mg modificēta HAp biokeramikas FT-IS spektri

3.2.1.2. Ar Mg modificēta HAp biokeramikas mikrostruktūra

1) <u>Blīvu ar Mg modificēta HAp biokeramikas pamatņu raksturojums</u>

Attiecīgajā apakšnodaļā sniegts blīvu ar Mg modificēta HAp biokeramikas pamatņu, kas turpmāk izmantotas *in vitro* pārbaudēm, strukturāls raksturojums.

Blīvu ar Mg modificēta HAp biokeramikas pamatņu kopējās porainības (P_K) un šķietamā blīvuma ($\rho_{šķ}$), kas noteikti, izmantojot Arhimēda metodi, kā arī presķermeņu lineārā sarukuma (S_V) pēc augsttemperatūras apstrādes (1100 °C, 1 h) kvantitatīvās vērtības apkopotas 3.4. tabulā. Efektīva ar Mg modificēta HAp prekursoru pulveru daļiņu sablīvēšanās notikusi HAp, 1.0 Mg-HAp, 2.0 Mg-HAp biokeramikas pamatņu gadījumā, uz ko norāda relatīvi zema P_K vērtība un liels sarukums pēc augsttemperatūras apstrādes. Ievērojamais (attiecībā pret HAp, 1.0 Mg-HAp un 2.0 Mg-HAp) 3.0 Mg-HAp biokeramikas pamatņu P_K pieaugums skaidrojams ar β-TCP/Mg-β-TCP fāžu klātbūtni. Jāatzīmē, ka biokeramikas pamatņu S_V, P_K un līdz ar to arī $\rho_{šķ}$ ietekmē atšķirīgie HAp un β-TCP fāžu saķepšanas procesi, kas aprakstīti 3.1.3.apakšnodaļā.

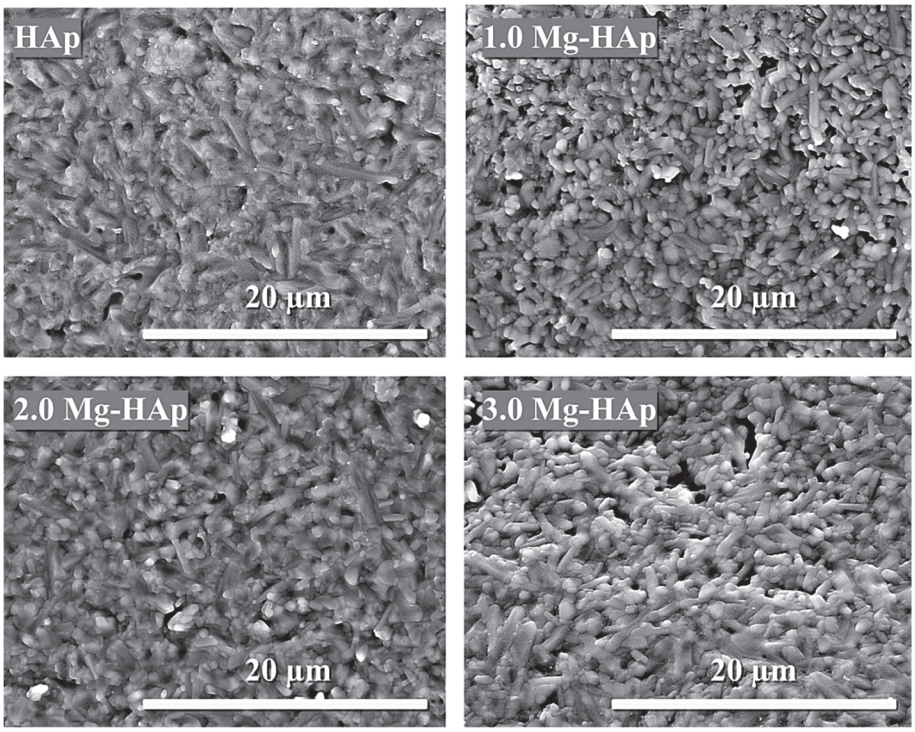
3.4. tabula

Blīvu ar Mg modificēta HAp biokeramikas pamatņu S_V, $\rho_{šķ}$ un P_K

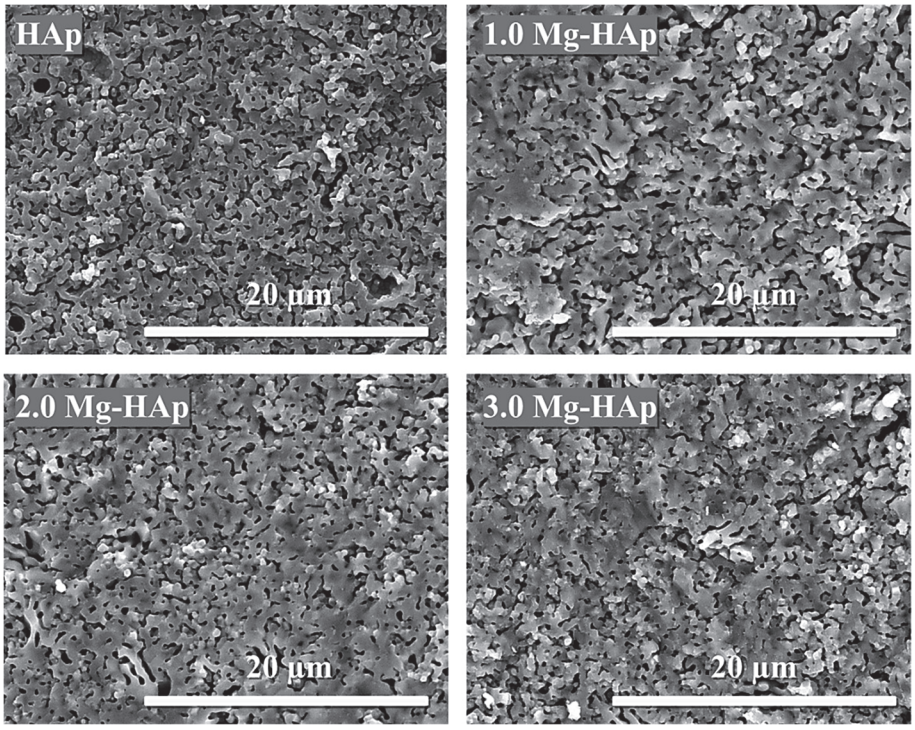
Parauga apzīmējums	S_V, %	$\rho_{šķ}$, g/cm^3	P_K, %
HAp	51 ± 1	2,86 ± 0,06	9,50 ± 1,77
1.0 Mg-HAp	48 ± 2	2,68 ± 0,06	15,24 ± 1,98
2.0 Mg-HAp	49 ± 1	2,59 ± 0,06	18,07 ± 5,18
3.0 Mg-HAp	40 ± 1	2,31 ± 0,08	27,05 ± 2,65

Vairākumam ar Mg modificēta HAp biokeramikas pamatņu S_V, $\rho_{šķ}$ un P_K kvantitatīvās vērtības kļūdu robežās sakrīt. Iegūtie dati korelē ar biokeramikas pamatņu virsmas (skat. 3.9. att.) un lūzuma vietas (skat. 3.10. att.) LE-SEM mikrofotogrāfijās redzamo, kas apliecina, ka HAp biokeramikas mikrostruktūra būtiski nemainās līdz ar Mg satura pieaugumu. Biokeramikas pamatņu virsmas LE-SEM mikrofotogrāfijas liecina, ka ar Mg modificēta HAp biokeramikai raksturīgi heterogēna izmēra, gareni graudi. Savukārt, paraugu lūzuma vietas LE-SEM mikrofotogrāfijas uzrāda mikroporainas HAp biokeramikas struktūru ar blīvi saķepušu graudu apgabaliem bez izteiktām strapgraudu robežvirsmām.

Iegūtie rezultāti viennozīmīgi nesakrīt ar literatūrā atrodamo informāciju. Piemēram, *Cacciotti et al.* pētījumā par Mg ietekmi uz HAp biokeramikas saķepšanas procesiem pierādīts, ka Mg pievienošana (≥ 0,6 % (masas)) veicina biokeramikas porainības pieaugumu [136]. Arī *Zyman et al.* pētījumā, konstatēts, ka Mg koncentrācijas (≤ 1,8 % (masas)) pieaugums HAp biokeramikā izraisa spiedes stiprības un mikrocietības pazemināšanos, kas saistīts ar ievērojamu biokeramikas P_K palielināšanos. Tomēr šajā pašā pētījumā konstatēts, ka lūzuma izturībai ir tendence pieaugt līdz ar Mg satura palielināšanu līdz 0,6 % (masas) HAp biokeramikā [212]. Par iemeslu tam ir biokeramikas graudu vidējā izmēra, mikroporainības samazināšanās, kā arī vāju starpgraudu robežu veidošanās novēršana. Minētās tendences tika novērotas arī *Fadeev et al.* pētījumā, palielinot Mg saturu HAp biokeramikā no 1 % (molu) līdz 10 % (molu) [137].



3.9. att. Ar Mg modificēta HAp biokeramikas virsmas LE-SEM mikrofotogrāfijas



3.10. att. Ar Mg modificēta HAp biokeramikas lūzuma vietas LE-SEM mikrofotogrāfijas

Ņemot vērā, ka mikrostruktūras iezīmes ar Mg modificēta HAp biokeramikas sērijām ir līdzīgas, var pieņemt, ka tās praktiski neietekmē *in vitro* pārbaužu rezultātus.

2) Porainu ar Mg modificēta HAp biokeramikas pamatņu raksturojums

Porainas ar Mg modificēta HAp biokeramikas struktūras raksturošanai noteikta P_K un P_A ar Arhimēda metodi un zaļķermeņu sarukums pēc augsttemperatūras apstrādes (1150 °C, 2 h), kuru kvantitatīvās vērtības apkopotas 3.5. tabulā. Izvērtējot biokeramikas paraugu lineāro tilpuma sarukumu pēc augsttemperatūras apstrādes jeb S_V vērtības, novērojams, ka palielinoties Mg saturam tās nedaudz samazinās. Savukārt Arhimēda metodes mērījumi liecina, ka, palielinoties Mg saturam, HAp biokeramikas P_K un P_A būtiski nemainās.

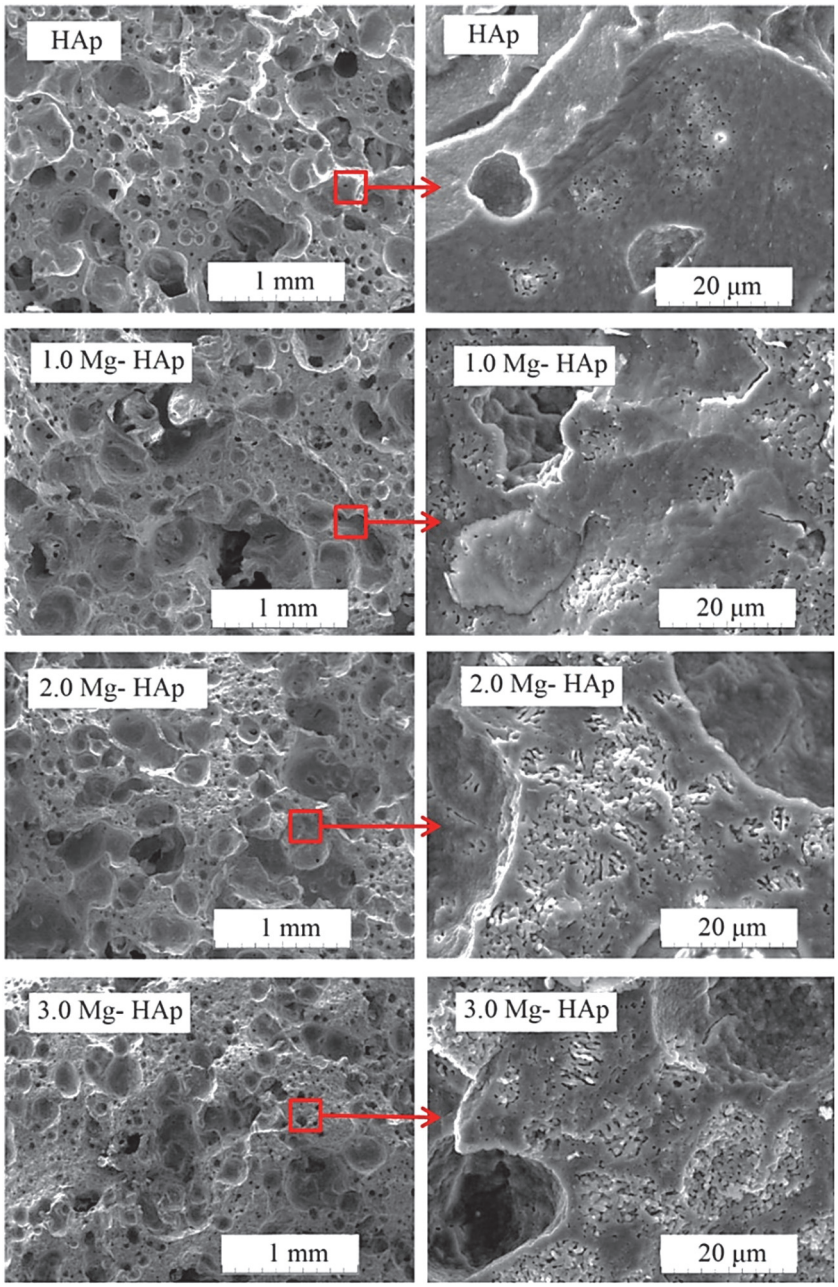
3.5. tabula

Porainu ar Mg modificēta HAp biokeramikas pamatņu S_V, P_K un P_A

Parauga apzīmējums	S_V, %	P_K, %	P_A, %
HAp	30 ± 1	58,26 ± 3,65	42,29 ± 4,52
1.0 Mg-HAp	30 ± 1	56,32 ± 1,61	38,82 ± 1,31
2.0 Mg-HAp	27 ± 1	59,76 ± 1,47	41,43 ± 2,95
3.0 Mg-HAp	26 ± 1	58,55 ± 2,62	39,61 ± 2,65

Starpība starp P_K un P_A ir slēgtā porainība, kas kaulu aizvietotājmateriāliem nav vēlama. Līdz ar to viskozās masas uzputošanas metodes gadījumā ir svarīgi, lai formēšanas procesā masā neveidotos gaisa burbuļi, kas veicina slēgto poru veidošanos [187]. P_A var palielināt, variējot CaP prekursoru pulveru daļiņu izmērus un poru veidojošā aģenta koncentrāciju [186]. LE-SEM mikrofotogrāfijās (skat. 3.11. att.) redzams, ka ar Mg modificētas HAp biokeramikas pamatņu poru izmērs un forma ir heterogēna. Ar viskozās masas uzputošanas metodi iegūtai biokeramikai raksturīgs bimodāls poru izmēru sadalījumu, t. i., makroporainība, kā arī mikroporainība. Respektīvi, paraugi satur makroporas (50 μm līdz 1 mm), makroporu sieniņās izkliedētas mikroporas, kuru izmēri ir ≤ 2 μm. Vizuālie novērojumi liecina, ka Mg satura pieaugums veicina mikroporu veidošanos, t. i., mikroporainību. Likumsakarīgi, ka pieaugot biokeramikas paraugu mikroporainībai, pamatņu sarukums samazinās.

Poras ar izmēriem ~1 mm veicina jonu migrāciju jeb jonapmaiņu, kas sākotnēji notiek starp implantmateriālu un asins plazmu organismā, labvēlīgi ietekmējot šūnu absorbcijas dinamiku. Mikroporainība ir svarīga no kapilaritātes un ķermeņa šķidrumu caurlaidības viedokļa, kas sekmē biokeramikas šķīdību organisma vidē [213].



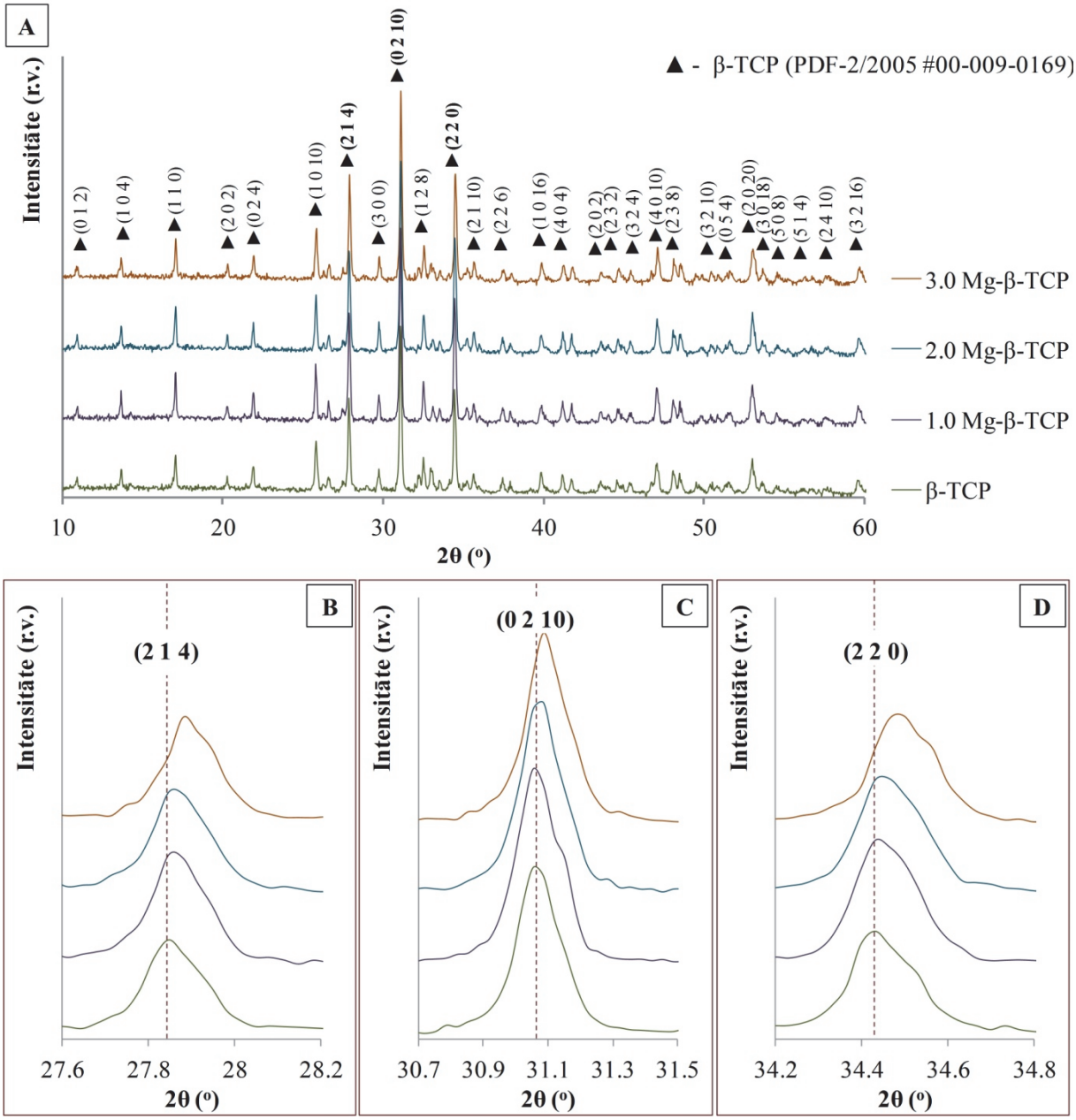
3.11. att. Porainas ar Mg modificēta HAp biokeramikas lūzuma vietas LE-SEM mikrofotogrāfijas

3.2.2. Ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas fizikālķīmisko īpašību raksturojums

3.2.2.1. Ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas fāžu un molekulārais sastāvs

Ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas RDA ainas (skat. 3.12. att.) liecina par rentgentīras β-TCP fāzes iegūšanu pēc augsttemperatūras apstrādes neatkarīgi no Mg satura. Nav identificēti maksimumi, kas atbilstu tipiskiem β-TCP fāzes CaP izcelsmes, t. i., α-TCP un/vai kalcija pirofosfāta ($Ca_2P_2O_7$), kā arī izejvielu, t. i., CaO un/vai MgO un MgP

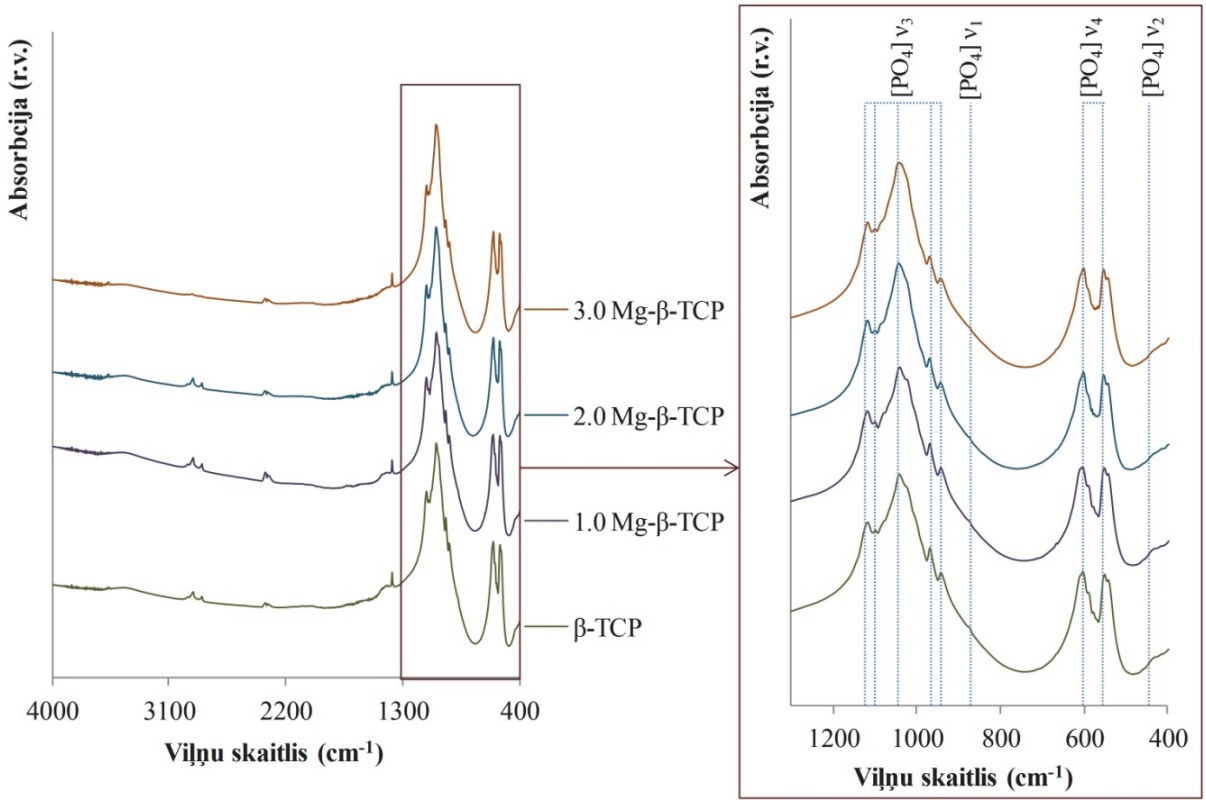
piemaisījumiem, tādējādi tiek izpildītas ISO 137790-3 prasības. Līdz ar Mg satura pieaugumu biokeramikas paraugos novērojamas RDA maksimumu nobīdes augstāku 2θ vērtību virzienā (skat. 3.12. att. (B, C, D)), kas liecina par kristālu izmēru samazināšanos, kas atbilst literatūrā norādītajām izmaiņām, ja Mg iekļaujas β-TCP struktūrā [214].



3.12. att. Ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas RDA ainas

Ar Mg modificēta β-TCP FT-IS spektri (skat. 3.13. att.) liecina, ka ar Mg modificēta ap-TCP augsttemperatūras apstrāde izraisa [PO_4] grupu pārstrukturēšanos. Visi ar Mg modificēta β-TCP FT-IS absorbcijas joslu maksimumi atbilst tipiskām β-TCP fāzes [PO_4] saišu

svārstībām [200]. Nav novērojama attiecīgo absorbcijas joslu maksimumu novietojuma un/vai intensitātes maiņa līdz ar Mg satura pieaugumu.



3.13. att. Ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas FT-IS spektri

Attiecīgās ar Mg modificēta ap-TCP un β-TCP molekulārās struktūras analīzē detektētās absorbcijas joslas apkopotas 3.6. tabulā.

3.6. tabula

Ar Mg modificēta ap-TCP pirms un pēc augsttemperatūras apstrādes (1100 ºC, 1 h) FT-IS spektros detektētie absorbcijas joslu maksimumi un to atšifrējumi

Saišu svārstības	**Viļņu skaitlis, cm^{-1}**	
	Ar Mg modificēts ap-TCP	**Ar Mg modificēts β-TCP**
$[PO_4]$ ν_2	475	436
$[PO_4]$ ν_4	575	554
$[PO_4]$ ν_4	603	593; 603
$[PO_4]$ ν_1	-	876
$[PO_4]$ ν_3	950-1200	940; 967; 1139; 1120
[OH]	3569; 632	-
$[HPO_4]$	875	-
$[CO_3]$ (no KBr)	1383	1383
Adsorbētais H_2O	2800–3600	-

3.2.2.2. Ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas mikrostruktūra

1) <u>Blīvu ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas pamatņu raksturojums</u>

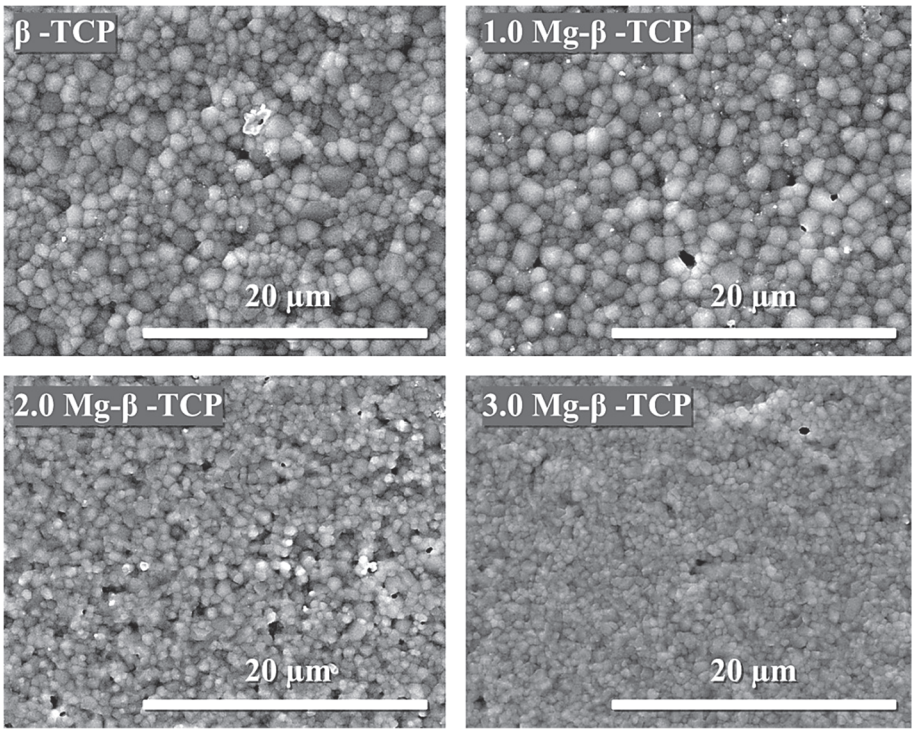
Saskaņā ar Arhimēda metodes mērījumu rezultātiem, kas apkopoti 3.7. tabulā, palielinoties Mg saturam, pazeminās ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas pamatņu P_K un, attiecīgi, pieaug $\rho_{šķ}$ vērtības. Ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas pamatņu sēriju sarukuma vērtības pēc augsttemperatūras apstrādes (1100 ºC, 1 h) kļūdu robežās neatšķiras. P_K pazemināšanās saistīta ar prekursora daļiņu efektīvāku sablīvēšanos, kas raksturīgi ar Mg modificētiem CaP [208]. Saskaņā ar Mg modificēto ap-TCP pulveru SSA_{BET} mērījumu rezultātiem, Mg satura pieaugums izraisa d_{BET} pazemināšanos (skat. 3.1.2. apakšnodaļu). Līdz ar to augsttemperatūras apstrādes laikā palielinās kontaktvirsma starp pulvera daļiņām, respektīvi, materiāla sastāvā esošie joni difundē pa kontaktvirsmām, veicinot daļiņu sablīvēšanos [215].

3.7. tabula

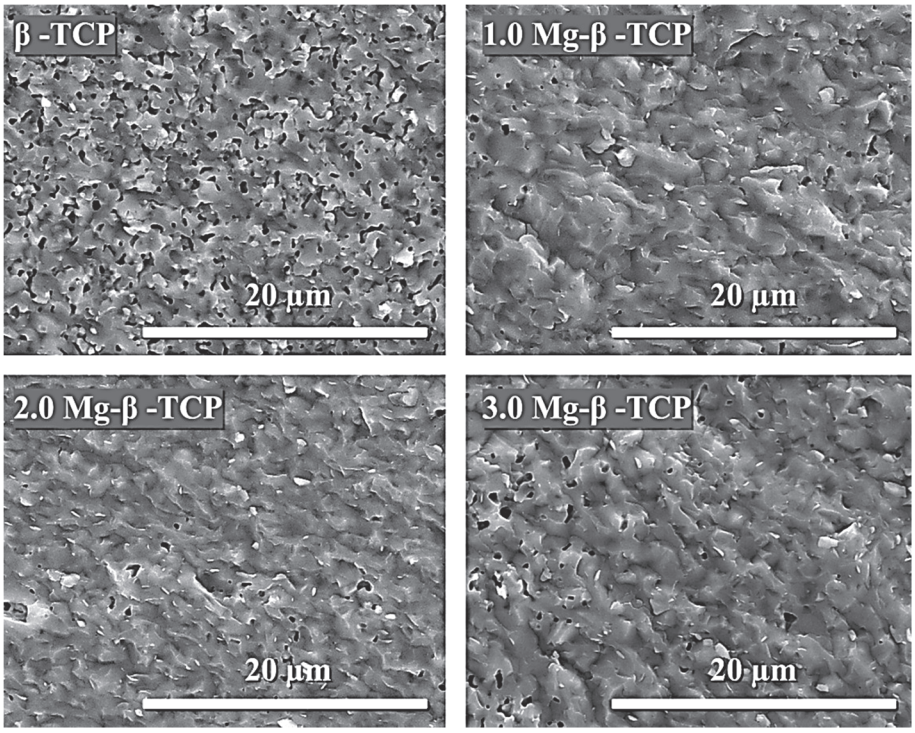
Blīvu ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas pamatņu S_V, $\rho_{šķ}$ un P_K

Parauga apzīmējums	S_V, %	$\rho_{šķ}$, g/cm^3	P_K, %
β-TCP	50 ± 3	2,71 ± 0,02	14,36 ± 2,20
1.0 Mg-β-TCP	50 ± 1	2,86 ± 0,04	9,47 ± 1,57
2.0 Mg-β-TCP	52 ± 2	2,93 ± 0,06	7,14 ± 1,20
3.0 Mg-β-TCP	50 ± 2	2,94 ± 0,07	6,92 ± 0,68

Arhimēda metodes rezultāti korelē ar biokeramikas pamatņu virsmas (skat. 3.14. att.) un lūzuma vietas (skat. 3.15. att.) LE-SEM mikrofotogrāfijās novēroto mikroporainības pazemināšanos, norādot uz Mg pozitīvo ietekmi uz β-TCP biokeramikas saķepšanas procesiem, kā aprakstīts 3.1.3. apakšnodaļā. Tādējādi Mg satura pieaugums līdz (0,67 ± 0,08) % (masas) veicina homogēnas mikrostruktūras β-TCP biokeramikas formēšanos. Turklāt, ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas pamatņu LE-SEM virsmas mikrofotogrāfijas (skat. 3.14. att.) liecina, ka Mg satura pieaugums ievērojami kavē β-TCP biokeramikas graudu augšanu un veicina graudu vidējo izmēru pazemināšanos no (1,4 ± 0,5) μm (β-TCP biokeramika) līdz (0,5 ± 0,1) μm (3.0 Mg-β-TCP biokeramika).



3.14. att. Ar Mg modificētas β-TCP biokeramikas virsmas LE-SEM mikrofotogrāfijas



3.15. att. Ar Mg modificētas β-TCP biokeramikas lūzuma vietas LE-SEM mikrofotogrāfijas

2) <u>Porainu ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas pamatņu raksturojums</u>

Porainas ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas mikrostruktūras raksturošanai noteiktās poraino pamatņu S_V, P_K un P_A pēc augsttemperatūras apstrādes (1150 °C, 2 h) kvantitatīvās vērtības apkopotas 3.8.tabulā.

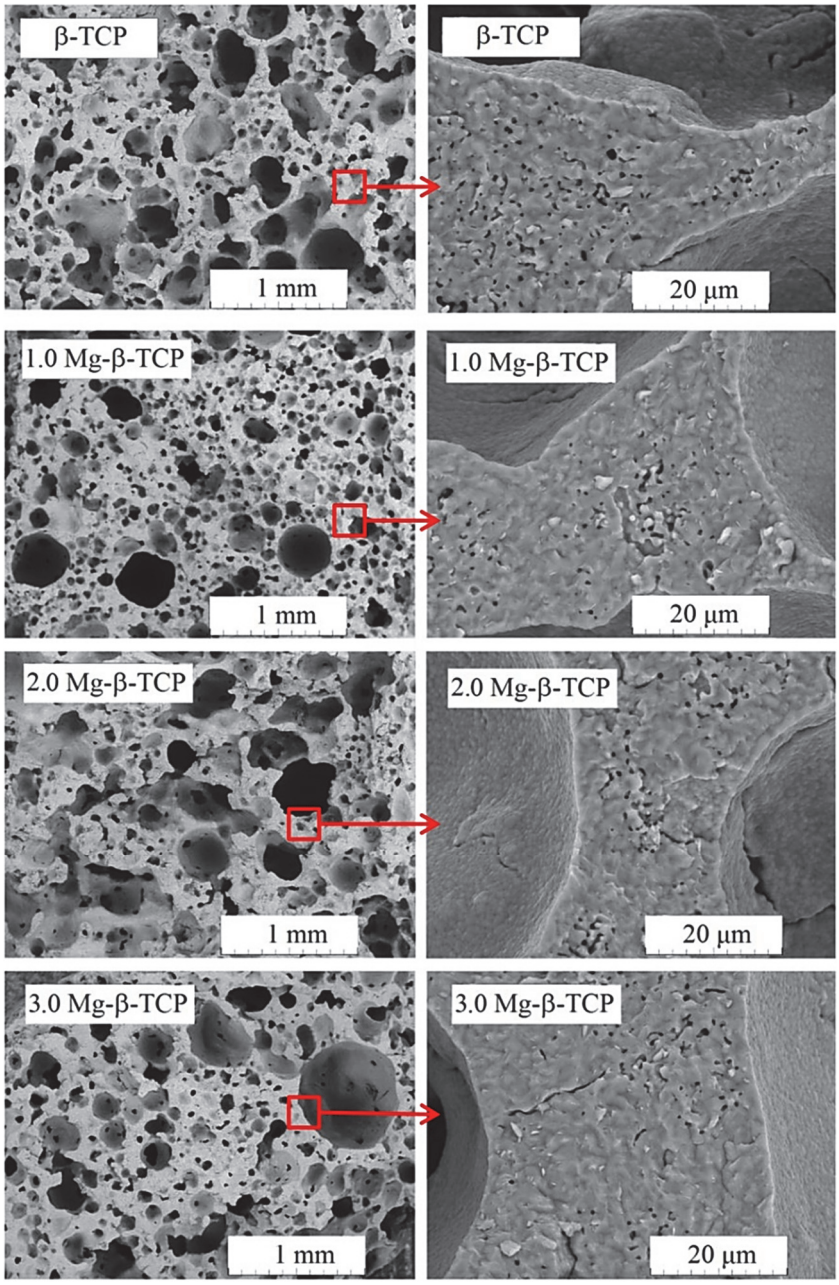
3.8. tabula

Porainu ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas pamatņu S_V, P_K un P_A

Parauga apzīmējums	S_V, %	P_K, %	P_A, %
β-TCP	35 ± 5	57,29 ± 1,66	44,46 ± 2,64
1.0 Mg-β-TCP	30 ± 5	54,53 ± 3,35	38,76 ± 3,79
2.0 Mg-β-TCP	31 ± 1	52,13 ± 2,02	35,25 ± 1,11
3.0 Mg-β-TCP	31 ± 1	52,67 ± 2,43	30,89 ± 2,85

Līdz ar Mg satura pieaugumu porainas β-TCP biokeramikas sarukums pēc augsttemperatūras apstrādes samazinās. Izvērtējot Arhimēda metodes rezultātus, secināms, ka, palielinoties Mg saturam, pazeminās biokeramikas pamatņu P_K un P_A vērtības, kas saistāms ar iepriekš aprakstīto ap-TCP pulveru d_{BET} pazemināšanos līdz ar Mg satura pieaugumu. Respektīvi, mazākas prekursoru pulveru daļiņas uzlabo saķepšanu un veicina blīvākas biokeramikas veidošanos.

Ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas pamatņu lūzuma vietas LE-SEM mikrofotogrāfijās (skat. 3.16. att.) redzams, ka, tāpat kā ar Mg modificēta HAp gadījumā, ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas pamatnes ir ar bimodālu poru izmēru sadalījumu. Vizuālie novērojumi liecina, ka porainas β-TCP biokeramikas pamatņu poru sieniņas jeb balsti kļūst blīvāki, palielinoties Mg saturam, respektīvi, biokeramikas mikroporainība pazeminās.



3.16. att. Porainas ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas lūzuma vietas LE-SEM mikrofotogrāfijas

LE-SEM mikrofotogrāfijas korelē ar Arhimēda metodes, kā arī Hg porozimetrijas rezultātiem, kas apkopoti 3.9. tabulā. Saskaņā ar Hg porozimetrijas rezultātiem, kas ļauj analizēt atvērto jeb caurejošo porainību, mērot poru savienojošo kanālu izmērus, porainas ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas caurejošo poru apjomu pamatā sastāda poras ar izmēriem robežās no 10 μm līdz 950 μm. Jāatzīmē, ka poras, kuru izmēri ir zem 0,01 μm vai pārsniedz 1000 μm ir ārpus Hg porozimetrijas detektēšanas robežas. Pieaugot Mg saturam, samazinās mikroporu daudzums porainas β-TCP biokeramikas sieniņās. HAp, 1.0 Mg-HAp un

2.0 Mg-HAp biokeramikas paraugos dominē poras ar izmēriem robežas no 10 μm līdz 100 μm, taču 3.0 Mg-β-TCP biokeramikas pamatņu gadījumā - robežās no 100 μm līdz 950 μm.

3.9. tabula

Porainu ar Mg-modificēta β-TCP biokeramikas pamatņu poru izmēru sadalījums

Parauga apzīmējums	**Poru daudzums, %**			
	0,01–1 μm	**1–10 μm**	**10–100 μm**	**100–950 μm**
β-TCP	2,03	3,92	62,33	31,71
1.0 Mg-β-TCP	2,00	3,50	78,75	15,75
2.0 Mg-β-TCP	1,90	4,78	82,37	11,15
3.0 Mg-β-TCP	1,57	0,94	44,98	52,50

Iegūtie ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas mikrostruktūras pētījumu rezultāti liecina, ka, izmantojot ar Mg modificētu ap-TCP pulveri kā izejvielu biokeramikas izstrādē, var uzlabot daļiņu saķepšanu, tādējādi izvairoties no pārmērīgas graudu augšanas, kas ļautu iegūt pilnībā blīvas un homogēnas mikrostruktūras poru sieniņas, kas, savukārt, uzlabotu ar Mg modificētas β-TCP biokeramikas mehānisko izturību.

3.2.3. Ar Mg modificētu BCP biokeramikas fizikālķīmisko īpašību raksturojums

3.2.3.1. Ar Mg modificētu BCP biokeramikas fāžu un molekulārais sastāvs

Ar Mg modificētu BCP biokeramikas paraugu RDA ainas (skat. 3.17., 3.18., 3.19. att.) apstiprina, ka ar Mg modificēta CDHAp prekursoru ar dažādu teorētisko (Ca + Mg)/P molāro attiecību augsttemperatūras apstrāde veicina divfāžu maisījuma, kas satur HAp un β-TCP fāzes dažādās attiecībās, veidošanos. Novērotais β-TCP fāzes pieaugums attiecībā pret HAp saturu ir tieši proporcionāls Ca-deficīta pakāpei prekursora pulveros [216].

1.0 Mg-BCP (80/20) un 2.0 Mg-BCP (80/20) (skat. 3.17. att.) biokeramikas paraugu gadījumā novērojama β-TCP raksturīgā maksimuma (0 2 10) nobīde augstāku 2θ virzienā, savukārt, 2.0 Mg-BCP (70/30) (skat. 3.18. att.) un 2.0 Mg-BCP (60/40) (skat. 3.19. att.) biokeramikas paraugu gadījumā - zemāku 2θ virzienā, kamēr HAp raksturīgo maksimumu novietojuma maiņa netiek detektēta. Novērojums ir pamatojams ar literatūrā atrodamo informāciju, kas apstiprina Mg vieglāku iekļaušanos β-TCP struktūrā salīdzinājumā ar HAp, izsaucot β-TCP kristālrežģu deformācijas. Saskaņā ar *Ruy et al.* hipotēzi β-TCP satur Ca atomu oktaedrālo pozīciju, kas ir mazāka izmēra kā Ca atomu pozīcija HAp struktūrā un tādējādi piemērotāka Mg atomu iekļaušanai ar mazāku atomu rādiusu nekā Ca [217]. Pie tam *Kim et al.*

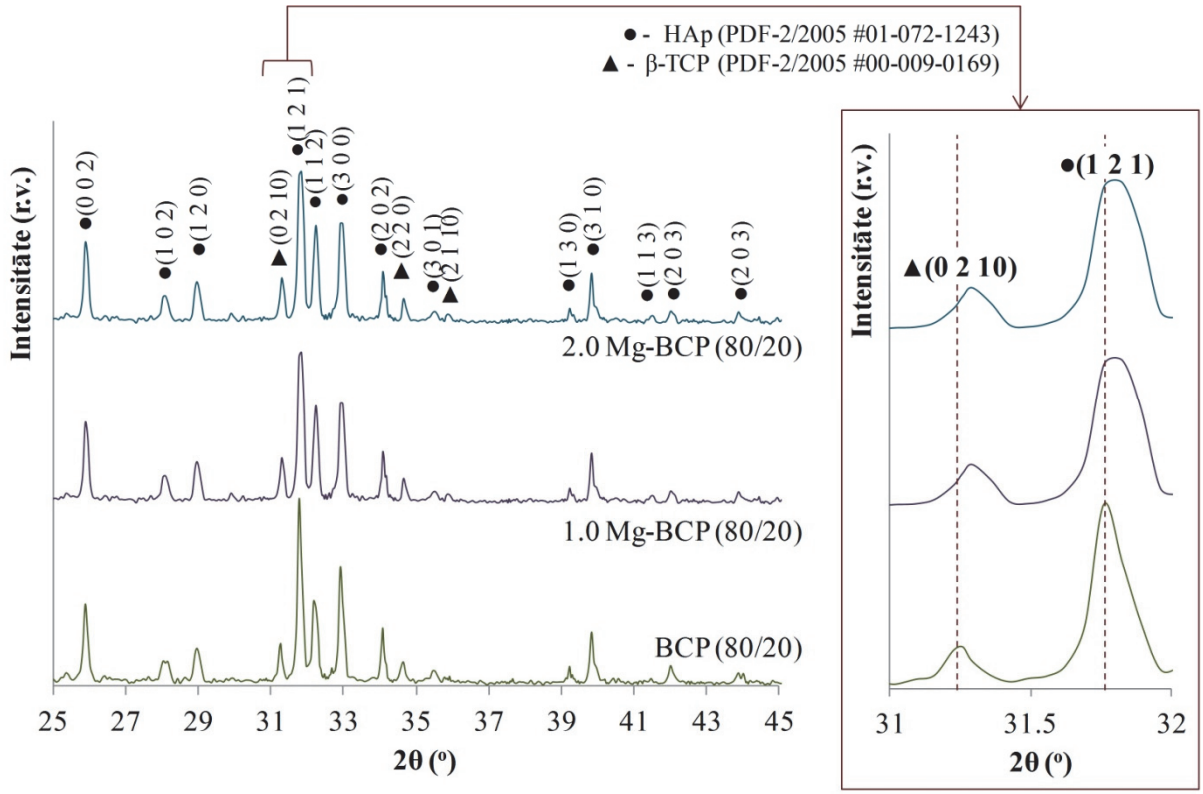
piedāvātais skaidrojums nosaka, ka, pateicoties [HPO_4] grupu klātbūtnei sintezētajos CDHAp pulveros, kas temperatūras ietekmē sadalās (CDHAp termiskā konversija), veidojot pirofosfātu grupas [P_2O_7], kas, savukārt, saskaņā ar vienādojumiem (3.1) un (3.2), ar CaO un MgO veido β-TCP fāzi [141]:

$$Ca_{10-x}(MgHPO_4)_x(PO_4)_{6-}x(OH)_{2-x} \rightarrow$$
$$Ca_{10-x}(Mg_2P_2O_7)_{x/2}(PO_4)_{6-}x(OH)_{2-x} + x/2\ H_2O \quad (3.1)$$

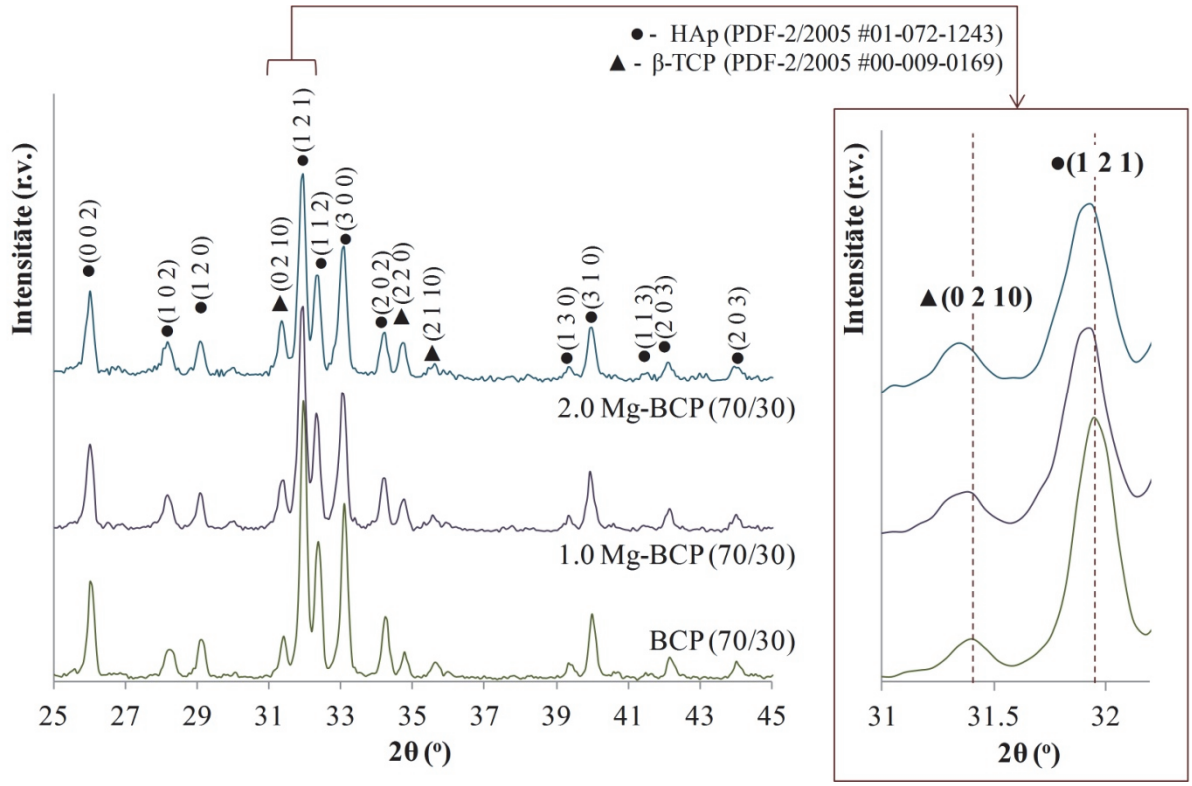
$$Ca_{10-x}(Mg_2P_2O_7)_{x/2}(PO_4)_{6-}x(OH)_{2-x} + x/2\ H_2O \rightarrow$$
$$(1-x)\ Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 3x\ (CaMg_{2x/9})_3(PO_4)_2 + x\ H_2O \quad (3.2)$$

Turklāt, raksturīgo RDA maksimumu paplašināšanas norāda, ka Mg iekļaujas CaP struktūrā, izsaucot komponenšu kristālrežga deformācijas, kas izpaužas kā kristāliskuma pakāpes pazemināšanās.

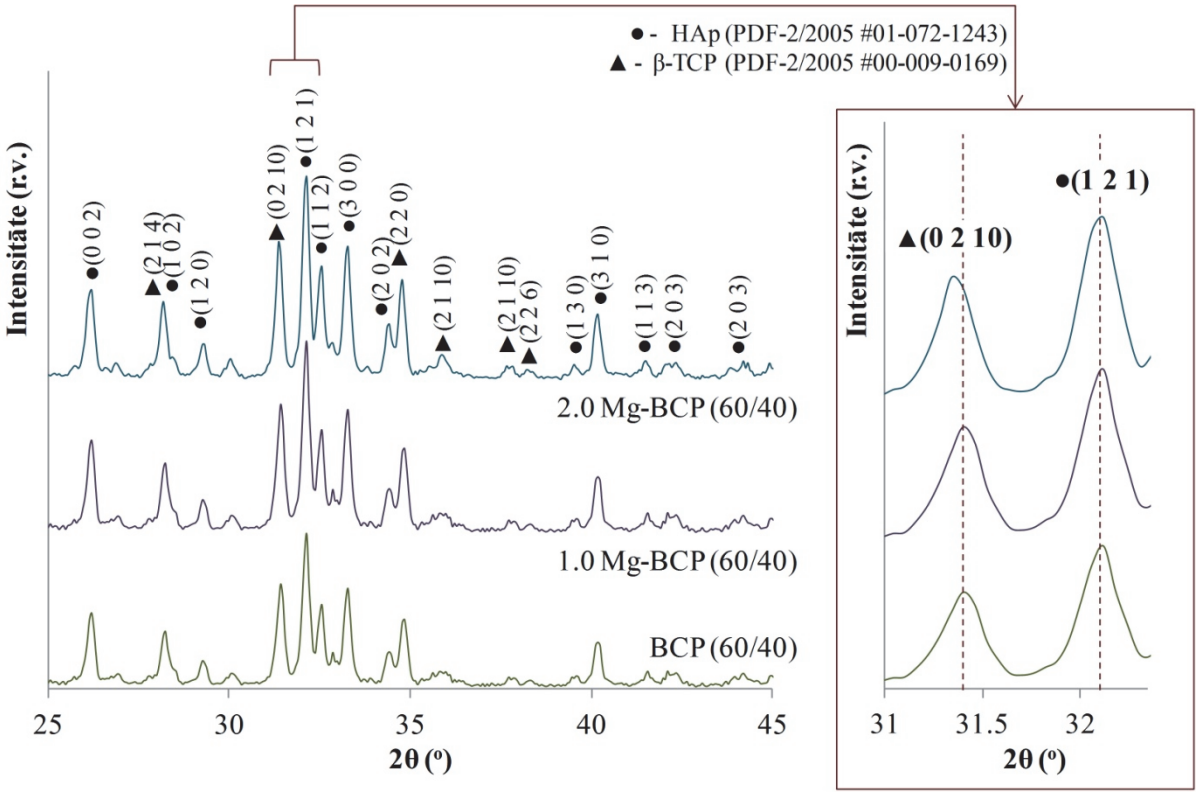
Jāatzīmē, ka, izmantojot RDA ainas, nevar kvantitatīvi analizēt Mg iekļaušanos BCP biokeramikas komponenšu kristāliskajā struktūrā.



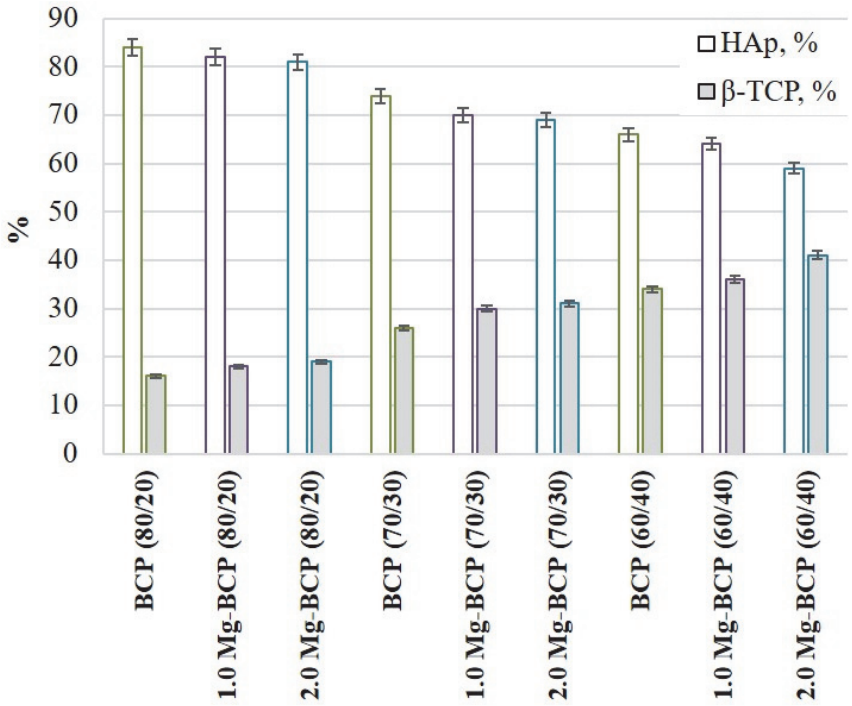
3.17. att. Ar Mg modificētu BCP (plānotā HAp/β-TCP fāžu attiecība 80/20) biokeramikas RDA ainas



3.18. att. Ar Mg modificētu BCP (plānotā HAp/β-TCP fāžu attiecība 70/30) biokeramikas RDA ainas

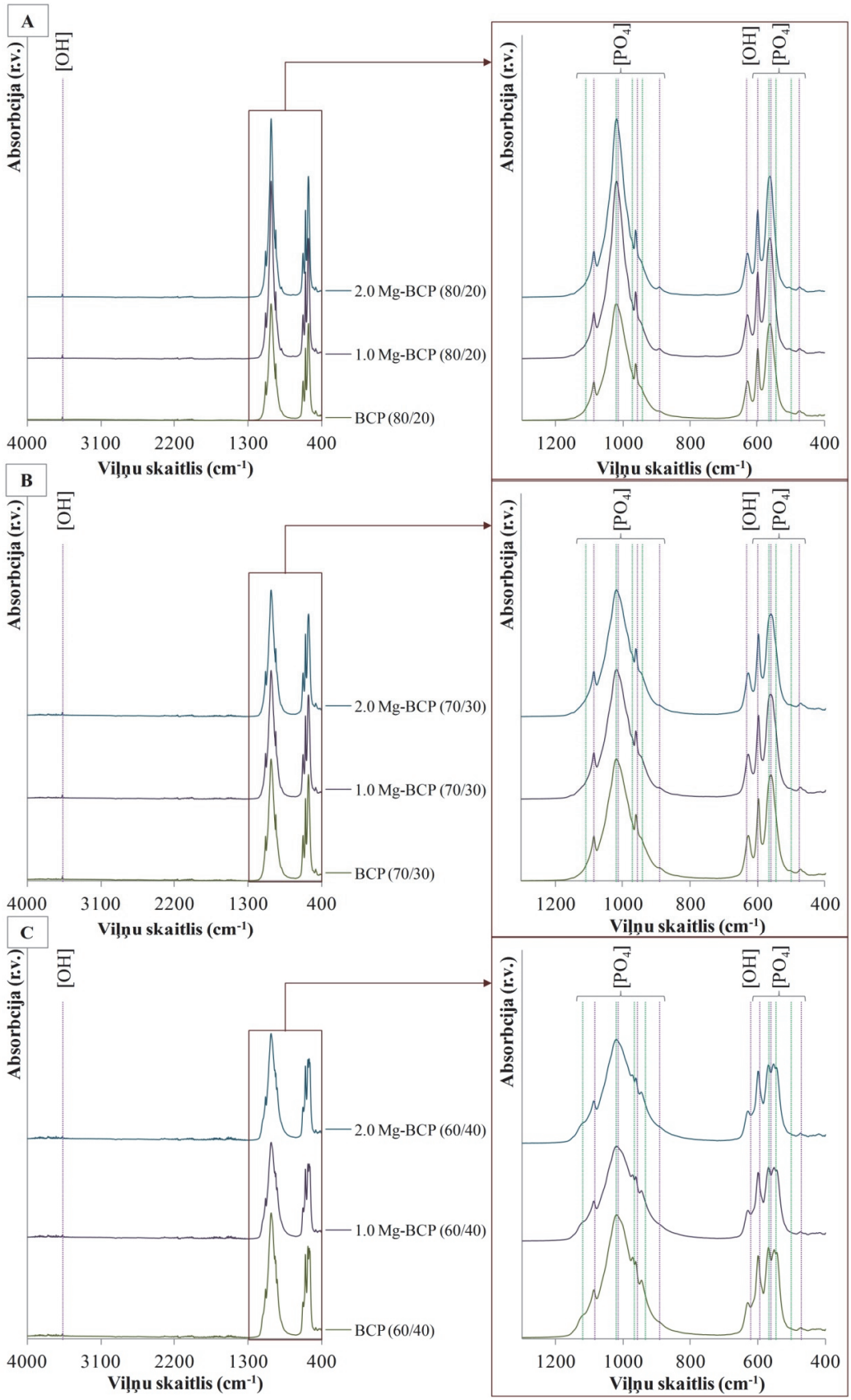


3.19. att. Ar Mg modificētu BCP (plānotā HAp/β-TCP fāžu attiecība 60/40) biokeramikas RDA ainas



3.20. att. Ar Mg modificētu BCP biokeramikas HAp un β-TCP procentuālais saturs

Mg satura pieaugums BCP biokeramikā izraisa relatīvi nelielu β-TCP fāzes raksturīgo RDA maksimumu intensitāšu pieaugumu, kas, saskaņā ar 3.20. attēlā atspoguļotajiem fāžu sastāva aprēķinu rezultātiem, liecina par β-TCP fāzes satura pieaugumu. Tas skaidrojams ar 3.2.1.1. apakšnodaļā aprakstīto Mg negatīvo ietekmi uz HAp termisko stabilitāti. Respektīvi, Mg destabilizē HAp fāzi, veicinot tās daļēju transformāciju uz β-TCP fāzi un sekmējot BCP veidošanos *in situ*. Turklāt, zinātniskās literatūras dati un DTA rezultāti (skat. 3.1.3. apakšnodaļu) liecina, ka Mg uzlabo β-TCP fāzes strukturālo stabilitāti [206]. *Gomes et al.* pētījumos konstatēts, ka Mg satura palielināšana no 0,13 % (masas) līdz 1,16 % (masas), BCP biokeramiskos pulveros, kas iegūti ar sola-gela metodi un sekojošu augsttemperatūras apstrādi no 500–1100 °C, veicina piemaisījumu, t. i., CaO, $CaCO_3$ un MgO veidošanos [218]. Darbā izstrādātajos paraugos minēto nevēlamo piemaisījumu klātbūtne, kas varētu negatīvi ietekmēt materiālu bioloģisko saderību, netiek detektēta. Tas pierāda izvēlētās sintēzes metodes efektivitāti ar Mg modificētu BCP biokeramikas izstrādei.



3.21. att. Ar Mg modificētu BCP biokeramikas FT-IS spektri (→ - HAp un → - β-TCP fāzei atbilstošo absorbcijas joslu maksimumi)

Ar Mg modificētu BCP biokeramikas paraugu FT-IS spektri parādīti 3.21.attēlā. Likumsakarīgi, ka līdz ar β-TCP satura pieaugumu novērojama [PO_4] grupu raksturīgo absorbcijas joslu maksimumu intervālā 550–600 cm^{-1} un 950–1150 cm^{-1} paplašināšanās un šķelšanās, kā arī [OH] grupu absorbcijas joslu maksimumu intensitāšu pazemināšanās. FT-IS spektros detektētie absorbcijas joslu maksimumi un to atšifrējumi apkopoti 3.10. tabulā. Mg satura pieaugums neizraisa BCP komponenšu molekulārās struktūras izmaiņas.

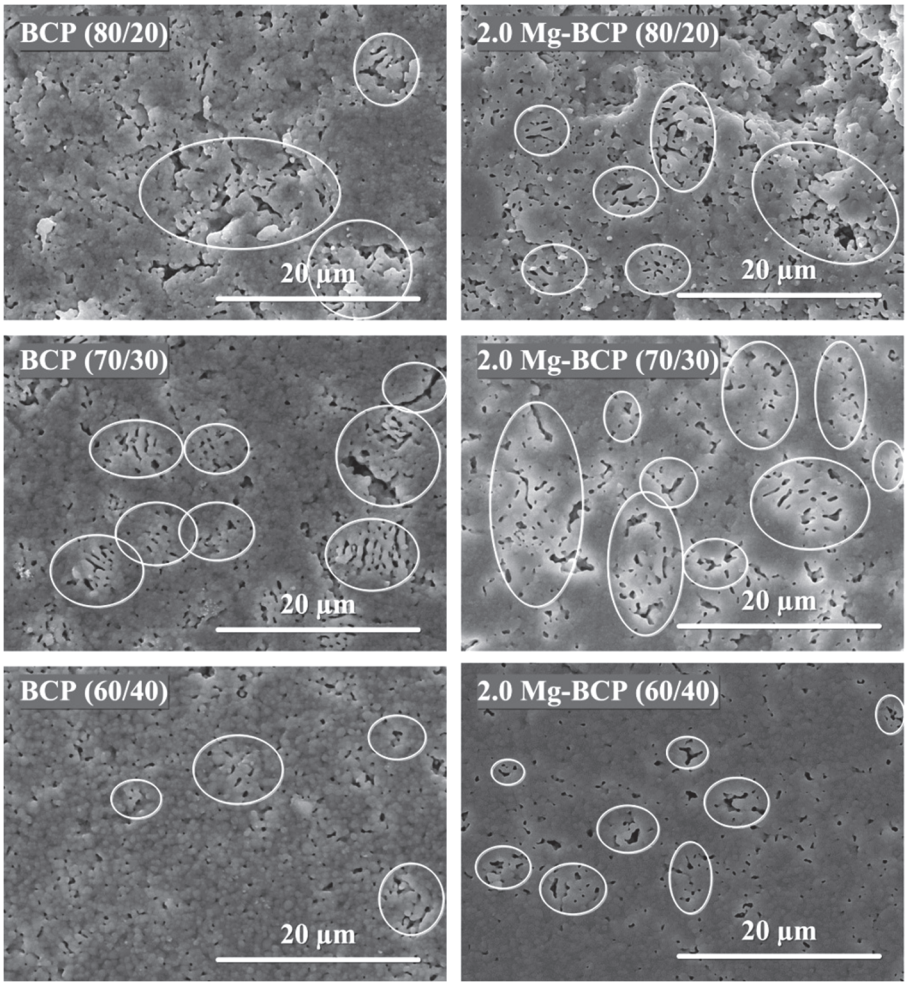
3.10. tabula

Ar Mg modificētu BCP FT-IS spektros detektētie absorbcijas joslu maksimumi un to atšifrējumi

Saišu svārstības	**[PO_4] ν_2**	**[PO_4] ν_4**	**[PO_4] ν_4**	**[PO_4] ν_3**	**[PO_4] ν_3**	**[OH]**
Viļņu skaitlis, cm^{-1}	472	551 598	544 562	963 1018 1084	945 972 1126	623 3571
Atbilstošā fāze	HAp	HAp	β-TCP	HAp	β-TCP	HAp

3.2.3.2. Ar Mg modificētu BCP biokeramikas mikrostruktūra

Blīvu ar Mg modificētu BCP biokeramikas pamatņu virsmas mikrostruktūra attēlota 3.22.attēlā LE-SEM mikrofotogrāfijās. Izvērtējot LE-SEM mikrofotogrāfijas, konstatēts, ka visām ar Mg modificētu BCP biokeramikas pamatnēm raksturīga neviendabīga vai heterogēna, mikroporaina struktūra. Vizuāli novērojams, ka mikroporainība samazinās līdz ar β-TCP fāzes satura pieaugumu, kas sakrīt ar 3.2.1.2. un 3.2.2.2. apkašnodaļās aprakstītajiem HAp un β-TCP biokeramikas mikrostruktūras pētījumu rezultātiem, respektīvi, β-TCP graudu sablīvēšanās notiek efektīvāk kā HAp graudu sablīvēšanās. BCP biokeramikas virsmas LE-SEM mikrofotogrāfijās izšķirami atsevišķi intensīvi sablīvēti apgabali, kas raksturojas ar smalkiem heterogēna izmēra graudiem, un nepilnīgi sablīvētu, heterogēnas formas un izmēra graudu mikrostruktūra. Mikrostruktūras nehomogenitātes cēlonis meklējams biokeramikas prekursoru pulveru sagatavošanas posmā, respektīvi, nepilnīgi saķepušie apgabali ir nepietiekami sasmalcināto agregātu saķepšanas sekas. Teorētiski atšķirīgās mikrostruktūras var atspoguļoties *in vitro* pētījumu rezultātos. Tomēr, veicot Arhimēda metodes mērījumus, tika noskaidrots, ka visu paraugu sēriju kopējā porainība ir ~20 %.



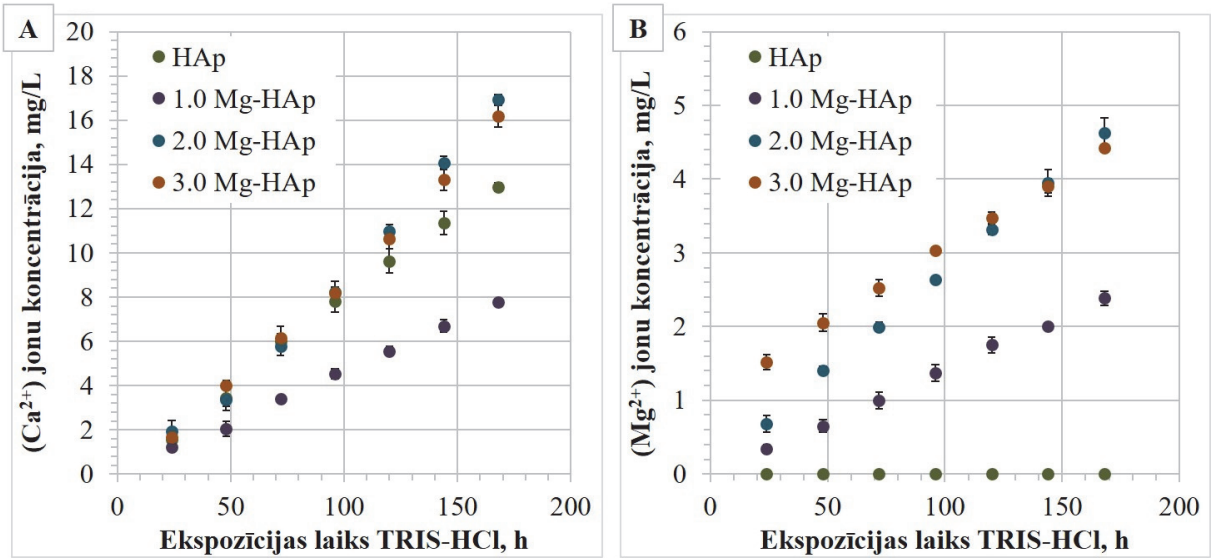
3.22. att. Ar Mg modificētu BCP biokeramikas virsmas LE-SEM mikrofotogrāfijas

3.3. Biokeramikas *in vitro* pārbaudes

3.3.1. Šķīdība

Ar Mg modificētu CaP biokeramikas bioloģiskās īpašības ir atkarīgas ne tikai no Mg satura eksperimentālajos paraugos, bet arī no šķīdības, proti, biokeramikas spējas atbrīvot (Ca^{2+}) un (Mg^{2+}) jonus. Ar Mg modificēta HAp un β-TCP biokeramikas šķīdības pētījumi tika veikti, izturot eksperimentālos paraugus TRIS-HCl buferšķīdumā un ik pēc 24 h mērot izdalīto jonu koncentrācijas, kā aprakstīts 2.4.1. apakšnodaļā. Eksperimentālie rezultāti galvenokārt prezentē sākotnējas biokeramikas šķīšanas tendences *in vivo*, nevis precīzas izdalīto jonu koncentrācijas. Pētījums atspoguļo viedokli par to, ka implantmateriāla šķīšana *in vivo* nenotiek konstantā šķīduma tilpumā, bet izdalītie joni tiek transportēti prom no implantēšanas vietas ar ķermeņa šķidrumu plūsmu [194].

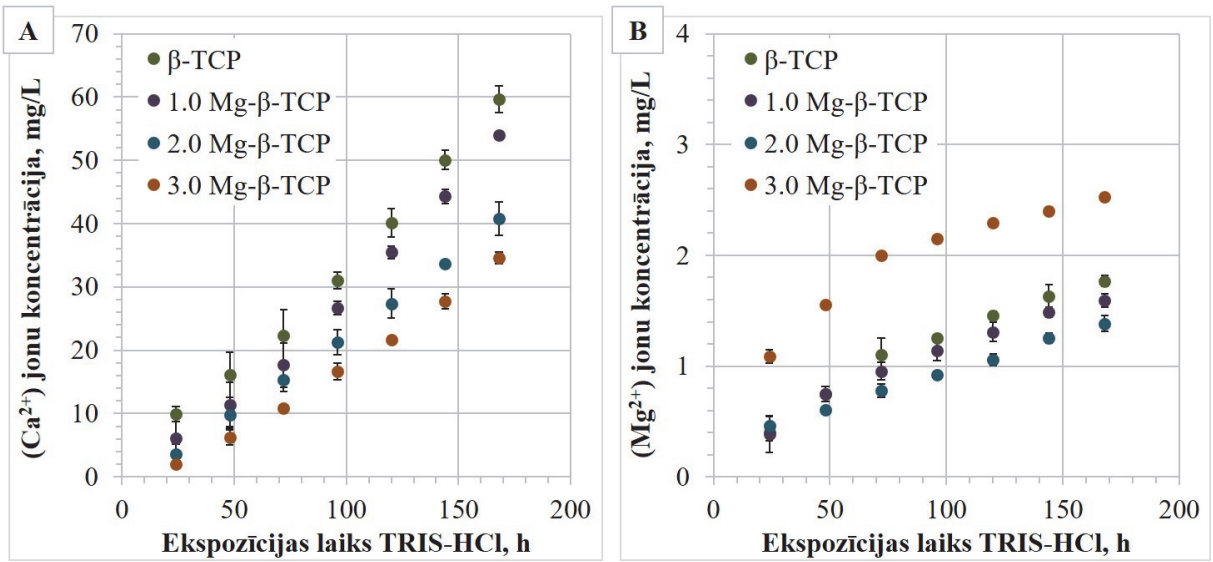
Ar Mg modificēta HAp biokeramikas šķīdības pētījumos, kas grafiski parādīti 3.23. attēlā, augstākās (Ca^{2+}) jonu koncentrācijas detektētas eksperimentālajos šķīdumos pēc 2.0 Mg-HAp un 3.0 Mg-HAp biokeramikas paraugu izturēšanas (skat. 3.23. att. (A)), kas liecina par šo paraugu labāku šķīdību fizioloģiskajos apstākļos salīdzinājumā ar nemodificētu HAp biokeramiku. Nemodificēta HAp biokeramikas gadījumā netika detektēta (Mg^{2+}) jonu izdalīšanās. Likumsakarīgi, ka līdz ar Mg satura pieaugumu biokeramikā palielinās (Mg^{2+}) jonu koncentrācija eksperimentālajos šķīdumos pēc HAp biokeramikas paraugu izturēšanas (skat. 3.23. att. (B)). Turklāt, gan (Ca^{2+}), gan (Mg^{2+}) jonu izdalīšanās no HAp biokeramikas aprakstāma ar lineāru sakarību. Atspoguļotie rezultāti ļauj secināt, ka modificēšana ar Mg uzlabo HAp fāzes šķīdību, t. i., sekmē gan (Ca^{2+}), gan (Mg^{2+}) jonu izdalīšanos.



3.23. att. A – (Ca^{2+}) jonu un B – (Mg^{2+}) jonu izdalīšanās no ar Mg modificēta HAp biokeramikas

Ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas paraugu šķīdības pētījumos, kas parādīti 3.24. attēlā, noskaidrots, ka (Ca^{2+}) un (Mg^{2+}) jonu izdalīšanās ir savstarpēji atkarīgas. Gan (Ca^{2+}), gan (Mg^{2+}) jonu izdalīšanās no β-TCP biokeramikas samazinās, pieaugot Mg saturam līdz (0,56 ± 0,08) % (masas). Tas liecina par to, ka modificēšana ar Mg stabilizē β-TCP fāzi, respektīvi, pazemina biokeramikas šķīdību. Saskaņā ar vairākumu literatūras datu, Mg iekļaušana struktūrā izsauc β-TCP kristāliskuma pakāpes pazemināšanos un uzlabo biorezorbciju organismā [139]. Eksperimentāli iegūtie rezultāti ir pretrunā ar šo informāciju un, tāpat kā *Tardei et al.* pētījumā, novērots, ka līdz ar Mg satura pieaugumu β-TCP šķīdība pazeminās [219]. Zemākas izdalīto jonu koncentrācijas no ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas varētu būt attiecināmas uz attiecīgo pamatņu mikrostruktūras iezīmēm.

Kā aprakstīts 3.2.2.2. apakšnodaļā, līdz ar Mg satura pieaugumu β-TCP biokeramikā ievērojami samazinās pamatņu kopējā porainība. Jo blīvāka biokeramika, jo mazāks ir biokeramikas pamatņu efektīvās virsmas laukums. Līdz ar to ar Mg modificēta β-TCP biokeramika ar zemāku efektīvās virsmas laukumu tiek mazāk pakļauta buferšķīduma iedarbībai, kas rezultātā nomāc jonu izdalīšanos. Savukārt visstraujākā (Mg^{2+}) jonu izdalīšanās novērojama paraugiem ar augstāko Mg saturu, respektīvi, (0,67 ± 0,08) % (masas). Zinot, ka Ca atomu aizvietošana ar Mg atomiem CaP struktūrā ir ierobežota dēļ attiecīgo atomu rādiusu starpības, var spriest, ka sasniedzot (0,67 ± 0,08) % (masas) Mg neieņem stabilu pozīciju β-TCP struktūrā un, līdz ar to, (Mg^{2+}) joni var tikt salīdzinoši vieglāk atbrīvoti.



3.24. att. A – (Ca^{2+}) jonu un B – (Mg^{2+}) jonu izdalīšanās no ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas

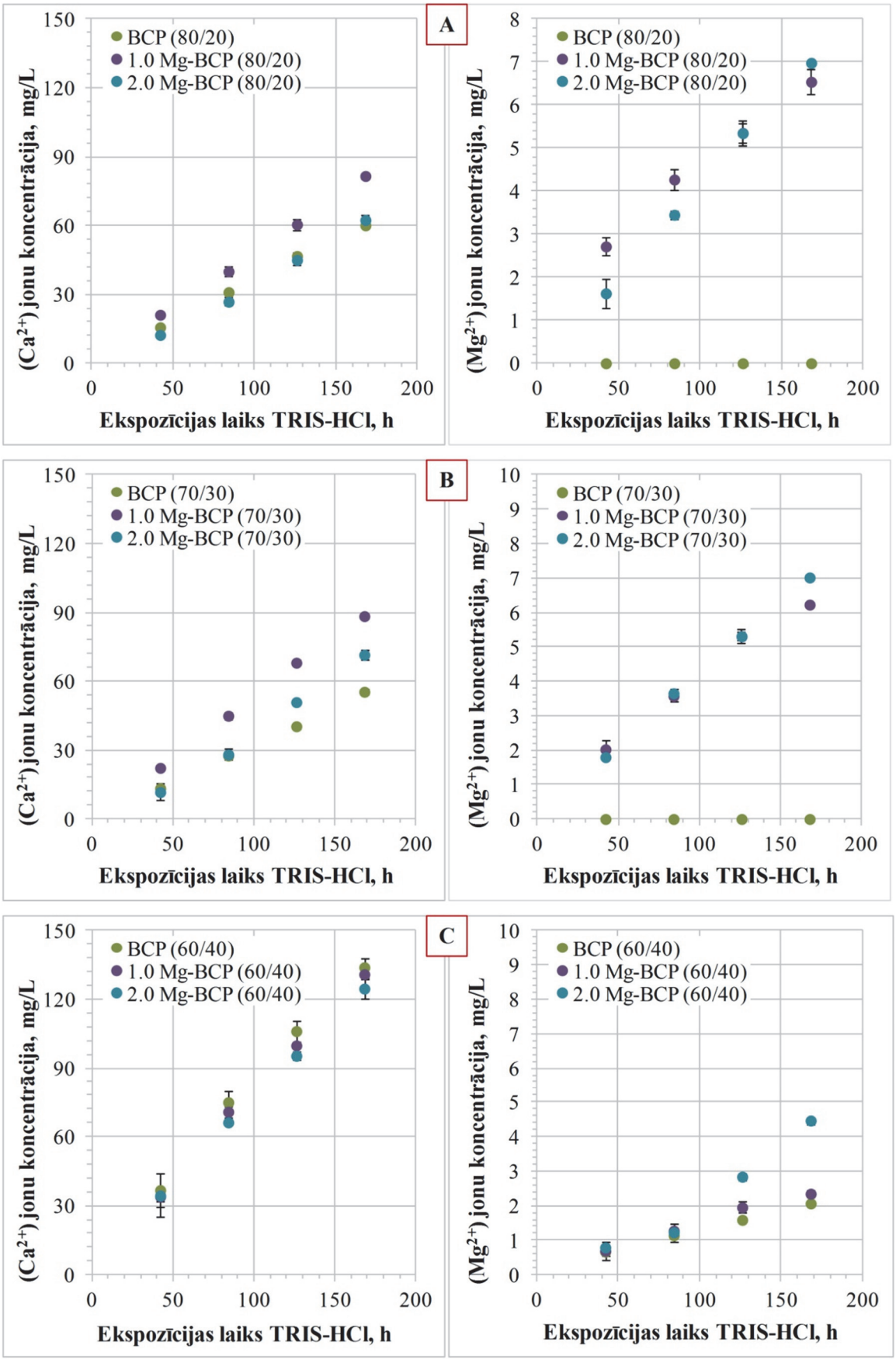
Interesanti, ka no ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas izdalītā (Mg^{2+}) jonu koncentrācija ir zemāka kā ar Mg modificēta HAp biokeramikas gadījumā, kamēr no ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas izdalīto (Ca^{2+}) jonu koncentrācija gandrīz trīs reizes pārsniedz no ar Mg modificēta HAp biokeramikas izdalīto. Tas, iespējams, saistīts ar to, ka β-TCP kristāliskajā struktūrā esošā oktaedrālā pozīcija ir piemērotāka mazāka izmēra, t. i., Mg, atomiem kā Ca [217]. Līdz ar to jonapmaiņas rezultātā, izdalītie (Mg^{2+}) joni var stāties β-TCP kristāliskajā struktūrā šķīšanas rezultātā radušajās, vakantajās Ca pozīcijās, tādējādi, pazeminot izdalīto (Mg^{2+}) jonu koncentrāciju eksperimentālajos šķīdumos. Turklāt izpētīts, ka bieži kopējā Mg saturs HAp paraugos ir ievērojami augstāks kā reālais HAp struktūrā iekļautais. Pārākumā esošais Mg, iespējams, atrodas amorfā fāzē, kuru grūti detektēt, un/vai uz HAp kristalītu virsmas [144, 145]. *Tampieri et al.* pierādīja, ka HAp kļūst pilnīgi amorfs, ja iekļautā

Mg koncentrācija sasniedz 35–50 % (molu) [220], bet citos pētījumos novērots, ka (Mg^{2+}) jonu koncentrācija ir ievērojami augstāka pie HAp kristalītu virsmas, kas varētu veicināt (Mg^{2+}) jonu izdalīšanos fizioloģiskajos šķīdumos [221, 222]. Pie tam *Bertinetti et al*. konstatēja, ka 2 mēnešu laikā notiek (Mg^{2+}) jonu migrācijas process no HAp kristalītu tilpuma uz virsmu, norādot, ka ar Mg modificēts HAp gaisā ir nestabils. Šajā pašā pētījumā pierādīts, ka HAp ar Mg saturu līdz 3 % (masas), absorbē uz virsmas vairāk ūdens gan uz katjoniem koordinētu H_2O molekulu, gan multislāņu formā. Lai gan uz HAp virsmas izveidojusies minerālā fāze nav viennozīmīgi identificēta, tomēr konstatētas līdzības ar MgP un/vai CaP hidrātiem [219].

Analizējot ar Mg modificētu BCP biokeramikas spēju atbrīvot (Ca^{2+}) un (Mg^{2+}) jonus, tika novērotas sekojošas tendences (skat. 3.25. att.):

1. Līdz ar β-TCP fāzes pieaugumu biokeramikas paraugos, palielinās laika vienībā izdalīto (Ca^{2+}) jonu koncentrācija. Šis novērojums sakrīt ar teoriju, kas nosaka, ka HAp fāze ir stabilāka kā β-TCP fāze, kas salīdzinoši labi šķīst fizioloģiskos apstākļos (pH 7,4), atbrīvojot (Ca^{2+}) un (PO_4^{3-}) jonus [75].
2. Biokeramikas, kur HAp/β-TCP fāžu attiecība 80/20 un 70/30 % (masas), atbrīvoto (Ca^{2+}) jonu koncentrācija palielinās līdz ar Mg satura pieaugumu. β-TCP saturam BCP biokeramikā sasniedzot 40 % (masas), novērojama pretēja tendence – izdalīto (Ca^{2+}) jonu koncentrācija nedaudz samazinās, pieaugot Mg saturam.
3. Nav detektēta (Mg^{2+}) jonu izdalīšanās no BCP (80/20) un BCP (70/30) biokeramikas paraugiem, t. i., no nemodificētu BCP biokeramikas paraugiem ar HAp/β-TCP fāžu attiecību 80/20 un 70/30 % (masas).
4. Eksperimentālajos šķīdumos izmērīto (Mg^{2+}) jonu koncentrācija pazeminās līdz ar β-TCP satura pieaugumu divfāžu sistēmā. Eksperimentālajos šķīdumos pēc BCP (60/40), 1.0 Mg-BCP (60/40) un 2.0 Mg-BCP (60/40) biokeramikas paraugu izturēšanas izmērīto (Mg^{2+}) jonu koncentrācija ir vidēji 2,5 reizes zemāka kā biokeramikas ar augstāku HAp un analogu Mg saturu gadījumā (izņemot 2. punktā atrunātos gadījumus).

Vispārinot, ar Mg modificēta BCP biokeramikas paraugu, kur HAp/β-TCP fāžu attiecību 80/20 % (masas) un 70/30 % (masas), šķīšanas process ir analogs ar Mg modificēta HAp biokeramikas paraugiem. Savukārt ar Mg modificēta BCP biokeramikas paraugiem ar HAp/β-TCP fāžu attiecību 60/40 % (masas) jonu izdalīšanās tendences atbilst tādām, kas novērotas arī ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas šķīdības testos.



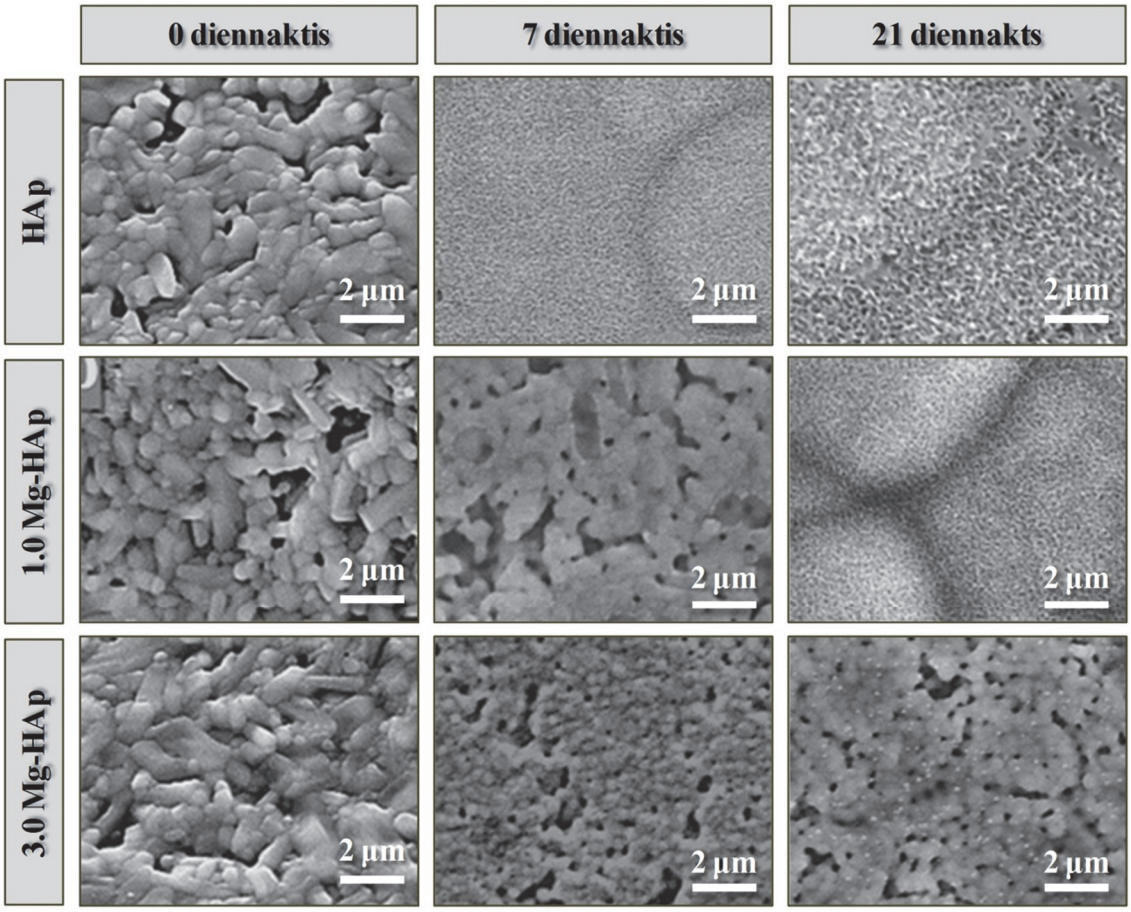
3.25. att. (Ca^{2+}) jonu un (Mg^{2+}) jonu izdalīšanās no ar Mg modificētu BCP biokeramikas

Šķīdības testu rezultāti ļauj secināt, ka ar Mg modificētu CaP biokeramikas gan (Ca^{2+}), gan (Mg^{2+}) jonu izdalīšanās kinētika mainās atkarībā no Mg satura paraugos.

3.3.2. *In vitro* bioaktivitāte simulētajā ķermeņa šķidrumā

In vitro bioaktivitātes pētījumi tika veikti ar mērķi noskaidrot, kā Mg saturs HAp un β-TCP ietekmē biomimētiska HAp slāņa formēšanos uz biokeramikas virsmas. Biomimētiska HAp slāņa formēšanās uz biokeramikas paraugiem, kas ievietoti SĶŠ, norāda uz to bioaktivitāti. CaP mineralizācija *in vitro* balstās uz to, ka SĶŠ nepārtraukti notiek biokeramikas šķīšana un nogulsnēšanās, un, rodoties pārsātinājumam, izgulsnējas biomimētiska HAp slānis [153]. Pētījumi veikti pēc 2.4.2. apakšnodaļā aprakstītās metodikas.

LE-SEM mikrofotogrāfijās (skat. 3.26. att.) redzams, ka pēc izturēšanas SĶŠ 7 diennaktis HAp, kas pagatavots bez papildus (Mg^{2+}) jonu avota pievienošanas izejas suspensijā, biokeramikas pamatņu virsmu klāj jauna materiāla slānis ar sferulītu, kas sastāv no plākšņveida kristalītiem, morfoloģiju.



3.26. att. Ar Mg modificēta HAp biokeramikas pamatņu virsmas LE-SEM mikrofotogrāfijas pirms un pēc ekspozīcijas SĶŠ 7 un 21 diennakti

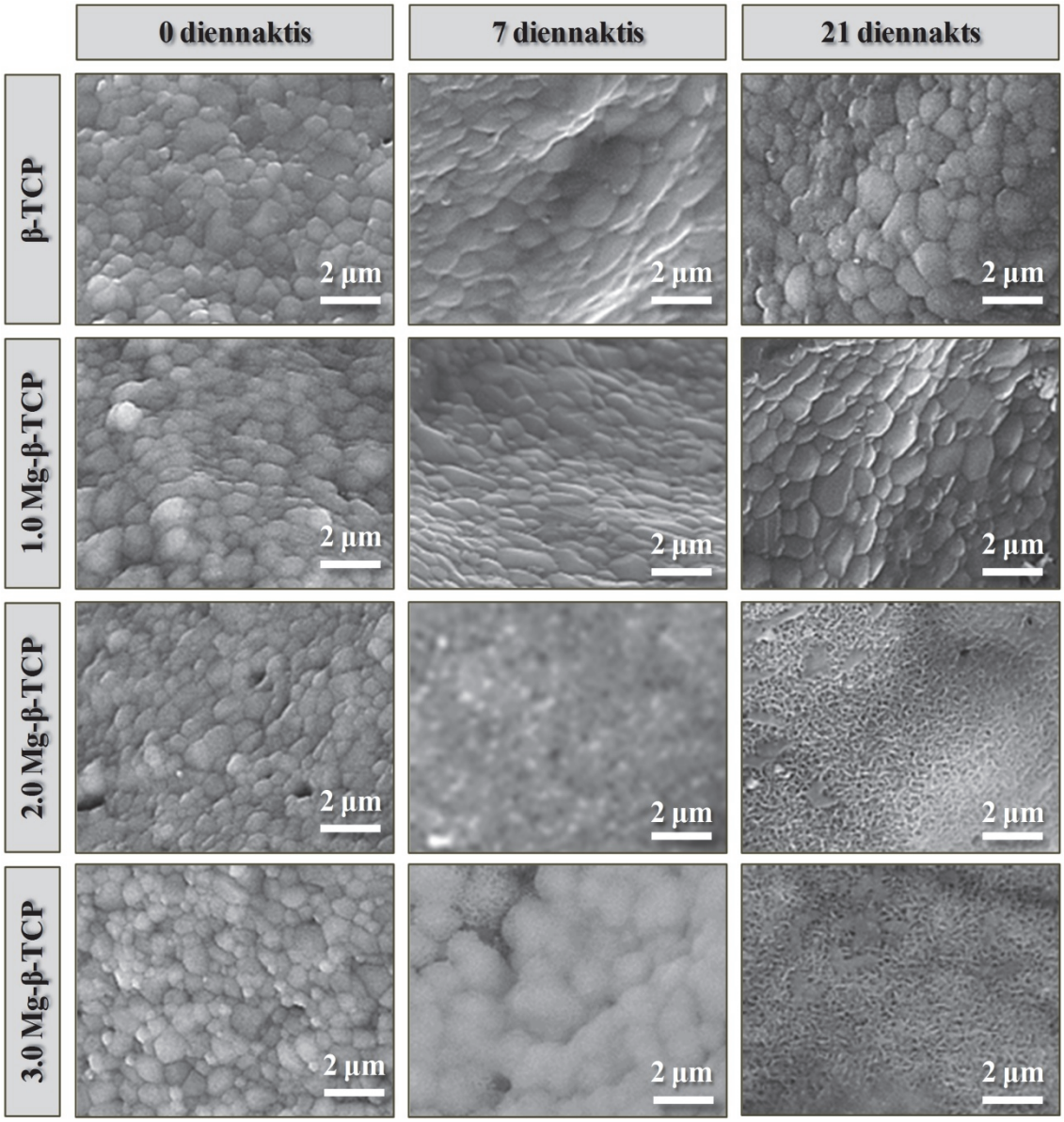
Uz pārējām ar Mg modificēta HAp biokeramikas pamatņu virsmām jaunā materiāla formēšanās norit ievērojami lēnāk, salīdzinot ar nemodificēta HAp. Pēc izturēšanas SĶŠ 21 diennakti uz HAp biokeramikas virsmas turpinājās jaunā materiāla slāņa augšana, respektīvi, ir novērojama izgulsnēto kristalītu augšana. Pēc 21 diennakts materiāla plākšņveida kristalītu izgulsnēšanās ir novērojama ne tikai uz HAp, bet arī uz 1.0 Mg-HAp biokeramikas pamatņu virsmas. Savukārt, uz 3.0 Mg-HAp pamatnēm nav redzami plākšņveida kristāli pat pēc izturēšanas SĶŠ 21 diennakts, tomēr konstatēts, ka virsmas mikrostruktūra vairs nav skaidri izšķirama, to klāj amorfs materiāla slānis. Līdz ar to var secināt, ka arī uz 3.0 Mg-HAp biokeramikas virsmas ir sākusies jauna materiāla slāņa formēšanās. Turklāt saskaņā ar kristalizācijas teoriju, ACP ir HAp prekursora fāze [1]. Ņemot vērā, eksperimentālo šķīdumu ķīmisko sastāvu, var pieņemt, ka izgulsnējies slānis ir CaP [169]. HAp fāze ir stabilākā no CaP pie pH, kas ir tuvs fizioloģiskai videi. Tādējādi, zinot eksperimentālo šķīdumu pH (7,40 ± 0,05) un SĶŠ ķīmisko sastāvu, var secināt, ka tiek veicināta biomimētiska HAp izgulsnēšanās uz biokeramikas virsmas [194, 195].

Līdz šim publicētie pētījumi liecina, ka Mg klātbūtne veicina biomimētiska HAp slāņa formēšanos uz HAp biokeramikas virsmas, izturot SĶŠ [141]. Tomēr pieļaujams, ka jauna materiāla slāņa izgulsnēšanos kavē (Ca^{2+}) un (Mg^{2+}) jonu izdalīšanās no HAp biokeramikas, kas norit aktīvāk paraugiem ar augstāku Mg saturu (skat. 3.23. att.).

Biomimētiska HAp slāņa formēšanās uz β-TCP biokeramikas mākslīgajā ķermeņa šķidrumā tiek veicināta līdz ar Mg satura pieaugumu biokeramikā (skat. 3.27. att.). Tas skaidrojams ar β-TCP biokeramikas zemāku šķīdību, t. i., lēnāku (Ca^{2+}) un (Mg^{2+}) jonu izdalīšanos, līdz ar Mg satura pieaugumu (skat. 3.24. att.).

Rezultāti liecina, ka tāpat kā (Ca^{2+}) un (Mg^{2+}) jonu izdalīšanās, arī biomimētiska HAp slāņa augšana uz SĶŠ ievietotas HAp un β-TCP biokeramikas ir atkarīga no Mg satura paraugos. Respektīvi, pētījumā sasniegtie rezultāti apliecina, ka jonu izdalīšanās ir tieši saistīta ar biomimētiska HAp slāņa augšanu uz biokeramikas virsmas jeb *in vitro* bioaktivitāti.

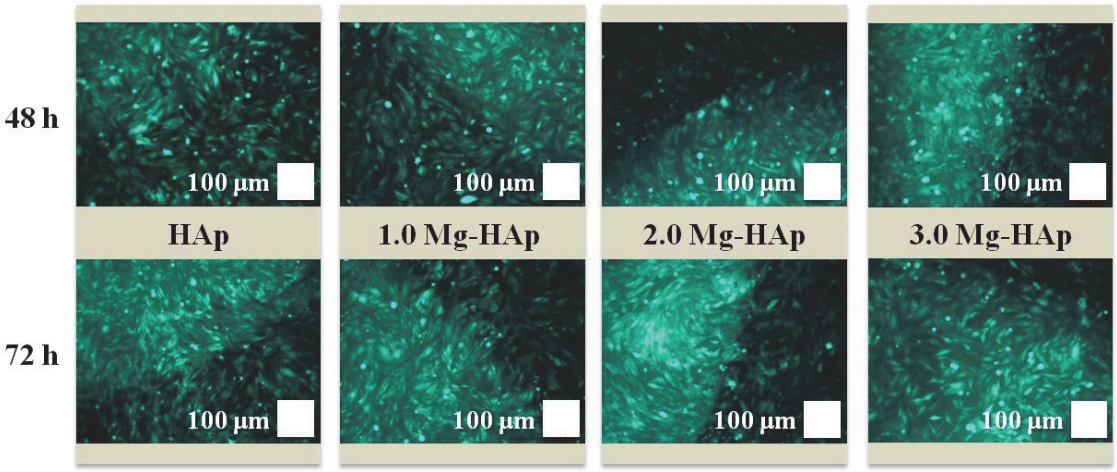
Ar Mg modificēta HAp biokeramikai novērota pazemināta, savukārt, ar Mg modificēta β-TCP biokeramikai – uzlabota biomimētiska HAp slāņa formēšanās uz virsmas līdz ar Mg satura pieaugumu, kas ir svarīgs parametrs, lai uzlabotu materiāla saistīšanos ar kaulu *in vivo*.



3.27. att. Ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas pamatņu virsmas LE-SEM mikrofotogrāfijas pirms un pēc ekspozīcijas SĶŠ 7 un 21 diennakti

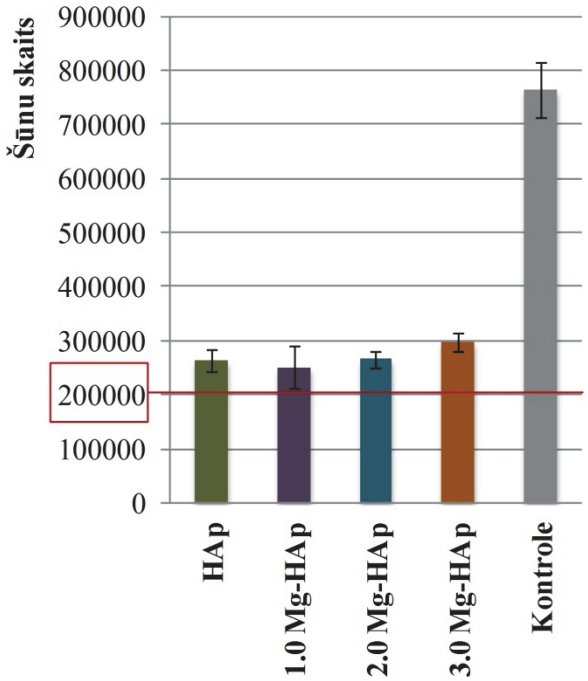
3.3.3. Citotoksicitāte

Ar Mg modificētu CaP biokeramikas citotoksicitāte analizēta kā aprakstīts 2.4.3. apkašnodaļā. Darbā izvērtēta ar Mg modificēta HAp un β-TCP biokeramikas ietekme uz osteoblastu *MG63-GFP* šūnu piesaistīšanos uz izstrādātā materiāla virsmas. Ar Mg modificēta HAp un β-TCP biokeramikas mijiedarbība ar osteoblastu *MG63-GFP* šūnām pēc 48 h un 72 h ilustratīvi parādīta, attiecīgi, 3.28. att un 3.30. att.



3.28. att. Fluorescentās mikroskopijas attēli osteoblastu proliferācijai pēc 48 h un 72 h ekspozīcijas uz ar Mg modificēta HAp biokeramikas

Ar Mg modificēta HAp biokeramikas gadījumā, neatkarīgi no Mg satura, novērota līdzīga osteoblastu MG63-GFP šūnu aktivitāte (skat. 3.29. att.).

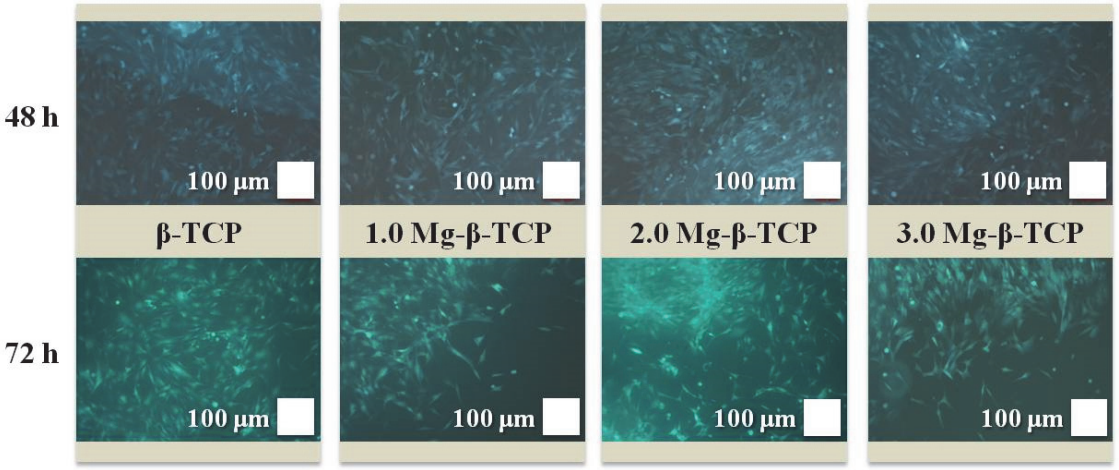


3.29. att. Dzīvo šūnu skaits pēc ar Mg modificēta HAp biokeramikas 72 h ekspozīcijas šūnu kultūrā

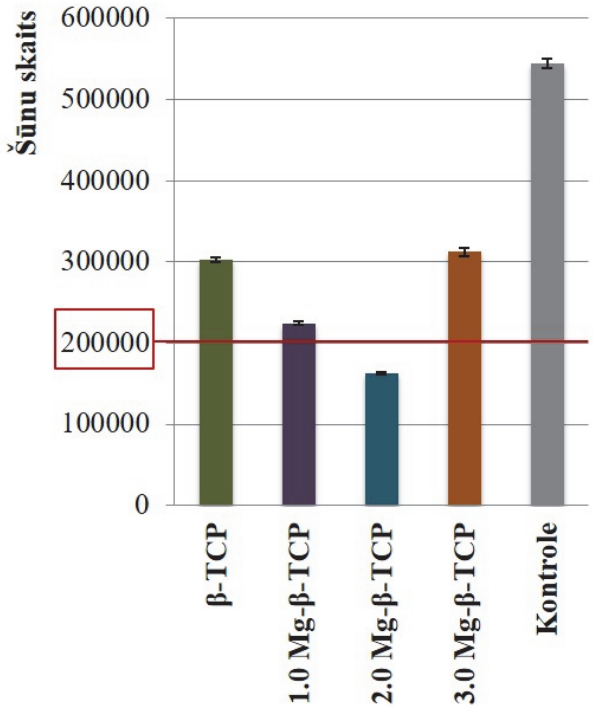
Konstatēs, ka kultivējot osteoblastu *MG63-GFP* šūnas 72 h, dzīvo šūnu skaits ir zemāks kā kontroles (šūnu kultūru plate bez parauga) gadījumā. Visās sērijās novērots šūnu skaita pieaugums, salīdzinot ar uzsēto šūnu skaitu, t. i., 200 000. Līdz ar to secināms, ka ar Mg

modificēta HAp biokeramika nav citotoksiska, proti, ir biosaderīga. Pozitīvi rezultāti ir iegūti arī citos pētījumos. *Landi et al.* pētot ar 5,7 % (molu) Mg modificētu HAp gan *in vitro*, gan *in vivo* pētījumos konstatēja, ka materiāls neuzrāda genotoksicitāti, kancerogenitāti vai toksicitāti. Netika uzrādīta arī *in vitro* citotoksicitāte un *in vivo* ādas kairinājums, jutīgums [121]. Citā pētījumā, kurā pētīta HAp bioloģisko īpašību maiņa, aizvietojot Ca ar Mg, tika sasniegta visaugstākā jonu izdalīšanās spēja, kā arī visaugstākā šūnu aktivitāte, t. sk. proliferācija, uz materiāla virsmas [170]. Savukārt, zinātnieku grupa *Ko et al.* izpētījusi, ka HAp ar Mg saturu līdz 2 % (molu) raksturīga ievērojami labāka osteoblastu adhēzija uz virsmas salīdzinājumā ar nemodificētu HAp, taču paaugstinot Mg saturu novērots pretējs efekts [174]. Autori ar Mg modificēto materiālu biokativitātes uzlabošanos saista salīdzinoši augstu izdalīto (Mg^{2+}) jonu koncentrāciju šūnu kultūru vidē. Iespējams, ka darbā iegūtie rezultāti skaidrojami ar analogu efektu, jo ar Mg modificēta HAp gadījumā tiek atbrīvots salīdzinoši augsta (Mg^{2+}) jonu koncentrācija (skat. 3.3.1. apakšnodaļu).

Ar Mg modificēta β-TCP biokeramika ir mēreni citotoksika (skat. 3.31. att.). β-TCP biokeramikas gadījumā novērojams osteoblastu *MG63-GFP* šūnu skaita pieaugums pēc 72 h ekspozīcijas, salīdzinot ar uzsēto šūnu skaitu, t. i., 200 000. Savukārt 1.0 Mg-β-TCP biokeramikas paraugu gadījumā pēc 72 h ekspozīcijas šūnu skaits ir aptuveni vienāds ar uzsēto šūnu skaitu. 2.0 Mg-β-TCP uzrādīja citotoksisku reakciju, t. i., tika novērots šūnu skaita samazinājums, salīdzinot ar uzsēto šūnu skaitu.



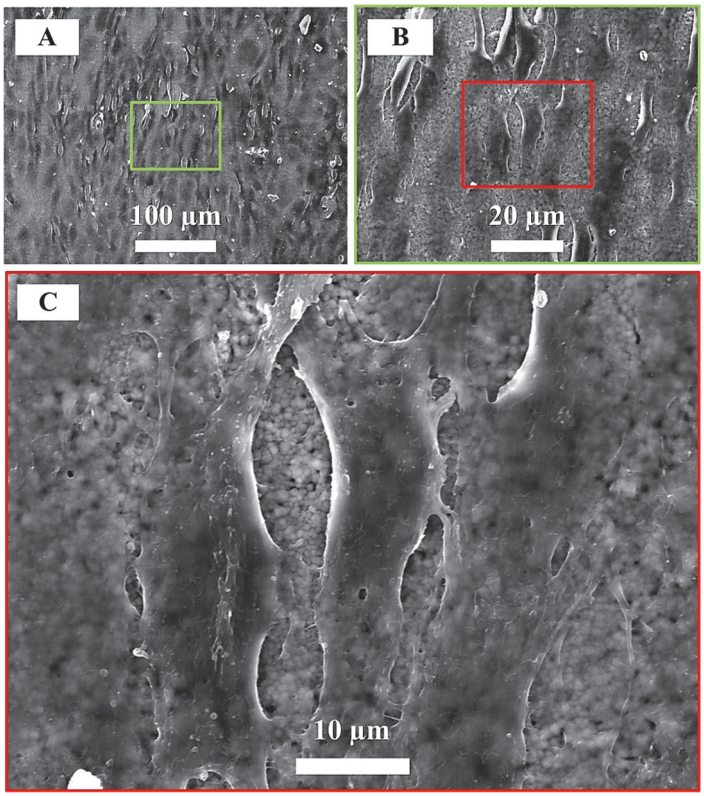
3.30. att. Fluorescentās mikroskopijas attēli osteoblastu proliferācijai pēc 48 h un 72 h ekspozīcijas uz ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas



3.31. att. Dzīvo šūnu skaits pēc ar Mg modificēta β-TCP biokeramikas 72 h ekspozīcijas šūnu kultūrā

Šķīdības pētījumos konstatēts, ka gan ar Mg modificēta HAp, gan β-TCP biokeramikas gadījumā eksperimentālajiem paraugiem ar augstāko Mg saturu pieaug izdalīto (Mg^{2+}) jonu koncentrācija. Ņemot vērā, ka HAp un β-TCP biokeramikas sērijās paraugi ar visaugstāko Mg saturu uzrāda visvairāk dzīvo šūnu pēc 72 h ekspozīcijas šūnu kultūrās, var secināt par (Mg^{2+}) jonu pozitīvo iedarbību uz osteoblastu *MG63-GFP* šūnu aktivitāti.

Svarīgs citosaderības novērtēšanas parametrs ir šūnu adhēzija jeb piesaistīšanās implantmateriāla virsmai. LE-SEM mikrofotogrāfijās (skat. 3.32. att.) novērojams, ka osteoblastu *MG63-GFP* šūnas ir piesaistījušās pie ar Mg modificēta CaP biokeramikas pamatņu virsmas, veidojot izstieptu trīsstūrveida morfoloģiju. Iegarenā forma veidojas, šūnām izstiepjot filopodijus jeb kājiņas, kas liecina par šūnu piesaistīšanos pie biokeramikas virsmas un augšanas procesu, apstiprinot, ka tiek nodrošināta šūnu aktivitātei labvēlīga mikrovide [170]. Ņemot vērā, ka šūnu-biokeramikas virsmas mijiedarbība neatkarīgi no attiecīgo pamatņu mikrostruktūras iezīmēm saglabājās gandrīz nemainīga visām nemodificētu un ar Mg modificētu CaP biokeramikas sērijām, var secināt, ka galvenais pētīto materiālu biosaderību ietekmējošais faktors ir jonu atbrīvošana jeb šķīdība šūnu kultūru vidē.

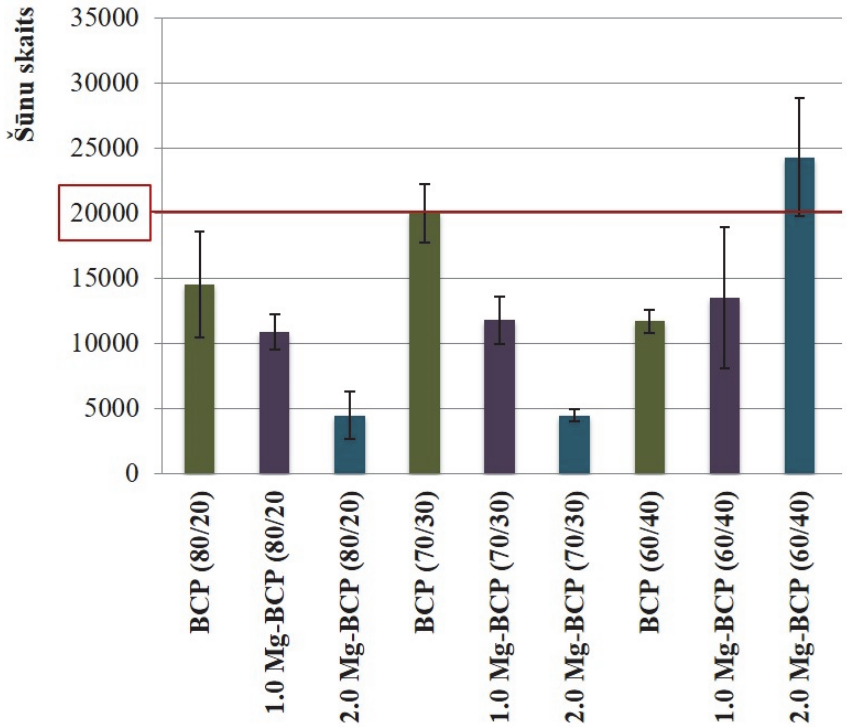


3.32. att. Osteoblastu *MG63-GFP* šūnu morfoloģija uz ar Mg modificētas β-TCP biokeramikas virsmas dažāda palielinājuma A – 500, B – 2000 un C – 5000 reizes LE-SEM mikrofotogrāfijās

Izvērtēta Mg satura un HAp/β-TCP fāžu attiecību kombināciju ietekme uz osteogēno cilmes šūnu *MC3T3-E1* bioloģisko aktivitāti mijiedarbībā ar ar Mg modificētu BCP biokeramiku. Ar Mg modificētu BCP biokeramikas pamatnes pēc 168 h ekspozīcijas osteogēno cilmes šūnu kultūrās uzrāda mērenu citotoksicitāti. Novērojams dzīvo šūnu skaita samazinājums salīdzinājumā ar uzsēto šūnu skaitu, t. i., 20 000. Pie augstāka HAp satura labāka šūnu dzīvotspēja novērojama BCP biokeramikas gadījumā, kas satur Mg zemākā koncentrācijā (skat. 3.33. att.). Savukārt, palielinoties β-TCP saturam līdz 40 % (masas), līdz ar Mg satura pieaugumu novērojama uzlabota šūnu aktivitāte, t. i., proliferācija.

Lai gan atspoguļotie rezultāti pierāda, ka Mg saturam ir būtiska ietekme uz CaP biokeramikas citosaderību. Tomēr jāatzīmē, ka pētījumos netika izslēgts biokeramikas pamatņu fiziskais kontakts ar šūnām, kas varētu ietekmēt sasniegtos rezultātus. Pilnīgākai (Mg^{2+}) jonu ietekmes izvērtēšanai uz šūnu aktivitāti, būtu jāveic papildus pētījumi, izmantojot puscaurlaidīgas membrānas, lai fiziski atdalītu šūnu kultūras no eksperimentālā parauga. Turklāt ar Mg modificētu BCP biokeramikas pamatnēm, kam šķīdības pētījumos izmērītas

augstākās izdalīto (Mg^{2+}) jonu koncentrācija TRIS-HCl buferšķīdumā, novērota vissliktākā šūnu atbildes reakcija, t. i., pazemināta dzīvotspēja, lai gan ar Mg modificēta HAp un β-TCP biokeramikas gadījumā novērota pretēja tendence. Viens no iespējamiem nesakritības iemesliem varētu būt dažādu šūnu līniju, proti, ar Mg modificēta HAp un β-TCP biokeramikas gadījumā - osteoblastu *MG63-GFP*, savukārt, ar Mg modificētu BCP biokeramikas – osteogēno cilmes šūnu *MC3T3-E1*, tipu izmantošana citotoksicitātes novērtēšanas testos. Attiecībā uz šo jautājumu, literatūrā atrodamā informācija liecina, ka biomateriāli ar augstu Mg saturu izsauc citotoksisku reakciju [223], kamēr citi autori apgalvo, ka augsta (Mg^{2+}) jonu koncentrācija šūnu kultūrā neizraisa programmētu šūnu, piemēram, osteosarkomas šūnu, nāvi [224]. Tāpat jāuzsver testos izmantoto šūnu kultūru barotņu ar nedaudz atšķirīgu neorganisko sāļu saturu (skat. 1.8. tabulu) loma, t. i., DMEM - HAp un β-TCP biokeramikas, un α-MEM - BCP biokeramikas pētījumos, kas, iespējams, varētu ietekmēt jonapmaiņas ((Mg^{2+}), (Ca^{2+}) , kā arī (PO_4^{3-}) jonu izdalīšanu/izgulsnēšanos) procesus starp materiālu un šūnu kultūru vidi [150]. Tādējādi, šūnu dzīvotspējas pazemināšanās iemesls var būt minētie faktori, kurus pilnībā saprast varētu, izvērtējot ar Mg modificētu CaP biokeramikas šķīdību dažādās šūnu kultūras vidēs, kas ir salīdzinoši dārgs process.



3.33. att. Dzīvo šūnu skaits pēc ar Mg modificētu BCP biokeramikas 168 h ekspozīcijas šūnu kultūrā

SECINĀJUMI

1. Sistemātisku pētījumu rezultātā pierādīts, ka, izmantojot ķīmiskās suspensijas nogulsnēšanas metodi, kas modificēta ar magnija avota, proti, magnija oksīda, pievienošanu sintēzes vidē, iespējams iegūt kalcija fosfātus ar reproducējamu un variējamu fāžu un ķīmisko sastāvu.
2. Sintezētā kalcija fosfātu produktu termiskā stabilitāte ir atkarīga no magnija satura produktos. Magnija satura pieaugums līdz (0,83 ± 0,19) % (masas) pazemina hidroksilapatīta termisko stabilitāti, sekmējot daļēju fāzes transformāciju uz β-trikalcija fosfātu. Salīdzinoši neliels magnija satura pieaugums robežās no (0,25 ± 0,03) % (masas) līdz (0,67 ± 0,08) % (masas) ievērojami paaugstina β-trikalcija fosfāta termisko stabilitāti, respektīvi, nemodificēts un ar magniju modificēts β-trikalcija fosfāts ir stabils attiecīgi līdz 1280 °C un 1350 °C. Likumsakarīgi, magnija satura pieaugums kalcija deficītā hidroksilapatīta prekursoru sastāvā sekmē β-trikalcija fosfāta fāzes satura palielināšanos divfāžu kalcija fosfātu biokeramikā.
3. Magnija satura pieaugums hidroksilapatīta, kalcija deficītā hidroksilapatīta un apatītiskā trikalcija fosfāta pulveros veicina īpatnējā virsmas laukuma pieaugumu par (9 ± 2) % un attiecīgi daļiņu vidējā izmēra pazeminā̄šanos, kas savukārt ietekmē saķepšanas procesus, t. i., daļiņu sablīvēšanos, un iegūtās biokeramikas mikrostruktūru pēc augsttemperatūras apstrādes. Konstatēts, ka magnija klātbūtne ievērojami kavē β-trikalcija fosfāta graudu augšanu un veicina graudu vidējo izmēru pazeminā̄šanos no (1,4 ± 0,5) μm (nemodificēta β-trikalcija fosfāta biokeramika) līdz (0,5 ± 0,1) μm (ar (0,67 ± 0,08) % (masas) Mg modificēta β-trikalcija fosfāta biokeramika).
4. *In vitro* bioaktivitāte jeb biomimētiska hidroksilapatīta slāņa nogulsnēšanās uz ar magniju modificētas hidroksilapatīta un β-trikalcija fosfāta biokeramikas virsmas simulētajā ķermeņa šķidrumā atkarīga no magnija satura biokeramikas paraugos. Hidroksilapatīta biokeramikas gadījumā magnija satura pieaugums kavē biomimētiska hidroksilapatīta slāņa nogulsnēšanos, kas saistīts ar magnija modifikācijas izraisītu hidroksilapatīta fāzes šķīdības palielināšanos. Biomimētiska hidroskilapatīta slāņa nogulsnēšanās uz β-trikalcija fosfāta biokeramikas virsmas tiek veicināta līdz ar magnija satura pieaugumu, kas saistīts ar magnija stabilizējošo efektu uz β-trikalcija fosfāta fāzi.
5. *In vitro* citotoksicitātes testu rezultāti apliecina, ka ar magniju modificēta kalcija fosfātu biokeramika ir perspektīvs kaulaudus reģenerējošs implantmateriāls un uzrāda mērenu

citotoksicitāti. Ar magniju modificēta hidroksilapatīta biokeramikas gadījumā neatkarīgi no magnija satura novērota līdzīga osteoblastu šūnu aktivitāte. β-trikalcija fosfāta biokeramika ar magnija saturu (0,67 ± 0,08) % (masas) uzrāda labāku osteoblastu dzīvotspēju, salīdzinot ar β-trikalcija fosfāta biokeramiku, kas satur magniju zemākā koncentrācijā. β-trikalcija fosfāta satura pieaugums līdz 40 % (masas) un magnija satura pieaugums līdz (0,64 ± 0,08) % (masas) divfāžu kalcija fosfātu biokeramikas paraugos ievērojami uzlabo osteogēno cilmes šūnu aktivitāti, salīdzinot ar biokeramikas paraugiem ar zemāku β-trikalcija fosfāta saturu un analogu magnija saturu.

CONCLUSIONS

1. Systematic research has demonstrated that calcium phosphates with reproducible and variable phase and chemical composition can be obtained through adapted aqueous chemical precipitation method, which has been modified to successfully add magnesium source, namely, magnesium oxide, into the synthesis environment, and, consequently, incorporate magnesium in the structure of the synthesis products.

2. Thermal stability of the synthesized hydroxyapatite and apatitic tricalcium phosphate is dependent on magnesium content in the products. Increasing magnesium up to (0.83 ± 0.19) % (by weight) lowers thermal stability of hydroxyapatite promoting partial phase transformation to β-tricalcium phosphate. Even a relatively small increase in the content of magnesium in the range from (0.25 ± 0.03) % (by weight) to (0.67 ± 0.08) % (by weight) significantly increases thermal stability of β-tricalcium phosphate, *i.e.*, the unmodified and magnesium modified β-tricalcium phosphate is stable up to 1280 °C and 1350 °C, respectively. Increase in the magnesium content of calcium deficient hydroxyapatite precursors leads to higher content of β-tricalcium phosphate phase in biphasic calcium phosphate bioceramics.

3. Increase of magnesium in the structure of hydroxyapatite, calcium deficient hydoxyapatite and apatititc tricalcium phosphate contributes to a specific surface area increase of (9 ± 2) % and to a mean particle size decrease, which in turn affects the sintering processes, *i.e.*, the particle densification, and the microstructure of bioceramic after high-temperature processing. It has been found that the presence of magnesium substantially hinders β-tricalcium phosphate grain growth.

4. *In vitro* bioactivity, *i.e.*, biomimetic hydroxyapatite deposition on a magnesium modified hydroxyapatite and β-tricalcium phosphate bioceramic surface from simulated body fluid, depends on the magnesium content in the bioceramic samples. In case of hydroxyapatite bioceramics, magnesium impedes deposition of biomimetic hydroxyapatite relating to the increased solubility of hydroxyapatite induced by modification with magnesium. Biomimetic hydroxyapatite deposition on β-tricalcium phosphate bioceramic surface is promoted by the increasing magnesium content, which is associated with magnesium stabilising effect on β-tricalcium phosphate phase.

5. *In vitro* cytotoxicity tests have proven that the magnesium modified calcium phosphate bioceramic is a perspective biomaterial for bone regeneration and shows a moderate cytotoxic reaction. Magnesium modified hydroxyapatite bioceramics, regardless of the magnesium content, has shown osteoblastic cell activity. β-tricalcium phosphate bioceramics with a magnesium content of (0.67 ± 0.08) % (by weight) has shown better osteoblastic cell viability compared to the unmodified β-tricalcium phosphate bioceramics. β-tricalcium phosphate content increase up to 40 % (by weight) and magnesium increase up to (0.64 ± 0.08) % (by weight) of biphasic calcium phosphate bioceramic greatly enhanced activity of the osteogenic stem cells compared to bioceramic with lower β-tricalcium phosphate content and admissible magnesium content.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Habraken W., Habibovic P., Epple M., Bohner M. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the furure?// Materials Today. – 2016. – Vol. 19 (2). – 69.–86. p.
2. Hench L.L. Bioactive materials: the potential for tissue regeneration// Journal of biomedical materials research. – 1998. – Vol. 41. – 511.–518. p.
3. Hench L.L. Bioceramics: from concept to clinic// Journal of the American Ceramic Society. – 1991. – Vol. 74. – 1487.–1510. p.
4. Oonishi H., Kushitani S., Yasukawa E., Iwaki H., Hench L.L., Wilson J., Tsuji E., Sugihara T. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute// Clinical orthopaedics and related research. – 1997. – Vol. 334. – 316.–325. p.
5. Elliott J.C. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. – Amsterdam: Elsevier Science B.V., 1994. – 404 p.
6. Sadat–Shojai M., Khorasani M.T., Dinpanah–Khoshdargi E., Jamshidi A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite in diverse structure// Acta Biomaterialia. – 2013. – Vol. 9 (8). – 7591.–7621. p.
7. Dorozhkin S.V., Matthias E. Biological and medical significance of calcium phosphates// Angewandte Chemie International Edition. – 2002. – Vol. 41. – 3130.–3146. p.
8. Meyers M.A., Chen P.Y., Lin A.Y.M., Seki. Y. Biological materials: structure and mechanical properties// Progress in Materials Science. – 2008. – Vol. 53. – 1.–20. p.
9. de Jong W.F. La Substance Minérale Dans les Os// Recueil des Travaux Chimiques des Pays–Bas. – 1926. – Vol. 45 (6). – 445.–448. p.
10. Pate F.D., Hutton J.T., Norrish K. Ionic Exchange between soil solution and bone: toward a predictive model// Applied Geochemistry. – 1989. – Vol. 4. – 303.–316. p.
11. Stotzel C., Muller F.A., Reiert F., Niederdraenk F., Barralet J.E., Gbureck U. Ion adsorption behavior of hydroxyapatite with different crystallinities// Colloids and Surfaces B. – 2009. –Vol. 74 (1) – 91.–95. p.
12. Shi D.L., Wen X.J. Introduction to biomaterials. - Beijing: Tsinghua University Press, 2006. – 253 p.
13. Pietak A.M., Reid J.W., Stott M.J., Sayer M. Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics// Biomaterials. – 2007. – Vol. 28 (28). – 4023.–4032. p.

14. Mouriño V., Cattalini J.P., Boccaccini A.R. Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: an overview of their biological applications and strategies for new developments// Journal of the Royal Society Interface. – 2011. – Vol. 9 (68). – 1.–19. p.
15. Lankford K., Letourneau P. Evidence that calcium may control neurite outgrowth by regulating the stability of actin filaments// The Jornal of Cell Biology. – 1989. – Vol. 109 – 1229.–1243. p.
16. Bolsover S.R. 2005. Calcium signalling in growth cone migration// Cell Calcium. – 2005. – Vol. 37. – 395.–402. p.
17. Maeno S., Niki Y., Matsumoto H., Morioka H., Yatabe T., Funayama A., Toyama Y., Taguchi T., Tanaka J. 2005. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture// Biomaterials. – 2005. – Vol. 26. – 4847.–4855. p.
18. Constantin M., Alexandru I. The role of sodium in the body// Balneo–Research Journal. – 2011. – Vol. 2 (1). – 70.–74. p.
19. Krejpcio Z. Essentiality of Chromium for Human Nutrition and Health// Polish Journal of Environmental Studies. – 2001. – Vol. 10 (6) – 399.–404. p.
20. Sigel A., Sigel H., Sigel R.K.O. Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases// Metal Ions in Life Sciences. – 2013. – Vol. 13 – 29.–47. p.
21. Rude R.K., Gruber H.E., Norton H.J., Wei L.Y., Frausto A., Mills B.G. Bone loss induced by dietary magnesium reduction to 10% of the nutrient requirement in rats is associated with increased release of substance P and tumor necrosis factor–alpha// Journal of Nutrition – 2004. – Vol. 134. – 79.–85. p.
22. Yamasaki Y., Yoshida Y., Okazaki M., Shimazu A., Uchida T., Kubo T. Synthesis of functionally graded $MgCO_3$ apatite accelerating osteoblast adhesion// Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2002. – Vol. 62. – 99.–105. p.
23. Zreiqat H., Howlett C.R., Zannettino A., Evans P., Schulze–Tanzil G., Knabe C., Shakibaei M. Mechanisms of magnesium–stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants// Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2002. – Vol. 62. – 175.–184. p.
24. Law N., Caudle M., Pecoraro V. Manganese redox enzymes and model systems: properties, structures, and reactivity// Advances in Inorganic Chemistry. – 1998. – Vol. 46. – 305.–440 .p.

25. Marie P.J. Strontium as therapy for osteoporosis// Current Opinion in Pharmacology. – 2005 – Vol. 5 (6). – 633.–636. p.
26. Matthew B.H., Theodore D.C., Justin J.M., Marissa M.D., U.S. Patent 12,643,218. (2011)
27. Wasserman R.H. Strontium as a Tracer for Calcium in Biological and Clinical Research// Clinical Chemistry. – 1998. – Vol. 44 (3). – 437.–439. p.
28. Ovesen J., Moller–Madsen B., Thomsen J.S., Danscher G., Mosekilde L. The positive effects of zinc on skeletal strength in growing rats// Bone. – 2001. – Vol. 29. – 565.–570. p.
29. Haimi S., Gorianc G., Moimas L., Lindroos B., Huhtala H., Raty S., Kuokkanen H., Sandor G.K., Schmid C., Miettinen S., Suuronen R. Characterization of zinc–releasing three–dimensional bioactive glass scaffolds and their effect on human adipose stem cell proliferation and osteogenic differentiation// Acta Biomaterialia. – 2009. – Vol. 5. – 3122.–3131. p.
30. Kawamura H., Ito A., Miyakawa S., Layrolle P., Ojima K., Ichinose N., Tateishi T. Stimulatory effect of zinc–releasing calcium phosphate implant on bone formation in rabbit femora// Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2000. – Vol. 50. – 184.–190. p.
31. Lang C., Murgia C., Leong M., Tan L.-W., Perozzi G., Knight D., Ruffin R., Zalewski P. Anti-inflammatory effects of zinc and alterations in zinc transporter mRNA in mouse models of allergic inflammation// American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology. – 2007. – Vol. 292 (2). – L577–L584.
32. Cho Y.H., Lee S.J., Lee J.Y., Kim S.W., Lee C.B., Lee W.Y., Yoon M.S. Antibacterial effect of intraprostatic zinc injection in a rat model of chronic bacterial prostatitis// International Journal of Antimicrobial Agents. – 2002. – Vol. 19. – 576.–582. p.
33. Lansdown A.B., Mirastschijski U., Stubbs N., Scanlon E., Agren M.S. Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects// Wound Repair and Regeneration. – 2007. – Vol. 15. – 2.–16. p.
34. Boivin G. Bone quality and strontium ranelate// IBMS BoneKEy. – 2010. – Vol. 7 (3). – 103.–107. p.
35. Saidak Z.P., Marie J. Strontium signaling: Molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis// Pharmacology & Therapeutics – 2012. – Vol. 136 (2). – 216.–226. p.

36. Szostek K., Glab H. Trace element concentrations in human teeth from a neolithic common grave at Nakonowo (Central Poland)// Variability and Evolution. – 2001. – Vol. 9. – 16.–27. p.
37. Busetto M., Giordani L., Brandone A., Cattaneo C., Mazzucchi A. Dietary investigation by trace element content in bones of ancient inhabitants of Northern Italy// Journal Radioanalytical and Nuclear Chemistry – 2008. – Vol. 275 (2). – 355.–363. p.
38. Arnaud J.M. Update on the assessment of magnesium status// British Journal of Nutrition. – 2009. – Vol. 99. – 24.–36. p.
39. Shepherd J.H., Best S.M. Calcium phosphate scaffolds for bone repair// The Journal of The Minerals, Metals & Materials Society. – 2011. – Vol. 63 (4). – 83.–92. p.
40. Albee H., Morrison S.J. Studies in bone growth – triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis// Annals of Surgery. – 1920. – Vol. 71 (1). – 32.–39. p.
41. Driskell T.D., Hassler C.R., Tennery V.J., McCoy L.R., Clarke V.J. Calcium phosphate resorbable ceramics: a potential alternative to bone grafting// Journal of Dental Research. – 1973. – Vol. 52. – 123.–131. p.
42. Denissen H.W., De Groot K. Immediate dental implants from synthetic dense calcium hydroxylapatite// Jouranl of Prosthetic Dentistry. – 1979. – Vol. 42 (5). – 551.–556. p.
43. Zaner D.J., Yukna R.A. Particle size of periodontal bone grafting materials// Journal of Periodontology. – 1984. – Vol. 55 (7). – 406.–409. p.
44. Klein C.P., De Groot K., Driessen A.A., van der Lubbe H.B. Interaction of biodegradable beta–whitlockite ceramics with bone tissue: an in vivo study. Biomaterials. – 1985. – Vol.6(3). – 189.–192.p.
45. Brown W.E., Chow L.C. A new calcium phosphate, water–setting cement// Accounts of Chemical research. – 1986. – Vol. 351.–379. p.
46. Paul B.C., Brown W. Hydroxyapatite and related materials. – Cambridge: CRC Press, 1994. – 368 p.
47. Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E. Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. – Oxford: Elsevier Inc. Academic Press, 2013. – 1555 p.
48. Dorozhkin S.V. Bioceramics of calcium orthophosphates// Biomaterials. – 2010. – Vol. 31 (7). – 1465.–1485. p.
49. Suvarna V., Shetye S., Chordia A. Bio-Ceramics// Journal of Pharmacy Research – 2009. – Vol. 2 (9). – 1620.–1626. p.

50. Bosco R., van den Beucken J., Leeuwenburgh S., Jansen J. Surface engineering for bone Iimplants: A trend from passive to active surfaces// Coatings. – 2012. – Vol. 2 (4). – 95.–119. p.
51. Orlovskii V.P., Komlev V.S., Barinov S.M. Hydroxyapatite and hydroxyapatite-based ceramics// Inorganic Materials. – 2002. – Vol. 38. – 973.–984. p.
52. Aina V., Bergandi L., Lusvardi G., Malavasi G., Imrie F.E., Gibson I.R. Sr-containing hydroxyapatite: morphologies of HA crystals and bioactivity on osteoblast cells// Materials Science and Engineering C. – 2013. – Vol. 33 (3). – 1132.–1142. p.
53. Slosarczyk A., Paszkiewicz Z., Zima A. The effect of phosphate source on the sintering of carbonate substituted hydroxyapatite// Ceramics International. – 2010. – Vol. 36 (2). – 577.–582. p.
54. Kuo M.C., Yen S.K. The process of electrochemical deposited hydroxyapatite coatings on biomedical titanium at room temperature// Materials Science and Engineering C. – 2002. – Vol. 20. – 153.–160. p.
55. Irbe Z. Kaulu cementu uz α–trikalcija fosfāta bāzes sastāva ietekme uz struktūru un īpašībām. Promocijas darba kopsavilkums. – Rīga: RTU, 2012. – 32 lpp.
56. Yong P., Macaskie L.E., Sammons R.I., Marquis P.M. Synthesis of nanophase hydroxyapatite by a Serratia sp. from waste–water containing inorganic phosphate// Biotechnology Letters. – 2004. – Vol. 26. – 1723.–1730. p.
57. Zhu S.H., Huang B.Y., Zhou K.C., Huang S.P., Liu F., Li Y.M., Xue Z.G., Long Z.G. Hydroxyapatite nanoparticles as a novel gene carrier// Journal of Nanoparticle Research. – 2004. – Vol. 6. – 307.–311. p.
58. Dorozhkin S.V. Nanodimensional and nanocrystalline apatites and other calcium orthophosphates in biomedical engineering, biology and medicine// Materials. – 2009. – Vol. 2. – 1975.–2045. p.
59. Muller-Mai C.M., Stupp S.I., Voigt C., Gross U. Nanoapatite and organoapatite implants in bone: histrology and ultrastructure of the interface// Journal of Biomedical Materials Research – 1995. – Vol. 29. – 9.–18. p.
60. Paul W., Sharma C.P. Nanoceramic matrices: Biomedical applications// American Journal of Biochemistry and Biotechnology – 2006. – Vol. 2. – 41.–48. p.
61. Verwilghen C., Rio S., Nzihou A., Gauthier D., Flamant G., Sharrock P.J. Preparation of high specific surface area hydroxyapatite for environmental applications// Journal of Material Science. – 2007. – Vol. 42. – 6062.–6066. p.

62. Bailliez S., Nzihou A., Beche E., Flamant G. Removal of lead (Pb) by hydroxyapatite sorbent// Process Safety and Environmental Protection. – 2004. – Vol. 82. – 175.–180. p.
63. Miao S., Weng W., Cheng K., Du P., Shen G., Han G., Zhang S. Sol–gel preparation of Zn–doped fluoridated hydroxyapatite films// Surface and Coatings Technology. – 2005. – Vol. 198. – 223.–226. p.
64. LeGeros R.Z. Calcium phosphates in oral biology and medicine// Monographs in Oral Science. – 1990. – Vol. 15. – 1.–201. p.
65. Phillips M.J., Darr J.A., Luklinska Z.B., Rehman I. Synthesis and characterization of nano-biomaterials with potential ontological applications// Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2003. – Vol. 14. – 875.–882. p.
66. Marchi J., Dantas A.C.S., Greil P., Bressiani J.C., Bressiani A.H.A., Muller F.A. Influence of Mg-substitution on the physicochemical properties of calcium phosphate powders// Materials Research Bulletin. – 2007. – Vol. 42. – 1040.–1050. p.
67. Salinas A.J., Vallet-Regi M. Evolution of ceramics with medical applications// Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie. – 2007. – Vol. 633. – 1762.–1773. p.
68. Cacciotti I., Bianco A. High thermally stable Mg-substituted tricalcium phosphate via precipitation// Ceramics International. – 2011. – Vol. 37. – 127.–137. p.
69. Carrodeguas R.G., Aza A.H.D., Turrillas X., Pena P., Aza S.D. New approach to the β→α polymorphic transformation in magnesium-substituted tricalcium phosphate and its practical implications// Journal of American Ceramic Society. – 2008. – Vol. 91. – 1281.–1286. p.
70. Cho J.S., Chung C.–P., Rhee S.-H. Bioactivity and osteoconductivity of biphasic calcium phosphates// Bioceramic Development and Applications – 2010. – Vol. 1. – 1.–3. p.
71. Bose S., Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review// Acta biomaterialia. – 2012. – Vol. 8 (4). – 1401.–1421. p.
72. Kohri M., Miki K., Waite D.E., Nakajima H., Okabe T. *In vitro* stability of biphasic calcium phosphate ceramics// Biomaterials. – 1993. – Vol. 14. – 299.–304. p.
73. Chen C.H., Chiang C.J., Rau G., Huang M.S., Chan K.K., Liao C.J., Kuo Y.J. *In viv*o evaluation of a new biphasic calcium phosphate bone substitute in rabbit femur defects model// Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications. – 2012. – Vol. 24 (6). – 537.–48. p.

74. Rameshbabu N., Rao K.P. Microwave synthesis, characterization and *in–vitro* evaluation of nanostructured biphasic calcium phosphates// Current Applied Physics – 2009. – Vol. 9 (1). – 29.–31. p.
75. Wang J., Chen W., Li Y., Fan S., Weng J., Zhang X. Biological evaluation of biphasic calcium phosphate ceramic vertebral laminae// Biomaterials – 1998. – Vol. 19. – 1387.–1392. p.
76. Michie M., Grimes R.W., Fong S.K., Metcalfe B.L. Predicted energies and structures associated with the mixed calcium strontium fluorapatites// Journal of Solid State Chemistry. – 2008. – Vol. 18. – 3287.–3293. p.
77. Renaudin G., Laquerriere P., Finilchuk Y., Jallot E., Nedelec J.M.. Structural characterization of sol-gel derived Sr-substituted calcium phosphates with anti-osteoporotic and anti-inflammatory properties// Journal of Materials Chemistry – 2008. – Vol. 18. – 3593.–3600. p.
78. Ivanova T.I., Frank–Kamenetskaya O.V., Koltsov A.B., Ugolkov V.L. Crystal structure of calcium–deficient carbonated hydroxyapatite. Thermal decomposition// Journal of Solid State Chemistry. – 2001. – Vol. 60. – 340.–349. p.
79. De Leeuw N.H. Computer simulations of structures and properties of the biomaterial hydroxyapatite// Jornal of Materials Chemistry – 2010. – Vol. 20. – 5376.–5389. p.
80. Lu X., Zhang H., Guo Y., Wang Y., Ge X., Watari F. Hexagonal hydroxyapatite formation on TiO_2 nanotubes under urea// The Royal Society of Chemistry. – 2011. – Vol. 13. – 3741.–3749. p.
81. Kannan S., Goetz-Neunhoeffer F., Neubauer J., Ferreira J.M.F. Ionic substitutions in biphasic hydroxyapatite and β-tricalcium phosphate mixtures: structural analysis by Rietveld refinement// Journal of the American Ceramic Society. – 2008. – Vol. 91 (1). – 1.–12. p.
82. Li K., Zhang Y., Li X., Shang Z., Lian H., Lin J. Tunable blue-green emission and energy transfer properties in β-$Ca_3(PO_4)_2$: Eu^{2+}, Tb^{3+} phosphors with high quantum efficiencies for UV–-LEDs// Dalton Transactions. – 2015. – Vol. 44. – 4683.–4692. p.
83. Boanini E., Gazzano M., Bigi A. Ionic substitutions in calcium phosphate synthesized at low temperature// Acta Biomaterialia. – 2010. – Vol. 6 (6) . – 1882.–1894. p.
84. O'Donnell M.D., Fredholm Y., De Rouffignac A., Hill R.G. Structural analysis of series of strontium-substituted apatites// Acta Biomaterialia. – 2008. – Vol. 4. – 1455.–1464. p.

85. Webster T.J., Massa-Schlueter E.A., Smith J.L., Slamovich E.B. Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations// Biomaterials. – 2004. – Vol. 25. – 2111.–2121. p.
86. Miyaji F., Kono Y., Suyama Y. Formation and structure of zinc-substituted calcium hydroxyapatite// Materials Research Bulletin – 2005. – Vol. 40. – 209.–220. p.
87. Matsunga K., Murata H., Mizoguchi T., Nakahira A. Mechanism of incorporation of zinc into hydroxyapatite// Acta Biomaterialia. – 2010. – Vol. 6. – 2289.–2293. p.
88. Hu W., Ma J., Wang J., Zhang S. Fine structure study on low concentration zinc substituted hydroxyapatite nanoparticles// Materials Science and Engineering C. – 2012. – Vol. 32. – 2404.–2410. p.
89. Kannan S., Ventura J.M.G., Lemos A.F., Barba A., Ferreira J.M.F. Effect of sodium addition on the preparation of hydroxyapatites and biphasic ceramics// Ceramics International. – 2008. – Vol. 34. – 7.–13. p.
90. Zahn D., Hochrein O. On the composition and atomic arrangement of calcium–deficient hydroxyapatite: An ab-initio analysis// Journal of Solid State Chemistry. – 2008. – Vol. 181. – 1712.–1716. p.
91. Abd El-Latif M.M., Elkady M.F. Kinetics study and thermodynamic behavior for removing cesium, cobalt and nickel ions from aqueous solution using nano-zirconium vanadate ion exchanger// Desalination. – 2011. – Vol. 271. – 41.–54. p.
92. Ghafari Nazari A., Tahari A., Moztarzadeh F., Mozafari M., Bahrololoom M.E. Ion exchange behaviour of silver-doped apatite micro- and nanoparticles as antibacterial biomaterial// Micro & Nano Letters. – 2011. – Vol. 6. – 713.–717. p.
93. Ibrahim D.M., Mostafa A.A., Ibrahim Korowash S. Chemical characterization of some substituted hydroxyapatites// Chemistry Central Journal. – 2011. – Vol. 5 (74). – 1.–11. p.
94. Kalita S.J., Bhatt H.A. Nanocrystalline hydroxyapatite doped with magnesium and zinc: Synthesis and characterization// Materials Science and Engineering C. – 2007. – Vol. 27. – 837.–848. p.
95. Landi E., Tampieri A., Mattioli–Belmonte M., Celotti G., Sandri M., Gigante A., Fava P., Biagini G. Biomimetic Mg– and Mg, CO^{3-} substituted hydroxyapatites: synthesis, characterization and in vitro behavior// Journal of the European Ceramic Society. – 2006. – Vol. 26. – 2593.–2601. p.

96. Thian E.S., Huang J., Best S.M., Barber Z.H., Brooks R.A., Rushton N., Bonfield W. The response of osteoblasts to nanocrystalline silicon-substituted hydroxyapatite thin films// Biomaterials. – 2006. – Vol. 27. – 2692.–2698. p.
97. Uddin M.H., Matsumoto T., Okazaki M., Nakahira A., Sohmura T. Biomimetic fabrication of apatite related biomaterials// Biomimetics Learning from Nature. – 2010. – 289.–304. p.
98. Bianco A., Cacciotti I., Lombardi M., Montanaro L., Bemporad E., Sebastiani M. F-substituted hydroxyapatite nanopowders: Thermal stability, sintering behaviour and mechanical properties// Ceramics International. – 2010. – Vol. 36 (1). – 313.–322. p.
99. Turkoz M., Atilla A.O., Evis Z. Silver and fluoride doped hydroxyapatites: Investigation by microstructure, mechanical and antibacterial properties// Ceramics International. – 2013. – Vol. 39 (8). – 8925.–8931. p.
100. Young R.A., Elliot J.C. Atomic scale bases for several properties of apatites// Archives of Oral Biology. – 1966. – Vol. 11. – 699.–707. p.
101. Calderin L., Stott M.J. Electronic and crystallographic structure of apatites// Physical Review B. – 2003. – Vol. 67. – 134106. p.
102. Rulis P., Ouyang L., Ching W.Y. Electronic structure and bonding in calcium apatite crystals: hydroxyapatite, fluorapatite, chlorapatite, and bromapatite// Physical Review B. – 2004. – Vol. 70. – 155104. p.
103. Schlesinger P.H., Blair H.C., Teitalbaum S.L., Edwards J.C. Characterization of the osteoclast ruffled border chloride channel and its role in bone resorption// The Journal of Biological Chemistry. – 1997. – Vol. 272. – 18636.–18643. p.
104. Neuman W.F., Neuman M.W. The chemical dynamics of bone mineral. – Chicago: University of Chicago Press, 1958. – 209 p.
105. Tamm T., Peld M. Computational study of cation substitutions in apatites// Journal of Solid State Chemistry. – 2006. – Vol. 179. – 1581.–1587. p.
106. Gutowska I., Machoy Z., Machalin B. The role of bivalent metals in hydroxyapatite structures as revealed by molecular modeling with the HyperChem software// Journal of Biomedical Materials Research A. – 2005, – Vol. 75 (4). – 788.–793. p.
107. Murakami Y., Sugo K., Yoshitake T., Hirano M., Okuyama T. Large–scale preparation and characterization of zinc–substituted hydroxyapatite for metal affinity chromatography// Separation and Purification technology. – 2013. – Vol. 103. – 161.–166. p.

108. Gomes S., Nedelec J.M., Renaudin G. The effect of temperature on the insertion of zinc into hydroxyapatite// Acta Biomaterialia. – 2012. – Vol. 8 (3). – 1180.–1189. p.
109. Singh A. Hydroxyapatite, a biomaterial: Its chemical synthesis, characterization and study of biocompatibility prepared from shell of garden snail, Helix aspersa// Bulletin of Materials Science. – 2012. – Vol. 35 (6). – 1031.–1038. p.
110. Terra J., Dourado E.R., Eon J.-G., Ellis D.E., Gonzalez G., Rossi A.M. The structure of strontium–doped hydroxyapatite: an experimental and theoretical study// Physical Chemistry Chemical Physics. – 2009. – Vol. 11 (3). – 568.–577. p.
111. Li Z.Y., Lam W.M., Yang. C., Xu B., Ni G.X., Abbah S., Cheung K.M.C., Luk K.D.K., Lu W.W. Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite// Biomaterials. – 2007. – Vol. 28 (7). – 1452.–1460. p.
112. Mocanu A., Furtos G., Rapuntean S., Horovitz O., Flore C., Garbo C., et al. Synthesis; characterization and antimicrobial effects of composites based on multi-substituted hydroxyapatite and silver nanoparticles// Applied Surface Science. – 2014. – Vol. 298. – 225.–235. p.
113. Honda M., Kawanobe Y., Ishii K., Konishi T., Mizumoto M., Kanzawa N., et al. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial properties of silver-containing hydroxyapatite prepared via ultrasonic spray pyrolysis route// Materials Science and Engineering C. – 2013. – Vol. 33(8). – 5008.–5018. p.
114. Lin Y,. Yang Z., Cheng J. Preparation, characterization and cntibacterial property of cerium substituted hydroxyapatite nanoparticles// Jounal of Rare earths. – 2007. – Vol. 25 (4). – 452.–456. p.
115. Kaygili O., Dorozhkin S.V., Ates T., Al–Ghamdi A., Yakuphanoglu F. Dielectric properties of Fe doped hydroxyapatite prepared by sol-gel method// Ceramics International. – 2014. –Vol. 40 (7). – 9395.–9402. p.
116. Walker J., Shadanbaz S., Woodfields T.B.F., Staiger M.P., Dias G.J. Magnesium biomaterials for orthopedic application: A review from a biological perspective// Journal of Biomedical Matererials Research Part B. – 2014. – Vol. 102. – 1316.–1331. p.
117. Chen X.,Liao X.,Huang Z.,You P.,Chen C.,KangY., Guangfu Y. Synthesis and characterization of novel multiphase bioactive glass-ceramics in the CaO-MgO-SiO_2 system// Journal of Biomededical Materials Research Part B. – 2010. – Vol. 93. – 194.–202. p.

118. Saboori A., Rabiee M., Moztarzadeh F., Sheikhi M., Tahriri M., Karimi M. Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of sol-gel-derived SiO_2-CaO-P_2O_5-MgO bioglass// Materials Science and Engineering C. – 2009. – Vol. 29. – 335.–340. p.
119. Cabrejos-Azama J., Alkhraisat M.H., Rueda C., Torres J., Blanco L., Lopez-Cabarcos E. Magnesium substitution in brushite cements for enhanced bone tissue regeneration// Materials Science and Engineering C. – 2014. – Vol. 43. – 403.–410. p.
120. Witte F. The history of biodegradable magnesium implants:a review// Acta Biomaterialia. – 2010. – Vol. 10. – 1680.–1693. p.
121. Landi E., Logroscino G., Proietti L., Tampieri A., Sandri M., Sprio S. Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behaviour// Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2008. – Vol. 19. – 239.–247. p.
122. Seeley Z., Bandyopadhyay A., Bose S. Tricalcium phosphate based resorbable ceramics: Influence of NaF and CaO addition// Materials Science and Engineering. – 2008. – Vol. 28. – 11.–17. p.
123. Racquel Z., LeGeros. Calcium phosphate-based materiāls containing zinc, magnesium, fluoride and carbonate. US7419680 (2008).
124. Janning C., Willbold E., Vogt C., Nellesen J., Meyer-Lindenberg A., Windhagen H., Thorey F., Witte F. Magnesium hydroxide temporarily enhancing osteoblast activity and decreasing the osteoclast number in peri-implant bone remodeling// Acta Biomaterialia. – 2010. – Vol. 6. – 1861.–1868. p.
125. Zreiqat H., Howlett C.R., Zannettino A., Evans P., Schulze-Tanzil G., Knabe C., Shakibaei M. Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants// Journal of Biomedical Materials Research A. – 2002. – Vol. 62. – 175.–184. p.
126. Takeichi M., Okuda T.S. Roles of magnesium and calcium ions in cell-to-substrate adhesion// Experimental Cell Research. – 1972. – Vol. 74. – 51.–60. p.
127. Yamasaki Y., Yoshida Y., Okazaki M., Shimazu A., Uchida T., Kubo T., Akagawa Y., Hamada Y., Takahashi J., Matsuura N. Synthesis of functionally graded $MgCO_3$ apatite accelerating osteoblast adhesion// Journal of Biomedical Materials Research A. – 2002. – Vol. 62. – 99.–105. p.
128. Abed E., Moreau R. Importance of melastatin–like transient receptor potential and cations (magnesium, calcium) in human osteoblast–like cell proliferation// Cell Proliferation. – 2007. – Vol. 40. – 849.–865. p.

129. Abed E., Moreau R. Importance of melastatin-like transient receptor potential and magnesium in the stimulation of osteoblast proliferation and migration by platelet-derived growth factor// American Journal of Physiology*:* Cell Physiology. – 2009. – Vol. 297. – 360–368. p.
130. Saboori A., Rabiee M., Moztarzadeh F., Sheikhi M., Tahriri M., Karimi M. Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of sol-gel-derived SiO_2-CaO-P_2O_5-MgO bioglass// Materials Science and Engineering C. – 2009. – Vol. 29. – 335–340. p.
131. Serre C.M., Papillard M., Chavassieux P., Voegel J.C., Boivin G. Influence of magnesium substitution on a collagen-apatite biomaterial on the production of a calcifying matrix by human osteoblasts// Journal of Biomedical Materials Research A. – 1998. – Vol. 42. – 626.–633. p.
132. Maier J.A.M., Bemardini D., Rayssiguier Y., Mazur A. High concentrations of magnesium modulates vascular endothelial cell behaviour *in vitro*// Biochimica et Biophysica Acta. – 2004. – Vol. 1689. – 6.–12. p.
133. Schendel S.A., Peauroi J. Magnesium–based bone cement and bone void filler: preliminary experimental studies// Journal of Craniofacial Surgery. – 2009. – Vol. 20 (2). – 461–464. p.
134. Pham T.T.T., Nguyen T.P., Pham T.N., Dinh T.M.T. Impact of physical and chemical parameters on the hydroxyapatite nanopowder synthesized by chemical precipitation method// Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology. – 2013. – Vol. 4 (3). – Art No. 035014.
135. Kolmas J., Jaklewicz A., Zima A., Bucko M., Paszkiewicz Z., Lis J., Slosarczyk A., Kolodziejski W. Incorporation of carbonate and magnesium ions into synthetic hydroxyapatite – The effect on physicochemical properties// Journal of molecular structure. – 2011. – Vol. 987. – 40.–50. p.
136. Cacciotti A., Bianco A., Lombardi M., Montanaro L. Mg-substituted hydroxyapatite nanopowders: Synthesis, thermal stability and sintering behaviour// Journal of the European Ceramic Society. – 2009. – Vol. 29. – 2969.–2978. p.
137. Fadeev I.V., Shvorneva L.I., Barinov S.M., Orlovskii V.P. Synthesis and structure of magnesium-substituted hydroxyapatite// Inorganic Materials. – 2003. – Vol. 39. – 947.–950. p.

138. Suchanek W.L., Byrappa K., Shuk P., Riman R.E., Janas V.F., Ten–Huisen K.S. Preparation of magnesium-substituted hydroxyapatite powders by the mechanochemical-hydrothermal method// Biomaterials. – 2004. – Vol. 25. – 4647.–4657. p.
139. Li X., Ito A., Sogo Y., Wang X., LeGeros R.Z. Solubility of Mg-containing β-tricalcium phosphate at 25 ºC// Acta Biomaterialia. – 2009. – Vol. 5. – 508.–517. p.
140. Kannan S., Ventura J.M., Ferreira J.M.F. Aqueous precipitation method for the formation of Mg-stabilized β-tricalcium phosphate: An X-ray diffraction study// Ceramics International. – 2007. – Vol. 33. – 637.–641. p.
141. Kim T.-W., Lee H.-S., Kim D.-H., Jin H.-H., Hwang K.-H., Lee J.-K., Park H.-C., Yoon S.-J. *In situ* synthesis of magnesium-substituted biphasic calcium phosphate and *in vitro* biodegradation// Materials Research Bulletin. – 2012. – Vol. 47. – 2506.–2512. p.
142. Kannan S., Lemos I.A.F., Rocha J.H.G., Ferreira J.M.F. Synthesis and characterization of magnesium substituted biphasic mixtures of controlled hydroxyapatite/β-tricalcium phosphate ratios// Journal of Solid State Chemistry. – 2005. – Vol. 178. – 3190.–3196. p.
143. Bigi A., Forseti E., Gregorini R., Ripamonti A., Roveri N., Shah J.S. The role of magnesium on the structure of biological apatites// Calcified Tissue International – 1992. – Vol. 50. – 439.–444. p.
144. Bertoni E., Bigi A., Cajozzi G., Gandolfi M., Panzavolta S, Roveri N. Nanocrystals of magnesium and fluoride substituted hydroxyapatite// Journal of Inorgaic Biochemistry. – 1998. – Vol. 72. – 29.–35. p.
145. Bigi A., Falini G., Foresti E., Gazzano M. Ripamonti A., Roveri N. Magnesium influence of hydroxyapatite crystallization// Journal of Inorganic Biochemistry. – 1993. – Vol. 4. – 69.–78. p.
146. Yasukawa A., Ouchi S., Kandori K., Ishikawa T. Preparation and characterization of magnesium-calcium hydroxyapatites// Journal of Materials Chemistry. – 1996. – Vol. 6. – 1401.–1405. p.
147. Laurencin D., Almora–Barrios N., de Leeiw N.H., Gervais C., Bonhomme C., Mauri F., Chrazanovski W., Kowles J.C., Newport R.J., Wong A., Gan Z., Smith M.E. Magnesium incorporation into hydroxyapatite// Biomaterials. – 2011. – Vol. 32. – 1826.–1837. p.
148. Park J., Lakes R.S. Biomaterials. An Introduction. – New York: Springer–Verlag, 2007. – 562 p.
149. Dorozhkin S.V. Functional biomaterials calcium orthophosphates as bioceramics: State of the art// Review: Literature And Arts Of The Americas. – 2010. – Vol. 1(1).– 22.–107. p.

150. Tas C. The use of physiological solutions or media in calcium phosphate synthesis and processing// Acta Biomaterialia – 2013. – Vol. 10 (5). – 1771.–1792. p.
151. Cox S.C., Jamshidi P., Grover L.M., Mallick K.K. Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation. – Materials Science and Engineering C. – 2014. – Vol. 35. – 106.–114. p.
152. Bohner M., Lemaitre J.. Can bioactivity be tested *in vitro* with SBF solution?// Biomaterials. – 2009. – Vol. 30 (12). – 2175.–2179. p.
153. Chavan P.N., Bahir M.M., Mene R.U., Mahabole M.P., Khairnar R.S. Study of nanobiomaterial hydroxyapatite in simulated body fluid: Formation and growth of apatite// Materials Science and Engineering B. – 2010. – Vol. 168 (1–3).– 224.–230. p.
154. Kokubo T. Bioceramics and their Clinical Application. – Cambridge: CRC Press, 2008. – 760 p.
155. Ferreira A.M., Gentile P., Chiono V., Ciardelli G. Collagen for bone tissue regeneration// Acta Biomaterialia. – 2012. – Vol. 8 (9). – 3191.–3200. p.
156. Clarke S., Walsh P., Maggs C., Buchanan F. Designs from the deep: Marine organisms for bone tissue engineering// Biotechnology Advaces. – 2011. – Vol. 29 (6). – 610.–617. p.
157. Brown O., McAfee M., Clarke S., Buchanan F. Resorption of biphasic calcium phosphate ceramics// Bioceramics Development and Applications. – 2010.
158. Ry H.-S., Hong K.S., Lee J.–K., Kim D.J., Lee J.H., Chang B.-S., Lee D., Lee C.-K., Chung S.-S. Magnesia-doped HA/β-TCP ceramics and evaluation of their biocompatibility// Biomaterials. – 2004. – Vol. 25 (3). – 393.–401. p.
159. Chen J., Wang Y., Chen X., Ren L., Lai C., He W., Zhang Q. A simple sol-gel technique for synthesis of nanostructured hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic powders// Materials Letters. – 2011. – Vol. 65 (12). – 1923.–1926. p.
160. Sibilia J.P. A guide to materials characterization and chemical analysis. – New York: John Wiley & Sons, 1996. – 408 p.
161. Dorozhkin S.V. Medical Application of Calcium Orthophosphate Bioceramics// BIO. – 2011. – Vol. 1 (1). – 1.–51. p.
162. Yuan H., Fernandes H., Habibovic P., Boer J.D., Barradas A.M.C., Ruiter A.D., Walsh W.R., van Blitterswijk C.A., de Bruijn J.D. Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting// Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2010. – Vol. 107 (31). – 13614.–13619. p.

163. Samavedi S., Whittington A.R., Goldstein A.S. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior// Acta Biomaterialia. – 2013. –Vol. 9 (9). – 8037.–8045. p.
164. Komlev V.S., Barinov S.M. Porous hydroxyapatite ceramics of bi-modal pore size distribution// Jouranl of Meterials Science: Materials in Medicine. – 2002. – Vol. 3, 295.–299. p.
165. Kubarev O.L., Komlev V.S., Barinov S.M., Solntsev K.A. Bioceramic granules with controlled resorbability for bone tissue therapy// Doklady Chemistry. – 2006. – Vol. 409 (1). – 124.–127. p.
166. Drevet R., Velard F., Faure J., Potiron S., Benhayoune H. *In vitro* dissolution and corrosion study of calcium phosphate coatings elaborated by pulsed electrodeposition current on Ti6Al4V substrate// Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2011. – Vol. 22 (4). – 753.–761. p.
167. Fulmer M.T., Ison I.C., Hankermayer C.R., Constantz B.R., Ross J. Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites// Biomaterials. – 2002. – Vol. 23. – 751.–755. p.
168. Komlev V.S., Barinov S.M., Girardin E., Oscarsson S., Rosengren A., Rusticelli F., Orlovskii V.P. Porous spherical hydroxyapatite and fluorhydroxyapatite granules: processing and characterization// Science and Technology of Advanced Materials. – 2003. –Vol. 4 (6). – 503.–508. p.
169. Zhang Y., Ai J., Wang D., Hong Z., Li W., Yokogawa Y. Dissolution properties of different compositions of biphasic calcium phosphate bimodal porous ceramics following immersion in simulated body fluid solution// Ceramics Interantional. – 2013. – Vol. 39 (6). – 6751.–6762. p.
170. De Lima I.R., Alves G.G., Soriano C.A., Campaneli A.P., Gasparoto T.H., Ramos Junior E.S., de Sena L.A., Rossi A.M., Granjeiro J.M. Understanding the impact of divalent cation substitution on hydroxyapatite: An *in vitro* multiparametric study on biocompatibility// Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2011. – Vol. 98 (3). – 351.–358. p.
171. Barrias C.C., Ribeiro C.C., Barbosa M.A. Adhesion and proliferation of human osteoblastic cells seeded on injectable hydroxyapatite microspheres// Key Engineering Materials. – 2004. – Vol. 54.–256. – 877.–880. p.

172. Lilley K.J., Gbureck U., Knowles J.C., Farrar D.F., Barralet J.E. Cement from magnesium substituted hydroxyapatite// Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2005. – Vol. 16 (5). – 455.–460. p.
173. Sader M.S., Soares G.A., LeGeros R.Z. Mg-substituted tricalcium phosphates from Mg-substituted calcium deficient apatite: Structure and physicochemical properties// Bioceramics Development and Applications. – 2010.
174. Ko Y.M., Lee K., Kim B.H. Effect of Mg ion on formation of bone-like apatite on the plasma modified titanium surface// Surface and Coatings Technology. – 2013. – Vol. 228 (3). – 404.–407. p.
175. Habibovic P., Barralet J.E. Bioinorganics and biomaterials: bone repair// Acta Biomaterialia. – 2011. – Vol. 7(8). – 3013.–3026. p.
176. Nabiyouni M., Ren Y., Bhaduri S.B. Magnesium substitution in the structure of orthopedic nanoparticles: A comparison between amorphous magnesium phosphates, calcium magnesium phosphates, and hydroxyapatites// Materials Science and Engineering C. – 2015. – Vol. 52. – 11.–17. p.
177. Laires M.J., Montmeiro C.P., Bicho M. Role of cellular magnesium in health and human disease// Frontiers in Bioscience. – 2014. – Vol. 9. – 262.–276. p.
178. Mroz W., Bombalska A., Burdyńska S., Jedyński M., Prokopiuk A., Budner A., Slocsarzyk A., Zima A,. Menaszek E., Scislowska-Czarnecka A., Niedzielski K. Structural studies of magnesium doped hydroxyapatite coatings after osteoblast culture// Journal of Molecular Structure. – 2010. – Vol. 977 (1–3). – 145.–152. p.
179. Hartwig A. Role of magnesium in genomic stability// Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 2001. – Vol. 475 (1–2). – 113.–121. p.
180. Wu L., Luthringer B.J.C., Feyerabend F., Schilling A.F., Willumeit R. Effects of extracellular magnesium on the differentiation and function of human osteoclasts// Acta biomaterialia. – 2014. – Vol. 10 (6). – 2843.–2854. p.
181. Ren F., Leng Y., Xin R., Ge X. Synthesis, characterization and ab initio simulation of magnesium–substituted hydroxyapatite// Acta Biomaterialia. – 2010. – Vol. 6 (7). – 2787.–2796. p.
182. Geng Z., Cui Z., Zhu S., Liang Y., Lu W.W., Yang X. Synthesis, characterization and formation mechanism of magnesium– and strontium–substituted hydroxyapatite// Journal of Materials Chemistry B. – 2015. – Vol. 3. – 3738.–3746. p.

183. Lagier R., Baud C.–A. Magnesium whitlockite, a calcium phosphate crystal of special interest in pathology// Pathalogy Research and Practice. – 2003. – Vol. 199 (5). – 329.–335. p.
184. Katti K.S. Biomaterials in total joint replacement// Colloids and Surfaces B. Biointerfaces. – 2004. – Vol. 39. – 133.–142. p.
185. Koerten HK, van der Meulen J. Degradation of calcium phosphate ceramics. Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 1999. – Vol. 44. – 78.–86. p.
186. Šalmas–Ancānes K. Kalcija fosfātu sintēzes parametru ietekme uz biokeramikas īpašībām. Promocijas darba kopsavilkums. – Rīga: RTU, 2011. – 29 lpp.
187. Locs J., Zalite V., Berzina–Cimdina L., Sokolova M. Ammonium hydrogen carbonate provided viscous slurry foaming – a novel technology for the preparation of porous ceramics// Journal of the European Ceramic Society. – 2013. – Vol. 33. – 3437.–3443. p.
188. Sanosh K.P., Chu M.-C., Balakrishan A. Synthesis of nano hydroxyapatite powder that simulate teeth particle morphology and composition// Current Applied Physics. – 2009. – Vol. 9. – 1459.–1462. p.
189. Zdrakov B.D., Čermak J.J., Šefara M., Janku J. Pore clasification in the characterization of porous materials: A perspective// Central European Journal of Chemistry. – 2007. – Vol. 5 (2). – 385.–395. p.
190. ISO 13175–3:2012 Implants for surgery – Calcium phosphates – Part 3: Hydroxyapatite and beta–tricalcium phosphate bone substitutes
191. Giesche H. Mercury porosimetry: A general (practical) overview// Particle and Particle Systems Characterization. – 2006. – Vol. 23. – 9.–19. p.
192. A. Rauhvargers. Vispārīgā ķīmija. – Rīga: Zinātne, 1996. – 383 lpp.
193. Nouri A., Castro R., Santos J.L., Fernandes C., Rodrigues J., Tomás H. Calcium phosphate-mediated gene delivery using simulated body fluid (SBF). International Journal of Pharmacy. – 2012. – Vol. 434 (1–2). 199.–208. p.
194. Kokubo T., Takadama H. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity?// Biomaterials. – 2006. – Vol. 27 (15). – 2907.–2915. p.
195. Drouet C. Apatite formation:Why it may not work as planned, and how to conclusively identify apatite compounds// BioMed Research International. – 2013. – Article ID 490946, 12 p.

196. Afshar A., Ghorbani M., Ehsani N., Saeri M., Sorrell C. Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite// Materials Design. – 2003. – Vol. 24. – 197.–202. p.
197. Lazic S., Zec S., Miljevic N., Milonjic S. The effect of temperature on the properties of hydroxyapatite precipitated from calcium hydroxide and phosphoric acid// Thermochimica Acta. – 2001. – Vol. 373. – 13.–22. p.
198. Catros S., Guillemot F., Lebraud E., Chanseau C., Perez S., Bareille R., Amédéea J., Fricain J.C. Physico-chemical and biological properties of a nano-hydroxyapatite powder synthesized at room temperature// Innovation and Research in BioMedical engineering. – 2010. – Vol. 31. – 226.–233. p.
199. Sykes A.G. Advances in inorganic chemistry. – New York: Academic Press, 1991., 499 p.
200. Berzina–Cimdina L., Borodajenko N. Research of calcium phosphates using fourier transform infrared spectroscopy, Infrared Spectroscopy – Materials Science, Engineering and Technology. – Rijeka: InTech, 2012. – 510 p.
201. Sabot J.F., Gustin M.P., Delahougue K., Faure F., Machon C., Hartmann D.J. Analytical investigation of salivary calculi, by mid-infrared spectroscopy// Analyst. – 2012. – Vol. 137 (9). – 2095.–2100. p.
202. Drouet C., Bosc F., Banu M., Largeot C., Combes C., Dechambre G., Estournès C., Raimbeaux G., Rey C. Nanocrystalline apatites: From powders to biomateriāls// Powder Technology. – 2009. – Vol. 190. – 118.–122. p.
203. Nasiri-Tabrizi B., Fahami A., Ebrahimi-Kahrizsangi R. Characterization of nanostructured calcium phosphate-based bioceramics: TEM and SEM/FE-SEM studies// Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology. – 2012. – Vol. 2. – 1259.–1270. p.
204. Farzadi A., Bakhshi F., Solati-Hashjin M., Asadi-Eydivand M., Azuanabu Osman N. Magnesium incorporated hydroxyapatite: synthesis and structural properties characterization// Ceramics International. – 2014. – Vol. 40. – 6021.–6029. p.
205. Sung Y.M., Lee J.C., Yang Y.W. Crystallization and sintering characteristics of chemically precipitated hydroxyapatite nanopowder// Journal of Crystal Growth. – 2004. – Vol. 262. – 467.–472. p.
206. Stipniece L., Salma-Ancane K., Borodajenko N., Sokolova M., Jakovlevs D., Berzina-Cimdina L. Characterization of Mg-substituted hydroxyapatite synthesized by wet chemical method// Ceramics International. – 2014. – Vol. 40 (2). – 3261.–3267. p.

207. Combes C., Rey C. Amorphous calcium phosphates: Synthesis, properties and uses in biomaterials// Acta Biomaterialia. – 2010. – Vol. 6 (9). – 3362.–3378. p.
208. Salma–Ancane K., Stipniece L., Irbe Z., Sokolova M., Krieke G., Berzina-Cimdina L. Effect of Mg content on thermal stability of β–tricalcium phosphate ceramics// Key Engineering Materials. – 2014. – Vol. 604. – 192.–195. p.
209. Champion E. Sintering of calcium phosphate bioceramics// Acta biomaterialia. – 2013. – Vol. 9 (4). – 5855.–5875. p.
210. Clarke S., Walsh P., Maggs C., Buchanan F. Designs from the deep: marine organisms for bone tissue engineering// Biotechnology advances. – 2011. – Vol. 29 (6). – 610.–617. p.
211. Lombardi M., Palmero P., Haberko K., Pyda W., Montanaro L. Processing of a natural hydroxyapatite powder: From powder optimization to porous bodies development// Journal of the European Ceramic Society. – 2011. – Vol. 31 (14). – 2513.–2518. p.
212. Zyman Z., Tkachenko M., Epple M., Polyakow M., Naboka M. Magnesium-substituted hydroxyapatite ceramics// Materialwissenschaft und Werkstofftechnik. – 2006. – Vol. 37. – 474.–477. p.
213. Yaszemski M.J., Payne R.G., Hayes W.C., Langer R., Mikos A.G. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone// Biomaterials. – 1996. – Vol. 17 (2). – 175–185. p.
214. Enderle R., Gotz-Neunhoeffer F., Gobbels M., Muller F.A., Greil P. Influence of magnesium doping on the phase transformation temperature of β-TCP ceramics examined by Rietveld refinement// Biomaterials. – 2005. – Vol. 26 (17). – 3379–3384. p.
215. Ramesh S., Aw K.L., Tolouei R., Amiriyan M., Tan C.Y., Hamdi M. Sintering properties of hydroxyapatite powders prepared using different methods// Ceramics International. – 2013. – Vol. 39 (1). – 111.–119. p.
216. Kannan S., Vieira S.I., Olhero S.M. Synthesis, mechanical and biological characterization of ionic doped carbonated hydroxyapatite/β–tricalcium phosphate mixtures// Acta Biomaterialia. – 2011. – Vol. 7 (4). – 1835.–1843. p.
217. Ryu H.S., Hong K.S., Lee J.K., Kim D.J. Variations of structure and composition in magnesium incorporated hydroxyapatite/β-calcium phosphate// Jornal of Materials Research. – 2006. – Vol. 21 (2). – 428.–436. p.
218. Gomes S., Renaudin G., Jallot E., Nedelec J.-M. Structural characterization and biological fluid interaction of Sol-Gel derived Mg-substituted biphasic calcium phosphate ceramics// Applied Materials and Interfaces. – 2009. – Vol. 1 (2). – 505.–513. p.

219. Tardei C., Grigore F., Pasuk I., Stoleriu S. The study of Mg^{2+}/Ca^{2+} substitution of beta-tricalcium phosphate// Journal of Optoelectronics and Advanced Materials. – 2008. – Vol. 8. – 568.–571. p.
220. Tampieri A. Celotti G.,Landi E., Sandri M. Magnesium doped hydroxyapatite: synthesis and characterization// Key Engineering Materials. – 2004. – Vol. 264–268. – 2051.–2054. p.
221. Bertinetti L., Tampieri A., Landi E., Martra G., Coluccia S.Punctual investigation of surface sites of HA and magnesium-HA// Journal of European Ceramic Society. – 2006. – Vol. 26. – 987.–991. p.
222. Bertinetti L., Drouet C., Combes C., Rey C., Tampieri A., Coluccia S., Martra G. Surface characteristics of nanocrystalline apatites: effect of Mg surface enrichment on morphology, surface hydration species, and cationic environments// Langmuir. – 2009. – Vol. 25. – 5647.–5654. p.
223. Nguea H.D., Rihn B., Mahon D., Bernard J.L., De Reydellet A., Le Faou A. Effects of various man-made mineral fibers on cell apoptosis and viability// Archives of Toxicology. – 2005. – Vol. 79. – 487.–492.p
224. Feyerabend F., Fischer J., Holtz J., Witte F., Willumeit R., Drucker H., Vogt C., Hort N. Evaluation of short-term effects of rare earth and other elements used in magnesium alloys on primary cells and cell lines// Acta Biomaterialia. – 2010. – Vol. 6. – 1834.–1842. p.