

RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE

Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte

Vispārīgās ķīmijas tehnoloģijas institūts

Līga STĪPNIECE

Doktora studiju programmas “Materiālzinātne” doktorante

**AR MAGNIJU MODIFICĒTU KALCIJA FOSFĀTU
BIOKERAMIKAS IZSTRĀDE KAULAUDU
REĢENERĀCIJAI**

Promocijas darba kopsavilkums

Zinātniskās vadītājas:

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

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

RTU Izdevniecība

Rīga 2016

Stīpniece L. Ar magniju modificētu kalcija fosfātu biokeramikas izstrāde kaulaudu reģenerācijai. Promocijas darba kopsavilkums. – R.: RTU Izdevniecība, 2016. – 35 lpp.

Iespiests saskaņā ar VĶT institūta 2016. gada 28. jūnija lēmumu, protokols Nr. 16-15/16.

ISBN 978-9934-10-879-2

PROMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS RĪGAS TEHNISKĀS UNIVERSITĀTES INŽENIERZINĀTŅU DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI

Promocijas darbs inženierzinātņu doktora grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2016. gada 14. decembrī plkst. 13⁰⁰ Rīgas Tehniskās universitātes Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultātē, Paula Valdena ielā 3/7, 272. auditorijā.

OFICIĀLIE OPONENTI

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

Profesore *Dr. med.* Juta Kroiča
Bioloģijas un mikrobioloģijas katedra, Rīgas Stradiņa universitāte

Profesors *PhD. Bikramjit Basu*
Materiālzinātnes un inženierzinātnes katedra, Indijas Tehnoloģijas institūts, *IIT-Kanpur*,
Indija

APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājusi šo promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē inženierzinātņu doktora grāda iegūšanai. Promocijas darbs zinātniskā grāda iegūšanai nav iesniegts nevienā citā universitātē.

Līga Stīpniece

Datums:

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu valodā, tajā ir ievads, trīs nodaļas, t. i., literatūras apskats (piecas apakšnodaļas), eksperimentālā daļa (četras apakšnodaļas), rezultāti un to izvērtējums (trīs apakšnodaļas), secinājumi un izmantotās literatūras saraksts. Promocijas darba saturs izklāstīts 141 lapaspusē. Darbā ir 48 attēli, 22 tabulas un izmantotās literatūras saraksts, kas ietver 224 literatūras avotus.

PATEICĪBA

Visdziļākā pateicība promocijas darba zinātniskajām vadītājām profesorei *Dr. sc. ing.* Līgai Bērziņai-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 MLKF 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* (Landspítali 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.

SATURS

DARBA VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS.....	6
Tēmas aktualitāte.....	6
Promocijas darbam izvirzītais mērķis.....	6
Promocijas darbam izvirzītie uzdevumi	6
Aizstāvamās tēzes.....	7
Promocijas darba zinātniskā nozīmība un novitāte	7
Promocijas darba praktiskā nozīmība.....	7
Darba aprobācija.....	7
Publikāciju saraksts	7
Dalība konferencēs	9
LITERATŪRAS APSKATS	13
EKSPERIMENTU METODOLOĢIJA.....	15
1. Ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursoru pulveru sintēze	15
2. Ar Mg modificētu CaP biokeramikas izgatavošana	16
3. Sintēžu produktu fizikālķīmisko īpašību raksturošana	16
4. Biokeramikas <i>in vitro</i> pārbaudes	17
REZULTĀTU IZVĒRTĒJUMS.....	18
1. Ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursoru raksturojums	18
2. Ar Mg modificēta HAp biokeramikas raksturojums	20
3. Ar Mg modificēta β -TCP biokeramikas raksturojums	23
4. Ar Mg modificētu BCP biokeramikas raksturojums	26
5. Ar Mg modificētu CaP biokeramikas šķīdības, <i>in vitro</i> bioaktivitātes un citotoksicitātes pētījumi.....	28
SECINĀJUMI	34
LITERATŪRAS SARAKSTS	35

DARBA VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS

Tēmas aktualitāte

Saskaņā ar 2012. gada 15. decembrī medicīnas žurnālā «*The Lancet*» publicētajiem starptautisku ekspertu ziņojumiem muskuloskeletālās sistēmas traucējumi ir otrs izplatītākais cēlonis invaliditātei globāli. Tā rezultātā nepieciešamība pēc materiāliem dzīves kvalitātes uzlabošanai rada pieprasījumu pēc inovatīvu biomateriālu izstrādes ar specifiskām īpašībām audu patoloģiju profilaksei, ārstēšanai un reģenerācijai.

Kalcija fosfāti (CaP), īpaši, hidroksilapatīts (HAp) un β -trikalcija fosfāts (β -TCP), uzrādot lielisku bioloģisko saderību, bioaktivitāti un/vai biorezorbciju, raduši plašu lietojumu biomedicīnas nozarē kā kaulu aizvietotājmateriāli jau vairāk nekā 40 gadu garumā. Zinātniskās literatūras analīze norāda uz pieaugošu interesi par sintētisko CaP biomateriālu modificēšanu ar bioloģiski aktīviem elementiem, t. sk. magniju (Mg), tuvinot to īpašības kaula minerālās komponentes, t. i., bioloģiskā HAp, īpašībām, un uzlabojot to saderību ar dzīvajiem audiem. Tomēr šādu modificētu CaP pārākums pār nemodificētiem CaP vēl nav pilnībā pierādīts. Turklāt zinātniskajā literatūrā ir pieejama ierobežota informācija par sistemātiskiem, salīdzinošiem pētījumiem par dažāda Mg satura un CaP, t. i., HAp un β -TCP, fāžu attiecību kombināciju ietekmi uz biokeramikas fizikālķīmiskajām un bioloģiskajām īpašībām. Tādējādi eksperimentālajā darbā, kura pamatmērķis ir izstrādāt alternatīvus CaP implantmateriālus osteoporozes skarto kaulaudu bojājumu novēršanai, tika pētīta ar Mg modificētu CaP biokeramika un izvērtēta mainīga Mg satura, kā arī fāžu sastāva ietekme uz osteoblastu un osteogēno cilmes šūnu aktivitāti mijiedarbībā ar biokeramiku.

Nemot vērā Mg bioloģisko nozīmi un funkcijas organismā, sagaidāms, ka daļēja Ca aizvietošana ar Mg varētu ievērojami uzlabot CaP bioloģiskās īpašības. Prognozēts, ka Ca aizvietošanas ar Mg un CaP biorezorbējošo īpašību kombinācijas rezultātā tiktu iegūts biomateriāls, kas, implantēts organismā un pakāpeniski šķīstot, izdalītu (Mg^{2+}) jonus, kas veicinātu kaulaudu augšanu *de novo*.

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

- Bastoties uz literatūras datiem, izstrādāt kalcija fosfātu sintēzes metodi ar magniju modificētu hidroksilapatītu, β -trikalcija fosfāta un divfāžu kalcija fosfātu biokeramikas iegūšanai laboratorijas apstākļos.
- Veikt kalcija fosfātu biokeramikas prekursoru pulveru – hidroksilapatītu, kalcija deficītā hidroksilapatītu un apatītiska trikalcija fosfāta sintēžu sērijas, sistemātiski mainot magnija jonu avota koncentrāciju sintēzes vidē.

- Novērtēt mainīgā magnija satura ietekmi uz sintezētu un augsttemperatūrā apstrādātu kalcija fosfātu produktu fizikālķīmiskajām īpašībām un biokeramikas potenciālo bioaktivitāti.
- Vadoties pēc literatūras datiem un eksperimentālajiem rezultātiem, izvērtēt kalcija fosfātu biokeramikas optimālo magnija saturu un fāžu sastāvu izmantošanai kaulaudu reģenerācijai.

Aizstāvamās tēzes

- 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.
- Kalcija atomu aizvietošana ar magnija atomiem kalcija fosfātu kristāliskajā struktūrā sekmē magnija jonu izdalīšanos, nodrošinot iegūtās biokeramikas variējamu bioresorbciju fizioloģiskos apstākļos un pastiprinot šūnu aktivitāti un dzīvotspēju.

Promocijas darba zinātniskā nozīmība un novitāte

- Pirmo reizi sistemātiski un kompleksi pētītas un izvērtētas sakarības starp magnija saturu un kalcija fosfātu fāžu sastāvu, fizikālķīmiskajām un bioloģiskajām īpašībām.
- Pirmo reizi, izmantojot *in situ* viskozas masas uzpūšanas metodi, kā poru veidojošo aģentu lietojot amonija hidroģēnkarbonātu un keramikas masas plastifikatoru – glicerīnu, no ķīmiskās šķīduma nogulsnešanas 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, par tiem ziņots 27 starptautiskās zinātniskās konferencēs (32 recenzētas zinātniskās konferenču tēzes).

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 TiO₂ 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. Štīpniece, 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).

Dalība konferencēs

1. Štīpniece, 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. Štīpniece, 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., Štīpniece, 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., Štīpniece, 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., Štīpniece, 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. Štīpniece, 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. Štīpniece, 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., Kriekē, 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 Level (*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 Behaviour 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 phosphate bioceramics: preparation and *in vitro* evaluation (*stenda referāts*). Narkevica, I., Stīpniece, L., Ozoliņš, J. Hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol) nanocomposite coated TiO₂ scaffolds for bone tissue engineering (*stenda referāts*). *40th International Conference and 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, Reikjavīka, 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**.

LITERATŪRAS APSKATS

Slimi un bojāti organisma audi, t. sk. kauli, visos laikos ir bijusi globāla problēma. 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 pārstēdzoša attīstība inovatīvu implantmateriālu izstrādē. Starp šiem materiāliem biokeramikai ir īpaša nozīme.

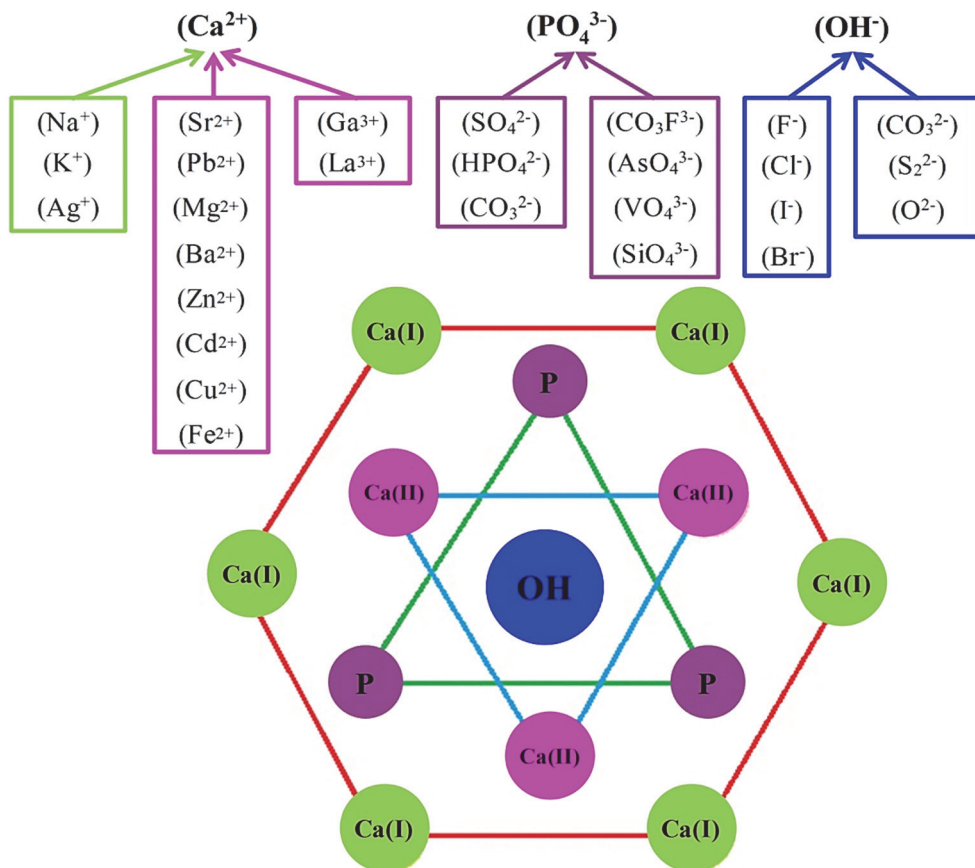
Biokeramikai ir izvirzīti šādi priekšnoteikumi: ķīmiskā stabilitāte organismā, bioloģiskā saderība un prognozējama biorezorbcija [2]. Biokeramikas izmantošanas iespējas medicīnas jomā veicinājušas daudzu pētījumu attīstību. Neskatoties uz plašajiem pētījumiem, zinātne joprojām ir tālu no tādu materiālu izstrādes, kas varētu tikt izmantoti, lai pilnībā aizstātu dabiskos audus.

No biokeramikas materiāliem vislielāko uzmanību izpelnījušies CaP, pateicoties to potenciālam izmantošanā cieto audu, t. i., kaulu un zobu, labošanā. CaP, t.sk. HAp un β -TCP, kā arī divfāžu kalcija fosfātu (BCP), kas satur HAp un β -TCP dažādās attiecībās, 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 [1, 2]. 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. Pirmo reizi biomateriālu uz CaP bāzes izmantošana kaulu lūzumu labošanai fiksēta 1920. gadā, tomēr plašāki CaP pētījumi, kas vērsti uz biomedicīnisku pielietojumu, aizsākti 1970. gadā [1].

CaP, pateicoties to elastīgajai un vienlaikus stabilajai kristāliskajai struktūrai, piemīt spēja iekļaut izomorfus aizvietotājus pamatelementu pozīcijās (skat. 1. attēlu), tādējādi izskaidrojot dabīgā kaula minerālās komponentes jeb bioloģiskā HAp ķīmiskā sastāva plašās variācijas [3]. Izpētīts, ka izomorfu aizvietotāju, t. i., elementu, kas neietilpst CaP pamatsastāvā, iekļaušana struktūrā ievērojami ietekmē tādas sintētisko materiālu īpašības kā kristāliskums un šķīdība, kā arī galaproduktu bioloģisko saderību. Līdz ar to modificētu CaP sintēze guvusi popularitāti, jo ir iespējams izstrādāt implantmateriālus, kas uzrādītu vēlamas īpašības specifiskiem biomedicīniskiem lietojumiem [4]. CaP materiālu modificēšanu visbiežāk veic ar mērķi uzlabot tā bioloģisko saderību ar dzīvajiem audiem.

Mg loma dažādu organisma funkciju nodrošināšanā veicinājusi biomateriālu uz Mg bāzes attīstību vairāku desmitu gadu garumā. Līdz pat mūsdienām populārākais Mg lietojums medicīnā ir kaulu defektu labošanā gan tīra metāla, gan sakausējumu formā [5]. Biomateriālu modificēšana ar Mg tiek veikta, pievienojot to pamatsastāvam bioloģiski saderīgus Mg savienojumus, t. sk. dažādus Mg fosfātus (MgP) vai MgO, vai iekļaujot Mg atomus attiecīgā savienojuma, piemēram, CaP kristālrežģī. Mg iekļaušana kaulu

implantmateriālos uz CaP bāzes ir svarīga vairāku iemeslu dēļ, ieskaitot dziļāku izpratni par biomineralizācijas procesu, materiāla bioaktivitātes uzlabošanu un jonu, kas kavē kaulu slimību, t. sk. osteoporozes, attīstību, mērķtiecīgu un lokalizētu piegādi. Tādējādi aktuāli kļūst pētījumi par tādu biomateriālu izstrādi, kas spētu atbrīvot (Mg^{2+}) jonus organisma vidē. Pierādīts, ka (Mg^{2+}) joni veicina šūnu adhēziju uz biomateriāla virsmas, kā arī uzlabo osteoblastu proliferāciju, vairošanos, mineralizāciju un angiogēnās funkcijas.

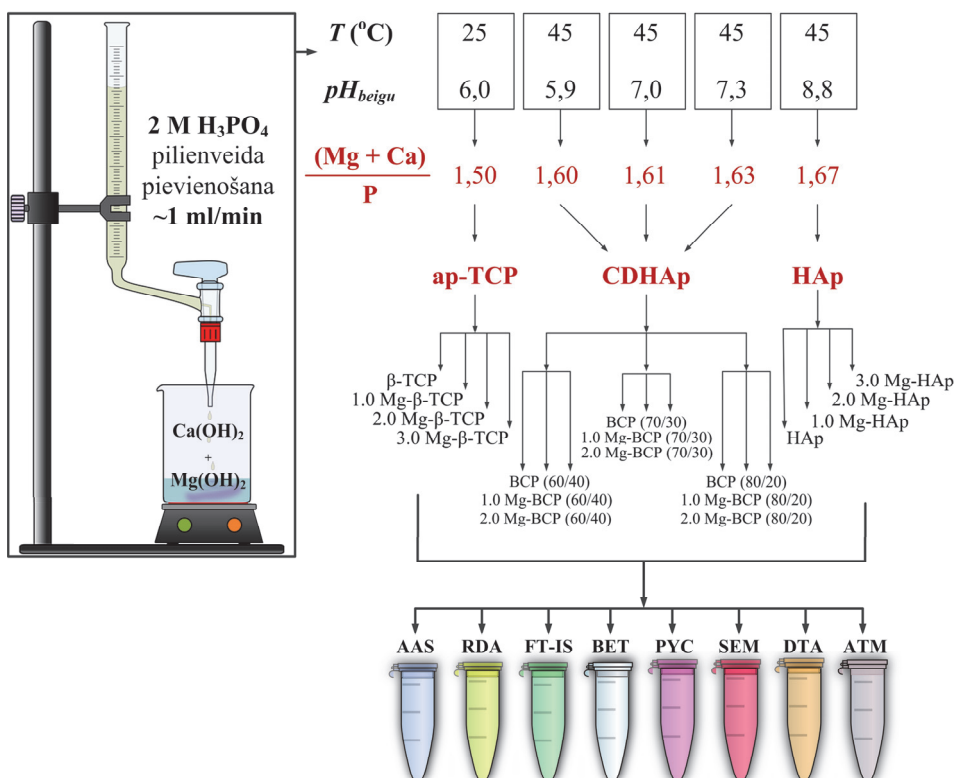


1. attēls. Aizvietošanas iespējas HAp heksagonālajā struktūrā.

EKSPERIMENTU METODOLOĢIJA

1. Ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursoru pulveru sintēze

Ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursoru pulveru, t. i., HAp, kalcija deficītā HAp (CDHAp) un apatītiska TCP (ap-TCP) sintēzes veiktas, izmantojot RTU Rūdolfa Cimdiņa Rīgas Biomateriālu inovāciju un attīstības centrā izstrādātu metodi [6], kas piemērota CaP ar variējamu (Ca + Mg)/P molāro attiecību sintēzei, pielāgojot sintēzes tehnoloģiskos parametrus, proti, temperatūru (T) un pH_{beigu} , kā ilustrēts 2. attēlā.



2. attēls. Ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursoru pulveru iegūšanas procesa principiāla shēma, t. sk., tehnoloģiskie parametri (T un pH_{beigu}), sintēžu produktu apzīmējumi.

Adaptētā ķīmiskās suspensijas nogulsnešanas metode modificēta ar «Mg» prekursora, proti, MgO (*reagent-grade*, ES/Scharlau), pievienošanu sintēzes vidē. Dažāds Mg saturs sintēžu produktos nodrošināts, mainot sintēzes vidē pievienotā MgO daudzumu. MgO apjoms attiecībā pret «Ca» prekursora – CaO (*puriss.*, Fluka), daudzumu sintēzes vidē variē no 0 % (masas) līdz 3 % (masas). Sintēzes procesa galvenie etapi:

- 1) izejmateriālu sagatavošana, proti, CaO un MgO kalcinēšana (1100 °C, 1 h), lai atbrīvotos no adsorbētā atmosfēras H₂O un CO₂;

- 2) izejas suspensijas sagatavošana «kaļķu dzēšanas» procesā, disperģējot pulverveida MgO un/vai CaO dejonizētā H₂O;
- 3) izejas suspensijas homogenizēšana planetārajās bumbu dzirnavās, izmantojot ahāta traukus un sfēriskus maļķermeņus ar diametru 10 mm, ar malšanas ātrumu 300 apgr./min un malšanas laiku 40 min;
- 4) nogulsnešanās reakcijas realizācija, kur 0,15 M izejas suspensijai, proti, Ca(OH)₂ vai Ca(OH)₂/Mg(OH)₂, pilienvaidā (~1 ml/min) pievieno 2 M H₃PO₄ (*puriss., Sigma-Aldrich*) līdz reakcijas maisījuma *pH*_{beigu} sasniegšanai, sintēzes maisījumu nepārtraukti mehāniski maisot un kontrolējot *T*;
- 5) iegūto nogulšņu nobriedināšana «mātes šķīdumā» (~20 h), filtrēšana, žāvēšana (105 °C, ~24 h) gaisa atmosfērā un sasmalcināšana piestā, iegūstot pulverveida materiālu, t. i., biokeramikas prekursoru pulveri.

2. Ar Mg modificētu CaP biokeramikas izgatavošana

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

Praktiski blīvas (turpmāk tekstā apzīmētas kā blīvas) ar Mg modificētu CaP biokeramikas pamatnes iegūtas, prekursoru pulverus uniaksiāli presējot ar spēku 10 kN cilindrveida formā ar diametru 10 mm, kam seko presķermeņu augsttemperatūras apstrāde (1100 °C, 1 h).

Porainas ar Mg modificētu CaP biokeramikas pamatnes iegūtas, izmantojot adaptētu *in situ* viskozas masas uzpūšanas metodi (uzpūšanas aģents – NH₄HCO₃, masas plastifikators – glicerīns) un iegūto zaļķermeņu augsttemperatūras apstrādi (1150 °C, 2 h) [7].

3. Sintēžu produktu fizikālķīmisko īpašību raksturošana

Sintēžu produktiem pirms un pēc augsttemperatūras apstrādes izvērtēta molekulārā struktūra, fāžu un ķīmiskais sastāvs, izmantojot, attiecīgi, Furjē transformācijas infrasarkanās spektrometriju (FT-IS; *Scimitar Series, Varian 800 FT-IR*), rentgendifraktometriju (RDA; *PANalytical X-Pert Pro*) un atomabsorbcijas spektroskopiju (AAS; *Varian SpectraAA880*).

Termiskās īpašības, kas ļauj prognozēt produktu fāžu tīrību pēc augsttemperatūras apstrādes, kā arī novērtēt Mg ietekmi uz CaP raksturīgajiem siltumefektiem un saķepšanas procesu, analizētas, izmantojot diferenciāļtermisko analīzi (DTA; *BÄHR Thermoanalyse DTA 703*) un augsttemperatūras mikroskopiju (ATM; *EMO-1750/30-K*).

Ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursoru pulveru morfoloģija un biokeramikas paraugu mikrostruktūra pētīta, izmantojot skenējošo elektronu mikroskopiju (SEM; *TESCAN Mira/LMU Schottky*). Prekursoru pulveru patiesais blīvums un īpatnējais virsmas laukums daļiņu vidējo izmēru (*d*_{BET}) aprēķināšanai noteikts, izmantojot piknometriju (PYC; *Micromeritics AccuPyc 1330*) un N₂ sorbtometriju (*Quantachrome QuadraSorb SI*) jeb Brunauera-Emeta-Tellera (BET) metodi.

Blīvu un porainu ar Mg modificētu CaP biokeramikas pamatņu porainība un blīvums noteikts saskaņā ar EN 993-1:1995 standarta metodi, kas balstīta uz Arhimēda likumu.

4. Biokeramikas *in vitro* pārbaudes

1) Šķīdības pētījumi

Ar Mg modificētu CaP biokeramikas šķīdības pētījumi veikti saskaņā ar EN ISO 10993-14:2001 standartu, eksperimentāli izvērtējot (Ca^{2+}) un (Mg^{2+}) jonu izdalīšanos no biokeramikas paraugiem TRIS-HCl buferšķīdumā, kompleksonometriski titrējot eksperimentālos šķīdumus ar 0,01 M EDTA. Pētījumā izmantots automātiskais titrators (*Metler Toledo*) un kalcija jonu selektīvais elektrods (Ca-ISE; *DX240 Ca-ISE*), kas ir jutīgs attiecībā pret (Ca^{2+}) un (Mg^{2+}) joniem.

2) Pētījumi simulētajā ķermeņa šķīdumā

Ar Mg modificētu CaP biokeramikas *in vitro* bioaktivitātes testi tika veikti saskaņā ar ISO 23317:2012. Paraugi tika izturēti simulētajā ķermeņa šķīdumā (SKŠ) 7 un 21 diennakti. Biomimētiska HAP slāņa formēšanās uz biokeramikas pamatņu virsmas tika novērtēta, izmantojot SEM mikrofotogrāfijas.

3) Citotoksicitātes novērtēšana šūnu kultūrās

Ar Mg modificētu HAP un β -TCP biokeramikas citotoksicitātes novērtēšana veikta, izmantojot osteoblastu šūnu līniju *MG63-GFP*. Katram paraugam uzsēts ~200 000 šūnu, un tie inkubēti ($36,5 \pm 0,5$) °C. Šūnu augšanas dinamika otrajā (pēc 48 h) un trešajā dienā (pēc 72 h) tika novērtēta vizuāli, izmantojot fluorescences mikroskopiju (*TESCAN Infinite 200[®]PRO*). Pēc 72 h ekspozīcijas dzīvo šūnu skaits noteikts, izmantojot DNS kvantificēšanas metodi (*Invitrogen CyQUANT[®] Cell Proliferation Assay Kit, C7026*). Pēc 72 h ekspozīcijas paraugi tika dehidratēti dažādas koncentrācijas etanola šķīdumu sērijās un žāvēti gaisā SEM mikrofotogrāfiju uzņemšanai.

Ar Mg modificētu BCP biokeramikas citotoksicitātes novērtēšana veikta, izmantojot osteogēno cilmes šūnu līniju *MC3T3-E1*. Katram paraugam uzsētas ~20 000 šūnu. Citotoksicitātes pētījumi veikti ($36,5 \pm 0,5$) °C un 5 % CO_2 . Ekspozīcijas laiks – 168 h, pēc 72 h ekspozīcijas šūnu vide tika atjaunota. Pēc 168 h ekspozīcijas dzīvo šūnu skaits noteikts, izmantojot kolorimetrisku analīzes metodi, kas nosaka šūnu dzīvotspēju, citostatisko aktivitāti, analizējot šūnu vielmaiņas aktivitāti jeb mērot šūnu spēju reducēt vitālo krāsvielu MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds, tiazolilzilais).

Pozitīvā «kontrolē» citotoksicitātes pētījumos – šūnu kultūru plate bez parauga.

REZULTĀTU IZVĒRTĒJUMS

1. Ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursoru raksturojums

Veiktas ar Mg modificētu CaP – HAp, CDHAp un ap-TCP – pulveru ar dabīgajam kaulam tuvu Mg saturu, t. i., ar Mg saturu līdz ~1 % (masas) [2], sintēzes. Patiesais Mg saturs iegūtajos sintēžu produktos noteikts, izmantojot AAS. Rezultāti izvērtēti, pamatojoties uz salīdzinājumu starp teorētisko un patieso Mg saturu sintēžu produktos, kas apkopots 1. tabulā.

1. tabula

Ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursoru pulveru teorētiskais un patiesais Mg saturs, daļiņu vidējais izmērs (d_{BET})

	Sintēžu produktu apzīmējums	Teorētiskais Mg saturs, % (masas)	Patiesais Mg saturs, % (masas)	d_{BET} , nm
HAp	HAp	0	$0,21 \pm 0,02$	22
	1.0 Mg-HAp	0,34	$0,43 \pm 0,09$	21
	2.0 Mg-HAp	0,68	$0,64 \pm 0,10$	21
	3.0 Mg-HAp	1,02	$0,83 \pm 0,19$	22
CDHAp	BCP (80/20)	0	$0,32 \pm 0,04$	28
	1.0 Mg-BCP (80/20)	0,34	$0,31 \pm 0,04$	27
	2.0 Mg-BCP (80/20)	0,68	$0,69 \pm 0,08$	26
	BCP (70/30)	0	$0,33 \pm 0,04$	28
	1.0 Mg-BCP (70/30)	0,34	$0,51 \pm 0,06$	27
	2.0 Mg-BCP (70/30)	0,68	$0,75 \pm 0,09$	23
	BCP (60/40)	0	$0,28 \pm 0,04$	32
	1.0 Mg-BCP (60/40)	0,34	$0,36 \pm 0,04$	32
ap-TCP	2.0 Mg-BCP (60/40)	0,68	$0,64 \pm 0,08$	29
	β -TCP	0	$0,25 \pm 0,03$	24
	1.0 Mg- β -TCP	0,34	$0,32 \pm 0,04$	23
	2.0 Mg- β -TCP	0,68	$0,56 \pm 0,08$	21
	3.0 Mg- β -TCP	1,02	$0,67 \pm 0,08$	20

Neatkarīgi no (Ca + Mg)/P molārās attiecības sintēzes izejas suspensijā Mg saturs CaP prekursora pulveros pieaug līdz ar «Mg» avota koncentrācijas palielināšanu sintēzes vidē. Sintēžu produktos, kas pagatavoti bez papildus (Mg^{2+}) jonu avota pievienošanas izejas suspensijā, izmērītā Mg koncentrācija (līdz $(0,33 \pm 0,04)$ % (masas)) radusies no MgO piemaisījumiem komerciālajā CaO. 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.

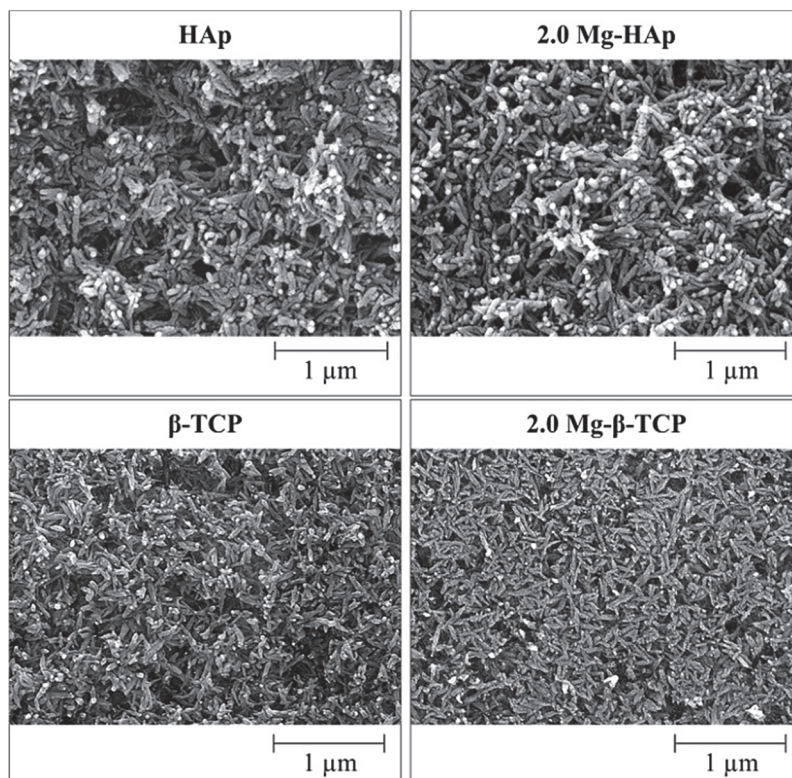
Fāžu sastāva analīze balstīta uz RDA ainās identificēto maksimumu atbilstību raksturīgajiem HAp maksimumiem 2θ robežās no 10° līdz 60° . Detektēto maksimumu,

dupletu vai tripletu analīze sniedz informāciju par sintēžu produktu fāžu tīrību, kristāliskuma pakāpi, kā arī kristālitu izmēriem. Saskaņā ar Starptautiskā difrakcijas datu centra datubāzes PDF-2/2005 ieraksta Nr. 01-072-1243 datiem, visi biokeramikas prekursoru pulveri uzrāda nanokristāliskas rentģentīras HAp fāzes raksturīgas RDA ainas, par ko liecina relatīvi zemas intensitātes, plati RDA maksimumi (skat. 3. attēlu) [8].

3. attēls. Ar Mg modificēta ap-TCP, CDHAp un HAp RDA ainas.

Tādas biokeramikas fizikālķīmiskās īpašības kā porainība, graudu forma, izmēri u. c., kas ir noteicošas bioloģisko īpašību novērtēšanā, ir atkarīgas no prekursoru pulveru morfoloģijas, t. i., daļiņu izmēra, formas un aglomerācijas, jo tās ietekmē saķepšanu un graudu sablīvēšanās procesus. Tika aprēķināti sintēžu produktu jeb biokeramikas prekursoru pulveru daļiņu vidējie izmēri (skat. 1. tabulu) un pētīta to morfoloģija, t. i., daļiņu forma un aglomerācija (skat. 4. attēlu). Vizuāli novērtējot, var secināt, ka neatkarīgi no $(Ca + Mg)/P$ molārās attiecības izejas suspensijā iegūtie ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursoru pulveri sastāv no garenas formas (adatveida) daļiņām, primārajiem un/vai sekundārajiem aglomerātiem, kuru dimensijas, t. i., garums, ir diapazonā no 150–200 nm, un platums – no 25–50 nm. Visi produkti ir aglomerētā stāvoklī, kas neļauj viennozīmīgi spriest par individuālu daļiņu raksturīgajām iezīmēm. N_2 sorbtometrijas mērījumu rezultāti liecina, ka, palielinoties Mg saturam prekursoru pulveros, pieaug to īpatnējais virsmas laukums un attiecīgi samazinās daļiņu vidējais

izmērs (d_{BET}) (skat. 1. tabulu). Rezultāti korelē ar teoriju, kas nosaka, ka daļēja Ca aizstāšana ar Mg HAp struktūrā izsauc kristāliskā režģa deformāciju, respektīvi, Mg satura pieaugums izraisa kristālītu samazināšanos [9].



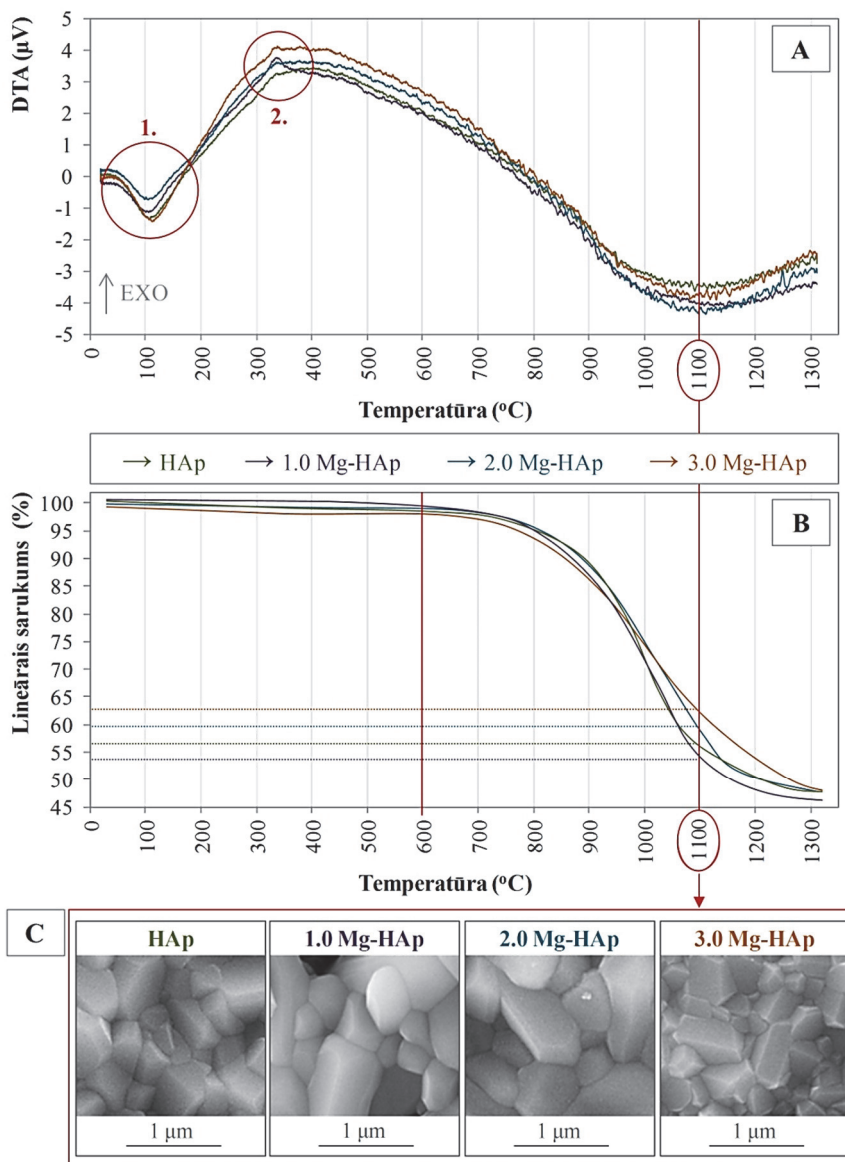
4. attēls. Ar Mg modificētu CaP biokeramikas prekursoru pulveru SEM mikrofotogrāfijas.

Pakļaujot biokeramikas prekursoru, t. i., ar Mg modificēta HAp, CDHAp un ap-TCP, presķermeņus augsttemperatūras apstrādei (1100 °C, 1 h), iegūtas attiecīgi ar Mg modificēta HAp, BCP un β-TCP biokeramikas pamatnes, kas izmatotas *in vitro* pārbaudēm bioloģisko īpašību novērtēšanai. 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. Tādas biokeramikas īpašības kā šķīdība jeb jonu izdalīšanās, *in vitro* bioaktivitāte un citotoksicitāte jeb šūnu atbildes reakcija ietekmē nākamajās apakšnodaļās izvērtētais eksperimentālo paraugu ķīmiskais un fāžu sastāvs, kā arī mikrostruktūras iezīmes. Saķepšanas procesa izpētei ar Mg modificētu CaP prekursoru pulveriem veikti dilatometriskie pētījumi. Eksperimentālie paraugi tika analizēti, izmantojot ATM.

2. Ar Mg modificēta HAp biokeramikas raksturojums

Ar Mg modificētu HAp termiskās stabilitātes pētījumos eksperimentāli iegūtajās DTA raksturlīknēs (skat. 5. attēlu (A)) līdz 1350 °C iezīmējas šādi siltumefekti:

- endotermisks efekts, t. i., siltumefekts Nr. 1, temperatūras intervālā no ~ 50 °C līdz ~ 200 °C attiecināms uz adsorbētā H_2O un CO_2 aizvadīšanu;
- eksotermisks efekts pie ~ 350 °C, t. i., siltumefekts Nr. 2 norāda uz HAp fāzes kristalizēšanos.



5. attēls. Ar Mg modificēta HAp: A – DTA līknes, B – dilatometriskās līknes, C – SEM mikrofotogrāfijas pēc augsttemperatūras apstrādes 1100 °C 1 h.

Saskaņā ar literatūrā publicētajiem datiem, HAp termiskā stabilitāte pazeminās līdz ar Mg satura pieaugumu [10]. Tomēr 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 $(0,83 \pm 0,19) \%$ (masas) ir termiski stabils līdz 1350°C . Jāņem vērā, ka neliela β -TCP satura gadījumā pārejas HAp $\rightarrow$ β -TCP intensitāte var nebūt pietiekami augsta, lai izraisītu siltumefektu, kas iezīmētos DTA raksturlīknēs, tādēļ, lai apstiprinātu biokeramikas fāžu tīrību, papildus veikta augsttemperatūrā apstrādātu (1100°C , 1h) sintēžu produktu fāžu sastāva analīze (skat. 6. attēlu).

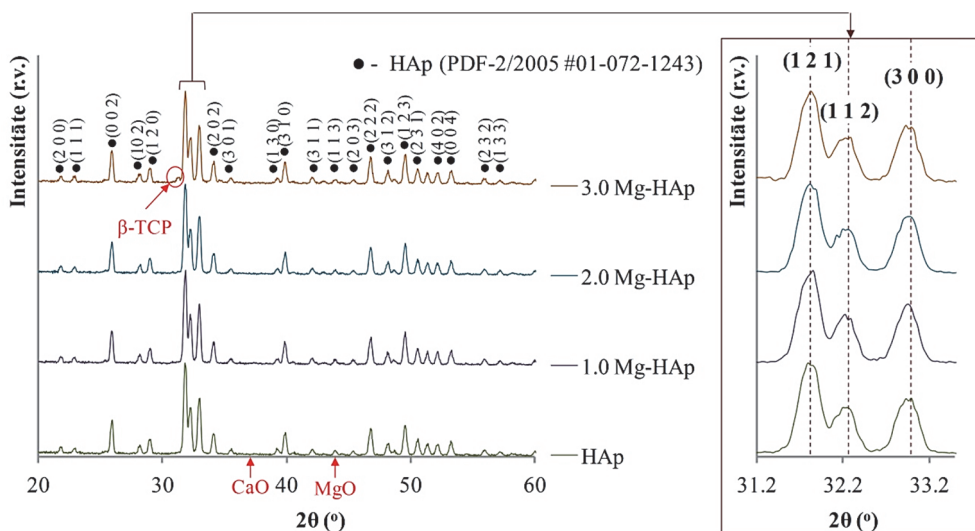
HAp paraugu saķepšanas process visos gadījumos, t. i., neatkarīgi no Mg satura, sākas $\sim 600^\circ\text{C}$, un intensīvākā saķepšana jeb straujākais sarukums novērojams temperatūras intervālā no $\sim 950^\circ\text{C}$ līdz $\sim 1050^\circ\text{C}$ (skat. 5. attēlu (B)). Jāatzīmē, ka HAp produktu gadījumā pie 1100°C tiek sasniegts 45–50 % lineārais sarukums. Savukārt augsttemperatūrā apstrādātu pamatņu SEM mikrofotogrāfijas liecina, ka Mg satura pieaugums veicina heterogēna izmēra un formas graudu veidošanos (skat. 5. attēlu (C)). Ņemot vērā, ka ar vairākus ar Mg modificēta HAp biokeramikas pamatņu mikrostruktūras iezīmes, t. sk. blīvuma un kopējās porainības mērījumu rezultāti, kas apkopoti 2. tabulā, kļūdu robežās sakrīt, var pieņemt, ka tās praktiski neietekmēs *in vitro* pārbažu rezultātus.

2. tabula

Blīvu ar Mg modificēta HAp biokeramikas pamatņu blīvums un kopējā porainība

Parauga apzīmējums	Blīvums, g/cm^3	Kopējā porainība, %
HAp	$2,86 \pm 0,06$	$9,50 \pm 1,77$
1.0 Mg-HAp	$2,68 \pm 0,06$	$15,24 \pm 1,98$
2.0 Mg-HAp	$2,59 \pm 0,06$	$18,07 \pm 5,18$
3.0 Mg-HAp	$2,31 \pm 0,08$	$27,05 \pm 2,65$

Veicot ar Mg modificēta HAp biokeramikas fāžu sastāva analīzi, konstatēts, ka izejmateriālu, t. i., CaO un MgO, kas varētu pasliktināt biokeramikas biosaderību, raksturīgie maksimumi nevienā no RDA ainām nav detektēti. Tas ļauj secināt, ka minētie piemaisījumi nepastāv vai to koncentrācija produktos ir zem RDA metodes detektēšanas robežas, t. i., < 2 masas % (skat. 6. attēlu). Tādējādi ar Mg modificēta HAp biokeramikas fāžu sastāva analīze apliecina, ka kopējais blakusfāžu, t. i., CaO un MgO, saturs ir mazāks nekā 5 % (masas), izpildot ISO 137790-3 standarta fāžu tīrības prasības CaP implantmateriāliem. Ar Mg modificēta HAp biokeramikas RDA ainās identificētie maksimumi pilnībā atbilst rentģentūrai HAp fāzei, ja Mg saturs nepārsniedz $(0,64 \pm 0,10) \%$ (masas). Kā redzams 6. attēlā, Mg saturam produktos sasniedzot $(0,83 \pm 0,19) \%$ (masas) (3.0 Mg-HAp), pēc augsttemperatūras apstrādes (1100°C , 1 h) uzņemtajās RDA ainās detektēti gan HAp fāzes raksturīgie maksimumi, gan β -TCP fāzes raksturīgais maksimums pie $2\theta \sim 31^\circ$, kas liecina par β -TCP un/vai ar Mg-aizvietota β -TCP (vitlokīta) fāzes klātbūtni 3.0 Mg-HAp biokeramikā. β -TCP/vitlokīta fāžu klātbūtne liecina, ka modificēšana ar Mg noteiktā koncentrācijā veicina HAp termiskās stabilitātes pazemināšanos, kas korelē ar literatūras datiem [10].



6. attēls. Ar Mg modificēta HAp biokeramikas RDA ainas.

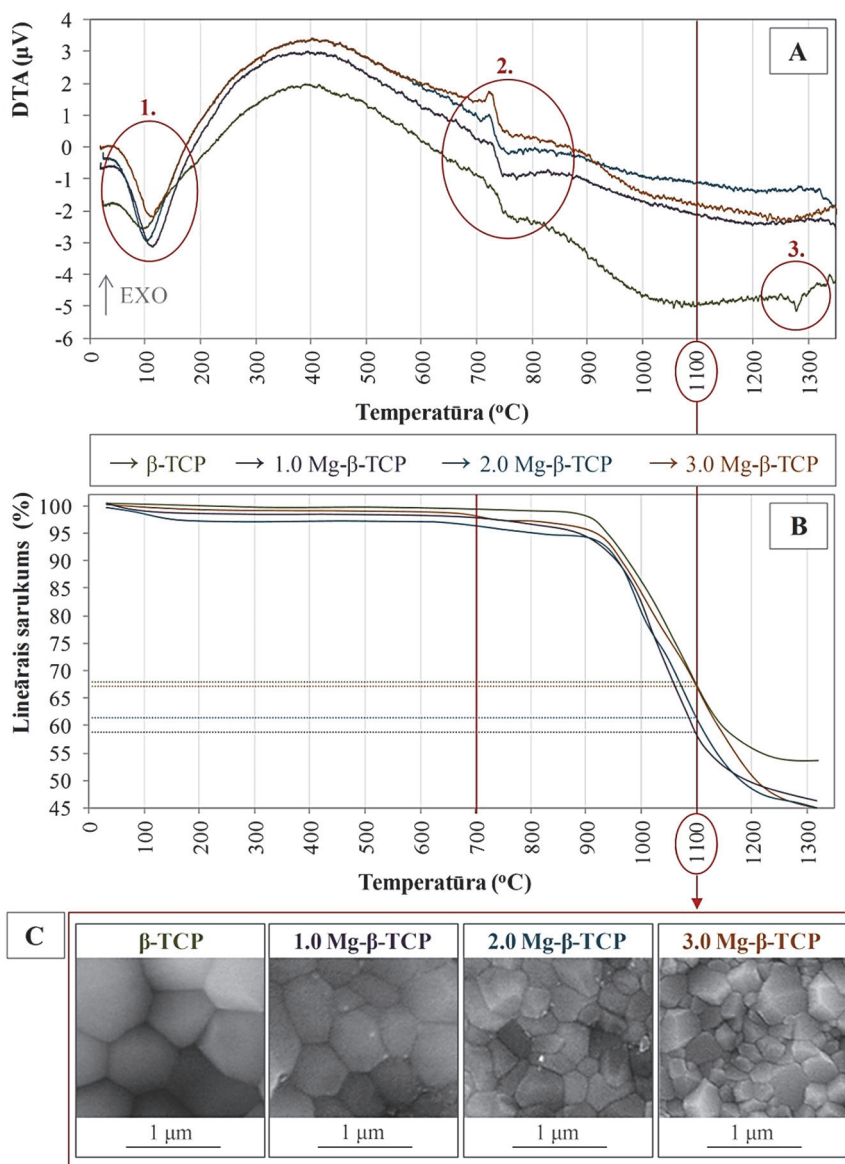
3. Ar Mg modificēta β -TCP biokeramikas raksturojums

Ar Mg modificēta ap-TCP DTA līknēs (skat. 7. attēlu (A)) detektētie siltumefekti:

- endotermiskais efekts, t. i., siltumefekts Nr. 1, temperatūras intervālā no ~ 50 °C līdz ~ 200 °C attiecināms uz adsorbētā atmosfēras H_2O un CO_2 aizvadišanu;
- siltumefekti Nr. 2, t. i., efekti temperatūras intervālā no ~ 700 °C līdz ~ 800 °C attiecināmi uz ap-TCP transformāciju uz β -TCP fāzi. DTA līknēs transformācija ap-TCP $\rightarrow$ β -TCP iezīmējas kā eksotermiska reakcija, kam seko tūlītēja endotermiska reakcija. Līdz ar Mg satura pieaugumu ap-TCP paraugos pieaug eksotermiskā efekta intensitāte, kas saskaņā ar *Combes et al.* teoriju nosaka, ka tiek veicināta zema kristāliskuma un/vai amorfas komponentes formēšanās, kuras kristalizēšanās rezultātā rodas attiecīgais efekts pie ~ 720 °C. Turklāt starp eksotermiskā efekta intensitāti un zema kristāliskuma un/vai amorfas komponentes saturu pastāv tieši proporcionāla sakarība. Tādējādi secināms, ka Mg satura pieaugums veicina zema kristāliskuma un/vai amorfas fāzes veidošanos ap-TCP pulveros [11];
- endotermisks efekts pie ~ 1280 °C, t. i., siltumefekts Nr. 3, rodas $\beta \rightarrow \alpha$ -TCP polimorfās modifikācijas pārejas rezultātā. Pieaugot Mg saturam līdz $(0,67 \pm 0,08)$ % (masas), parēja β -TCP $\rightarrow$ α -TCP DTA raksturlīknēs netiek detektēta, kas liecina, ka Mg stabilizē β -TCP, un polimorfā pārvērtība notiek ≥ 1350 °C.

Ap-TCP produktu gadījumā saķepšanas procesa sākums detektēts ~ 700 °C, un straujākais sarukums – no ~ 950 °C līdz ~ 1150 °C (skat. 7. attēlu (B)). Ap-TCP gadījumā līdz ar Mg saturu ievērojami pieaug eksperimentālo paraugu lineārais sarukums, respektīvi, saķepšana norit pilnīgāk (β -TCP – ~ 45 %; 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 β -TCP $\rightarrow$ α -TCP pāreju ~ 1280 °C, veidojoties divkomponenšu sistēmai, kas kavē graudu sablīvēšanos komponentu dažādo saķepšanas procesu, kā arī graudu izmēru un formas atšķirību dēļ. Jāatzīmē, ka ap-TCP produktu gadījumā pie 1100 °C tiek sasniegts 35–45 %

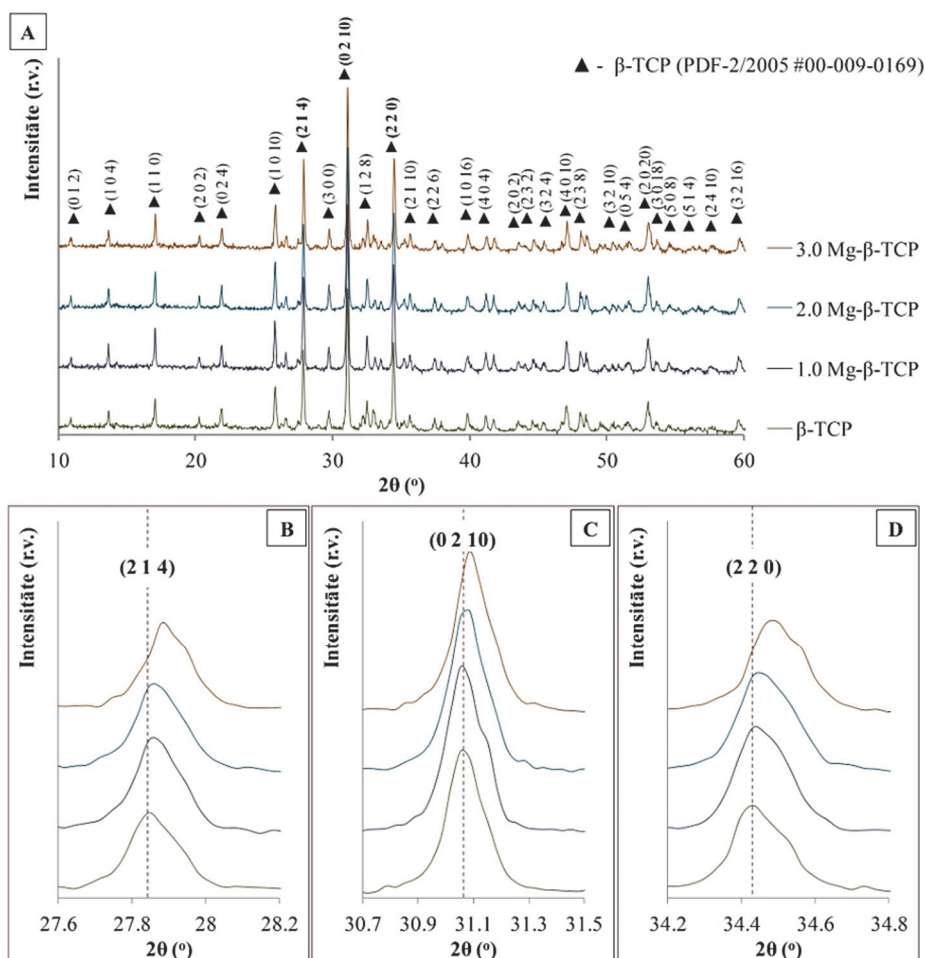
lineārais sarukums. Savukārt ar Mg modificēta β -TCP biokeramikas paraugu SEM virsmas mikrofotogrāfijās (skat. 7. attēlu (C)) redzams, ka Mg satura pieaugums ievērojami kavē β -TCP graudu augšanu un veicina graudu vidējo izmēru pazemināšanos no ($1,4 \pm 0,5$) μm (β -TCP) līdz ($0,5 \pm 0,1$) μm (3.0 Mg- β -TCP).



7. attēls. Ar Mg modificēta β -TCP: A – DTA līknes, B – dilatometriskās līknes, C – SEM mikrofotogrāfijas pēc augsttemperatūras apstrādes 1100 $^{\circ}\text{C}$ 1 h.

Blīvu ar Mg modificēta β -TCP biokeramikas pamatņu blīvums un kopējā porainība

Parauga apzīmējums	Blīvums, g/cm ³	Kopējā porainība, %
β -TCP	$2,71 \pm 0,02$	$14,36 \pm 2,20$
1.0 Mg- β -TCP	$2,86 \pm 0,04$	$9,47 \pm 1,57$
2.0 Mg- β -TCP	$2,93 \pm 0,06$	$7,14 \pm 1,20$
3.0 Mg- β -TCP	$2,94 \pm 0,07$	$6,92 \pm 0,68$



8. attēls. Ar Mg modificēta β -TCP biokeramikas RDA ainas.

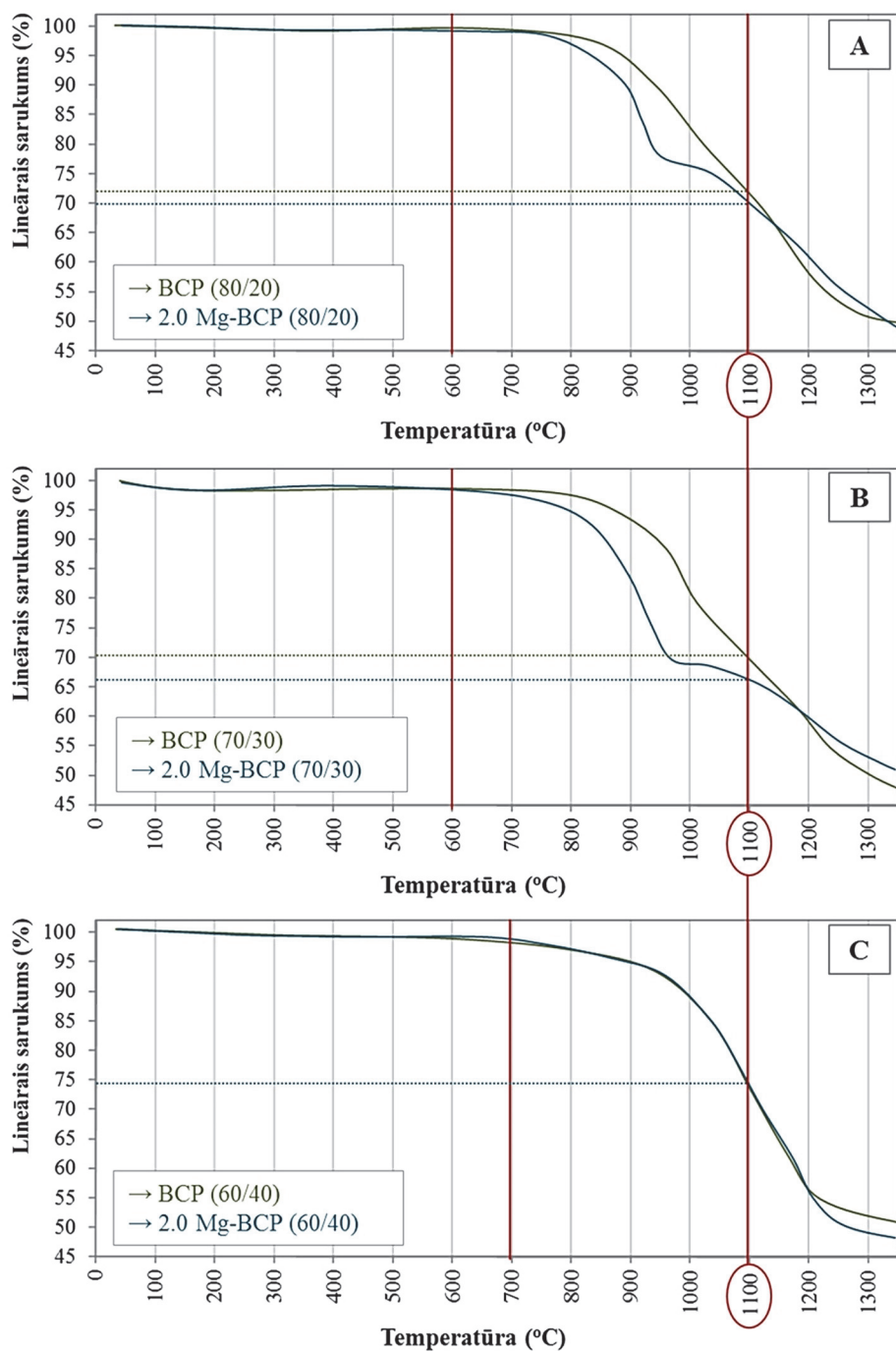
Saskaņā ar Arhimēda metodes mērījumu rezultātiem, kas apkopoti 3. tabulā, palielinoties Mg saturam, pazeminās β -TCP biokeramikas kopējā porainība un attiecīgi pieaug blīvums. Šis novērojums saistīts ar prekursora daļiņu efektīvāku sablīvēšanos. Ņemot vērā, ka Mg satura pieaugums izraisa ar Mg modificēta ap-TCP daļiņu izmēru pazemināšanos, tādējādi palielinās kontaktvirsmas starp pulvera daļiņām, kas veicina to sablīvēšanos augsttemperatūras apstrādes laikā [12].

Saskaņā ar Starptautiskā difrakcijas datu centra datubāzes PDF-2/2005 ieraksta Nr. 00-009-0169 datiem, ar Mg modificēta β -TCP biokeramikas RDA ainas (skat. 8. attēlu) liecina par rentģentīras 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 ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$), kā arī izejvielu, t. i., CaO un/vai MgO, un MgP piemaisījumiem, tādējādi tiek izpildītas ISO 137790-3 prasības CaP implantmateriāliem. Līdz ar Mg satura pieaugumu biokeramikas paraugos novērojamas RDA maksimumu nobīdes augstāku 2θ vērtību virzienā (skat. 8. attēlu (B, C, D)), kas, balstoties uz literatūrā pieejamo informāciju, liecina par kristālu izmēru samazināšanos un apstiprina Mg iekļaušanos β -TCP struktūrā, izsaucot kristāliskā režģa deformāciju [13].

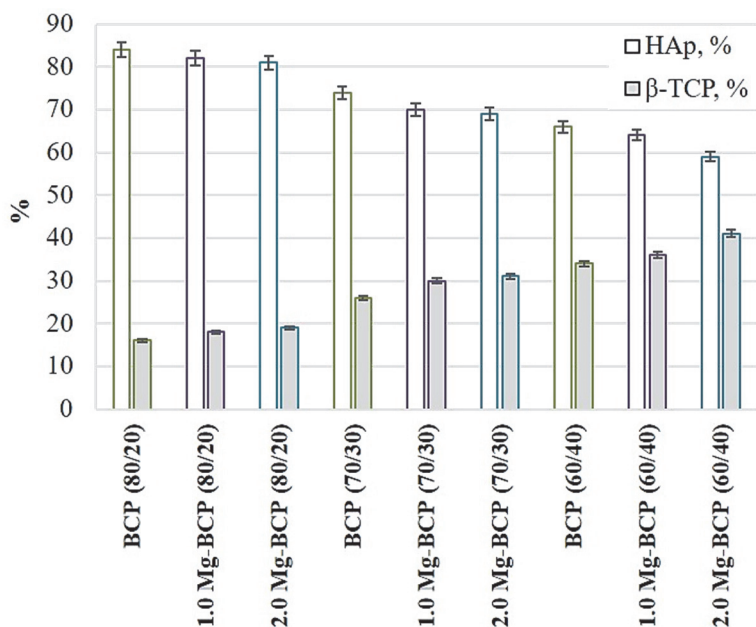
4. Ar Mg modificētu BCP biokeramikas raksturojums

Saķepšanas procesa pētījumos, mainoties (Ca + Mg)/P molārajai attiecībai un Mg saturam, ar Mg modificēta CDHAp produktu dilatometriskajos pētījumos tika novērotas būtiskas atšķirības (skat. 9. attēlu). Produktu ar (Ca + Mg)/P molāro attiecību 1,63 un 1,61 dilatometriskajās līknēs līdz ar Mg satura pieaugumu detektēts divpakāpju saķepšanas process (skat. 9. attēlu (A, B)). Pirmais etaps, kas sasniedz maksimumu pie $\sim 950^\circ\text{C}$, atbilst mazāko daļiņu, t. i., zema kristāliskuma un/vai amorfas komponentes, termodinamiski izdevīgāka stāvokļa ieņemšanai. Tas pārklājas ar otro etapu, kas atbilst pamata saķepšanas procesam. Pie 1100°C visi CDHAp produkti sasniedz $(30 \pm 5)\%$ sarukumu.

Ar Mg modificētu BCP biokeramikas paraugu RDA analīze apstiprināja, ka ar Mg modificēta CDHAp prekursoru ar dažādu teorētisko (Ca + Mg)/P molāro attiecību augsttemperatūras apstrāde (1100°C , 1 h) veicina divfāžu maisījuma, kas satur HAp un β -TCP fāzes dažādās attiecībās, veidošanos (skat. 10. attēlu). β -TCP fāzes pieaugums attiecībā pret HAp saturu ir tieši proporcionāls Ca-deficīta pakāpei prekursora pulveros. Turklāt konstatēts, ka Mg satura pieaugums BCP biokeramikas paraugos izraisa relatīvi nelielu β -TCP fāzes raksturīgo RDA maksimumu intensitāšu pieaugumu, kas saskaņā ar 10. attēlā atspoguļotajiem fāžu sastāva aprēķinu rezultātiem liecina par β -TCP fāzes satura pieaugumu. Tas skaidrojams ar tendenci, ka, Mg iekļaujoties kristāliskajā struktūrā, tiek destabilizēta HAp fāze, veicinot tās daļēju transformāciju uz β -TCP un sekmējot divfāžu keramikas, proti, BCP, veidošanos *in situ* [10].



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



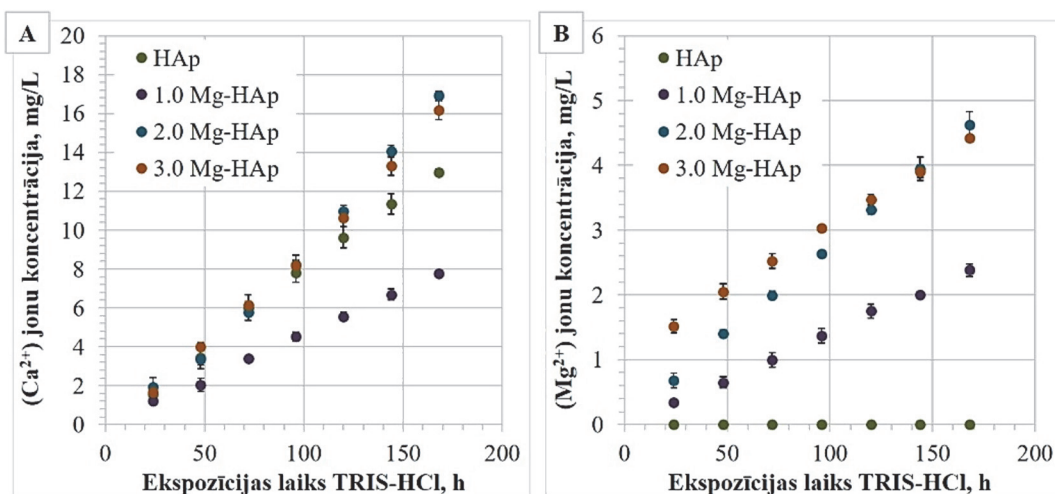
10. attēls. Ar Mg modificētu BCP biokeramikas HAp un β-TCP procentuālais saturs pēc augsttemperatūras apstrādes 1100 °C, 1 h.

5. Ar Mg modificētu CaP biokeramikas šķīdības, *in vitro* bioaktivitātes un citotoksicitātes pētījumi

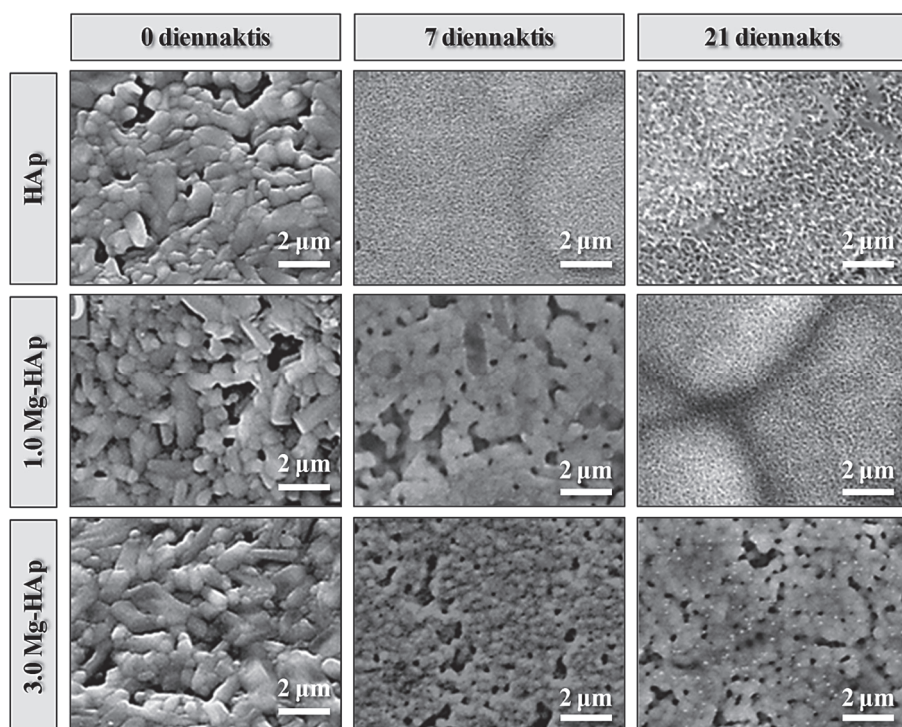
Ar Mg modificētu CaP biokeramikas bioloģiskās īpašības ir atkarīgas ne tikai no Mg satura biokeramikā, bet arī no šķīdības, proti, spējas atbrīvot (Ca^{2+}) un (Mg^{2+}) jonus. Ar Mg modificētu CaP biokeramikas šķīdības pētījumi tika veikti, izturot paraugus TRIS-HCl buferšķīdumā, ik pēc 24 h atjaunojot buferšķīdumu un mērot izdalīto jonu koncentrācijas eksperimentālajos šķīdumos. Šķīdības testu rezultāti prezentē sākotnējās biokeramikas šķīšanas tendences *in vivo* nevis precīzas izdalīto jonu koncentrācijas. Pētījums atspoguļo viedokli par to, ka biokeramikas šķīšana *in vivo* nenotiek konstantā tilpumā, t. i., atbrīvotie joni tiek transportēti prom no implantēšanas vietas ar ķermeņa šķidrumu plūsmu [14].

Likumsakarīgi, līdz ar Mg satura pieaugumu biokeramikā palielinās (Mg^{2+}) jonu koncentrācija eksperimentālajos šķīdumos pēc HAp biokeramikas pamatņu izturēšanas (skat. 11. attēlu (B)). Rezultāti liecina, ka modificēšana ar Mg uzlabo HAp fāzes šķīdību, t. i., palielinās kopējais izdalīto (Ca^{2+}) un (Mg^{2+}) jonu daudzums laika vienībā.

SĶŠ izmanto kā efektīvu bioaktivitātes novērtējuma metodi *in vitro* – biomimētiska HAp slāņa veidošanās spējas novērtēšanai uz analizējamā implantmateriāla virsmas mijiedarbībā ar SĶŠ šķīdumu ar mērķi prognozēt to bioaktivitāti *in vivo* [14, 15]. Biomimētisks HAp gan pēc sastāva, gan struktūras ir līdzīgs bioloģiskajam HAp kaulos un līdz ar to nodrošina uzlabotu dzīvo audu un implantmateriāla sasaisti.



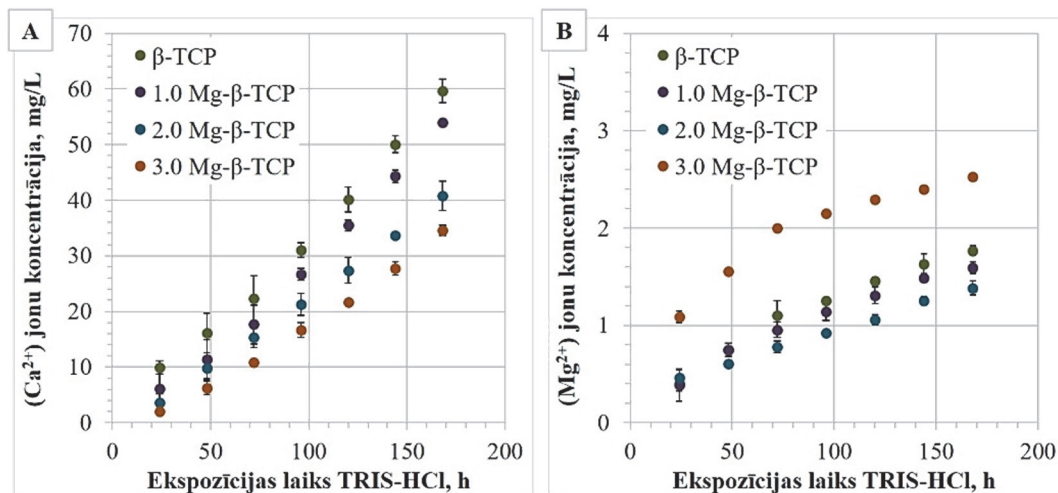
11. attēls. A – (Ca²⁺) jonų un B – (Mg²⁺) jonų izdalīšanās no ar Mg modificēta HAp biokeramikas.



12. attēls. Ar Mg modificēta HAp biokeramikas paraugu virsmas SEM mikrofotogrāfijas pirms un pēc ekspozīcijas SKŠ 7 un 21 diennakti.

In vitro testos SKŠ biokeramikas bioaktivitātes novērtēšanai konstatēts, ka biomimētiska HAp slāņa izgulsnēšanās uz paraugu virsmas tiek kavēta (Ca^{2+}) un (Mg^{2+}) jonu izdalīšanās rezultātā no HAp biokeramikas. SEM mikrofotogrāfijās (skat. 12. attēlu) redzams, ka pēc izturēšanas SKŠ 7 diennaktis HAp biokeramikas, kas pagatavota bez papildu (Mg^{2+}) jonu avota pievienošanas sintēzes vidē, virsmu klāj jauna materiāla, proti, biomimētiska HAp slānis, kam raksturīga sferulītu morfoloģija, kas sastāv no plākšņveida kristalītiem. Uz pārējām ar Mg modificēta HAp biokeramikas pamatņu virsmām ir sākusies jaunā materiāla formēšanās, tomēr tā norit ievērojami lēnāk, salīdzinot ar HAp pamatnēm. Pēc izturēšanas SKŠ 21 diennakti uz HAp biokeramikas virsmas turpinās slāņa augšana, respektīvi, ir novērojama biomimētiska HAp kristalītu augšana. Pēc 21 diennakts biomimētiska HAp plākšņveida kristalīti ir novērojami ne tikai uz HAp, bet arī uz 1.0 Mg-HAp biokeramikas pamatņu virsmas. Savukārt uz 3.0 Mg-HAp pamatņu virsmas biomimētiska HAp kristalīti nav formējušies pat pēc izturēšanas SKŠ 21 diennakti. Tomēr konstatēts, ka pamatņu virsmas mikrostrukturā vairs nav skaidri izšķirama, to klāj amorfa materiāla slānis. Līdz ar to var secināt, ka arī uz 3.0 Mg-HAp biokeramikas virsmas ir sākusies jaunā materiāla slāņa formēšanās. Turklāt saskaņā ar kristalizācijas teoriju amorfs CaP (ACP) ir HAp prekursora fāze, un, ņemot vērā eksperimentālo šķīdumu ķīmisko sastāvu, var pieņemt, ka izgulsnējies slānis ir CaP. HAp fāze ir stabilākā no CaP pH, kas ir tuvs fizioloģiskai videi. Tādējādi, zinot eksperimentālo šķīdumu pH ($7,40 \pm 0,05$) un SKŠ ķīmisko sastāvu, var secināt, ka tiek veicināta biomimētiska HAp slāņa izgulsnēšanās uz biokeramikas virsmas [15].

Ar Mg modificēta β -TCP biokeramikas paraugu šķīdības pētījumos, kas atspoguļoti 13. attēlā, noskaidrots, ka (Ca^{2+}) un (Mg^{2+}) jonu izdalīšanās ir savstarpēji atkarīgas.

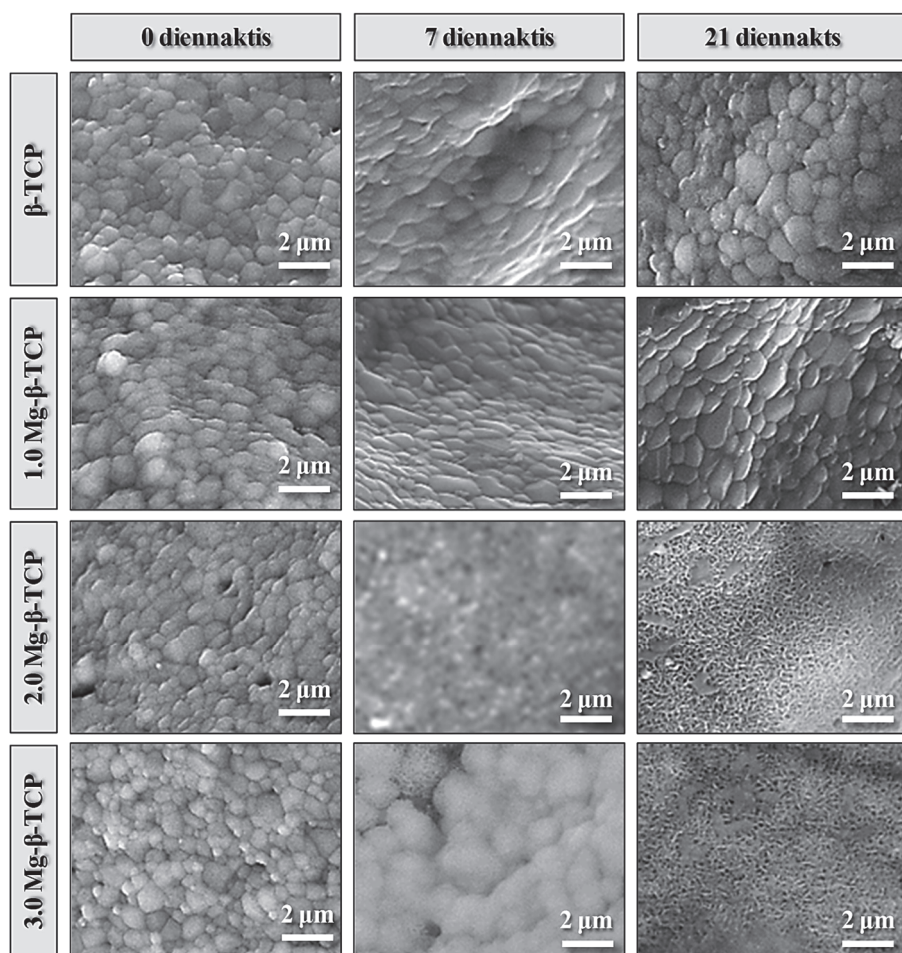


13. attēls. A – (Ca^{2+}) jonu un B – (Mg^{2+}) jonu izdalīšanās no ar Mg modificēta β -TCP biokeramikas.

Gan (Ca^{2+}), gan (Mg^{2+}) jonu izdalīšanās no β -TCP biokeramikas samazinās, pieaugot Mg saturam līdz ($0,56 \pm 0,08$) % (masas). Tas liecina par to, ka modificēšana ar Mg stabilizē β -TCP fāzi, respektīvi, pazemina tās šķīdību. Savukārt visstraujākā (Mg^{2+}) jonu

izdalīšanās novērojama paraugiem ar augstāko Mg saturu. Zinot, ka Ca atomu aizvietošana ar Mg CaP struktūrā ir ierobežota Ca (0,198 nm) un Mg (0,130 nm) atomu rādīšus starpības dēļ, var spriest, ka, sasniedzot $(0,67 \pm 0,08) \%$ (masas), Mg neieņem stabilu pozīciju β -TCP struktūrā, līdz ar to (Mg^{2+}) joni var tikt salīdzinoši vieglāk atbrīvoti [13].

Biomimētiska HAp slāņa nogulsnešanās uz β -TCP biokeramikas SKŠŠ tiek veicināta līdz ar Mg koncentrācijas pieaugumu biokeramikas paraugos (skat. 14. attēlu). Tas skaidrojams ar β -TCP biokeramikas paraugu zemāku šķīdību līdz ar Mg satura pieaugumu (skat. 13. attēlu). Respektīvi, jonu izdalīšanās ir samērojama ar biomimētiska HAp slāņa augšanu uz biokeramikas virsmas.

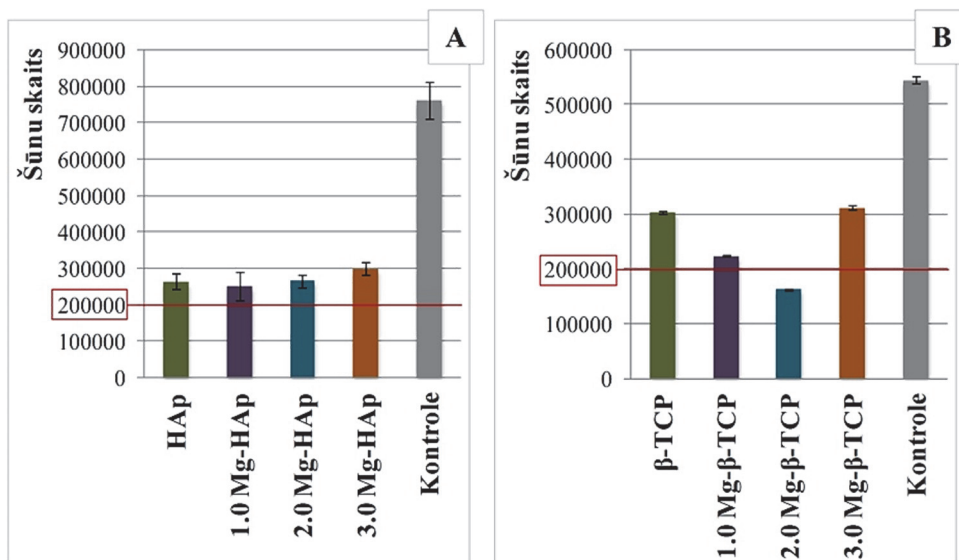


14. attēls. Ar Mg modificēta β -TCP biokeramikas paraugu virsmas SEM mikrofotogrāfijas pirms un pēc ekspozīcijas SKŠŠ 7 un 21 diennakti.

Darbā izvērtēta Mg modifikācijas ietekme uz šūnu aktivitāti un dzīvotspēju mijiedarbībā ar izstrādāto CaP biokeramiku.

Ar Mg modificēta HAp biokeramikas gadījumā neatkarīgi no Mg satura visām kompozīcijām novērota līdzīga osteoblastu *MG63-GFP* aktivitāte (skat. 15. attēlu (A)). Konstatēts, ka kultivējot osteoblastu *MG63-GFP* šūnas 72 h, dzīvo šūnu skaits ir zemāks nekā kontroles (šūnu kultūru plate bez parauga) gadījumā. Tomēr visās sērijās novērots šūnu skaita pieaugums, salīdzinot ar uzsēto šūnu skaitu, t. i., ~200 000. Līdz ar to var secināt, ka ar Mg modificēta HAp biokeramika nav citotoksiska un ir biosaderīga.

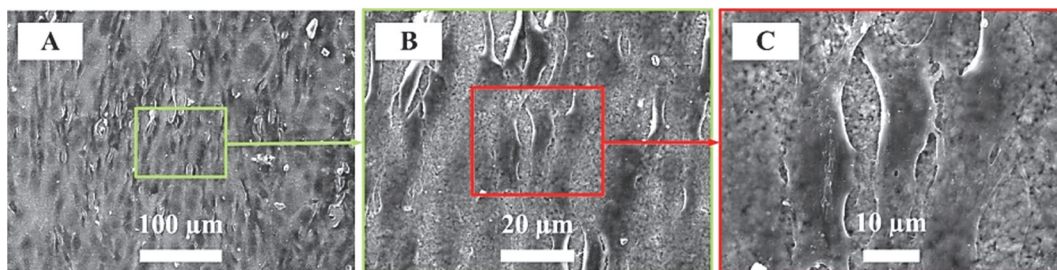
Ar Mg modificēta β -TCP biokeramika ir mēreni citotoksiska (skat. 15. attēlu (B)). β -TCP biokeramikas gadījumā novērojams osteoblastu *MG63-GFP* skaita pieaugums pēc 72 h ekspozīcijas, salīdzinot ar uzsēto šūnu skaitu, t. i., 200 000. Savukārt 1.0 Mg- β -TCP biokeramikas paraugu gadījumā pēc 72 h ekspozīcijas 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.



15. attēls. Dzīvu osteoblastu *MG63-GFP* šūnu skaits pēc A – ar Mg modificēta HAp un B – ar Mg modificēta β -TCP biokeramikas 72 h ekspozīcijas šūnu kultūrā.

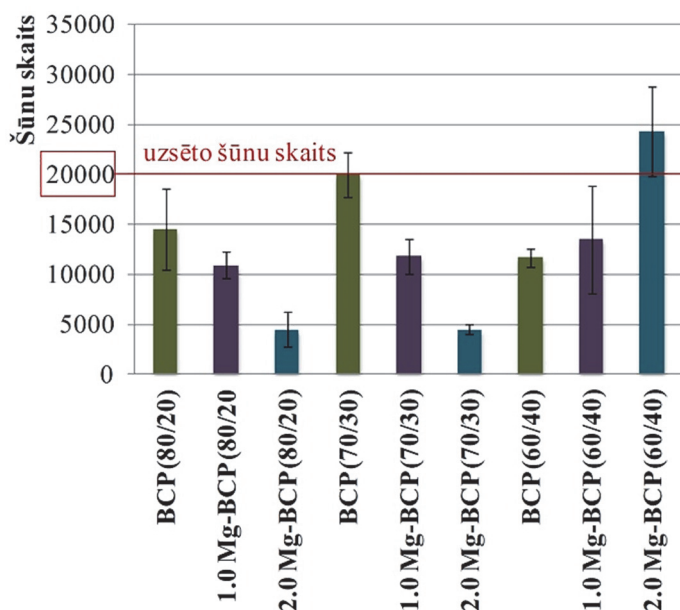
Šķīdības pētījumos konstatēts, ka gan ar Mg modificēta HAp, gan β -TCP biokeramikas gadījumā paraugiem ar augstāko Mg saturu pieaug izdalīto (Mg^{2+}) jonu koncentrācija. Ņemot vērā, ka HAp un β -TCP biokeramikas sērijās paraugi ar visaugstāko Mg saturu uzrāda visvairāk dzīvo šūnu kultūrās pēc 72 h ekspozīcijas,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

SEM mikrofotogrāfijās (skat. 16. attēlu) redzams, ka osteoblasti *MG63-GFP* ir piesaistījušies pie ar Mg modificēta CaP biokeramikas paraugu virsmas, izstiepjot filopodijus un veidojot izstieptu trīsstūrveida morfoloģiju. Ņemot vērā, ka šūnu-biokeramikas virsmas mijiedarbība neatkarīgi no attiecīgo paraugu mikrostruktūras iezīmēm saglabājās gandrīz nemainīga visām nemodificētu un ar Mg modificētu CaP biokeramikas paraugu sērijām, var secināt, ka galvenais pētīto materiālu citosaderību ietekmējošais faktors ir jonu atbrīvošana jeb šķīdība šūnu kultūru vidē.



16. attēls. Osteoblastu *MG63-GFP* morfoloģija uz ar Mg modificētas CaP biokeramikas virsmas dažādā palielinājumā (A – 500, B – 2000 un C – 5000 reizes).

Izvērtējot Mg satura un HAp/ β -TCP fāžu attiecību kombināciju ietekmi uz osteogēno cilmes šūnu *MC3T3-E1* aktivitāti mijiedarbībā ar iegūto biokeramiku, konstatēts, ka paraugi pēc 168 h ekspozīcijas šūnu kultūrās uzrāda mērenu citotoksicitāti (skat. 17. attēlu). Pie augstāka HAp satura labāka šūnu dzīvotspēja novērojama BCP biokeramikai, kas satur Mg zemākā koncentrācijā. Savukārt β -TCP saturam sasniedzot 40 %, līdz ar Mg satura pieaugumu novērojama uzlabota šūnu aktivitāte.



17. attēls. Dzīvu osteogēno cilmes šūnu *MC3T3-E1* skaits pēc ar Mg modificētu BCP biokeramikas 168 h ekspozīcijas šūnu kultūrā.

SECINĀJUMI

1. Sistemātisku pētījumu rezultātā pierādīts, ka, izmantojot ķīmiskās suspensijas nogulsņēšanas 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 $(0,83 \pm 0,19) \%$ (masas) pazemina hidroksilapatīta termisko stabilitāti, sekmējot daļēju fāzes transformāciju uz β -trikalcija fosfātu. Salīdzinoši neliels magnija satura pieaugums robežās no $(0,25 \pm 0,03) \%$ (masas) līdz $(0,67 \pm 0,08) \%$ (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 trikalcijs fosfāta pulveros veicina īpatnējā virsmas laukuma pieaugumu par $(9 \pm 2) \%$ un attiecīgi daļiņu vidējā izmēra pazemināšanos, 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 pazemināšanos no $(1,4 \pm 0,5) \mu\text{m}$ (nemodificēta β -trikalcija fosfāta biokeramika) līdz $(0,5 \pm 0,1) \mu\text{m}$ (ar $(0,67 \pm 0,08) \%$ (masas) magnija modificēta β -trikalcija fosfāta biokeramika).
4. *In vitro* bioaktivitāte jeb biomimētiska hidroksilapatīta slāņa nogulsņēšanās uz ar magniju modificētas hidroksilapatīta un β -trikalcija fosfāta biokeramikas virsmas simulētajā ķermeņa šķīdumā atkarīga no magnija satura biokeramikas paraugos. Hidroksilapatīta biokeramikas gadījumā magnija satura pieaugums kavē biomimētiska hidroksilapatīta slāņa nogulsņēšanos, kas saistīts ar magnija modifikācijas izraisītu hidroksilapatīta fāzes šķīdības palielināšanos. Biomimētiska hidroksilapatīta slāņa nogulsņēšanās 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 $(0,67 \pm 0,08) \%$ (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 $(0,64 \pm 0,08) \%$ (masas) divfāžu kalcija fosfātu biokeramikas paraugos ievērojami uzlabo osteogēno cilmes šūnu aktivitāti, salīdzinot ar biokeramikas paraugiem ar zemāku β -trikalcija fosfāta saturu un analoģu magnija saturu.

LITERATŪRAS SARAKSTS

- [1] Habraken W., Habibovic P., Epple M., Bohner M. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future?// *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] 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.
- [4] LeGeros R. Z. Calcium phosphates in oral biology and medicine// *Monographs in Oral Science*. – 1990. – Vol. 15. – 1.–201. p.
- [5] 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 Materials Research Part B*. – 2014. – Vol. 102. – 1316.–1331. p.
- [6] Šalma-Ancāne K. Kalcija fosfātu sintēzes parametru ietekme uz biokeramikas īpašībām. Promocijas darba kopsavilkums. – Rīga: RTU, 2011. – 29 lpp.
- [7] Locs J., Zalīte 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Combes C., Rey C. Amorphous calcium phosphates: Synthesis, properties and uses in biomaterials// *Acta Biomaterialia*. – 2010. – Vol. 6 (9). – 3362.–3378. p.
- [12] Ramesh S., Aw K. L., Tolouei R., Amiriyani M., Tan C. Y., Hamdi M. Sintering properties of hydroxyapatite powders prepared using different methods// *Ceramics International*. – 2013. – Vol. 39 (1). – 111.–119. p.
- [13] Ryu H. S., Hong K. S., Lee J. K., Kim D. J. Variations of structure and composition in magnesium incorporated hydroxyapatite/ β -calcium phosphate// *Journal of Materials Research*. – 2006. – Vol. 21 (2). – 428.–436. p.
- [14] Kokubo T., Takadama H. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity?// *Biomaterials*. – 2006. – Vol. 27 (15). – 2907.–2915. p.
- [15] Pan H., Zhao X., Darvell B. W., Lu W. W. Apatite-formation ability – predictor of bioactivity?// *Acta Biomaterialia*. – 2010. – Vol. 6 (11). – 4181.–4188. p.