

RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE
Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte
Vispārīgās ķīmijas tehnoloģijas institūts

Arita DUBNIKA

Doktora studiju programmas „Ķīmijas tehnoloģija” doktorante

**KONTROLĒTAS IZDALĪŠANĀS ZĀĻU
PIEGĀDES SISTĒMAS UZ SUDRABU
SATUROŠA HIDROKSILAPATĪTA BĀZES**

Promocijas darba kopsavilkums

Zinātniskie vadītāji
Dr. sc. ing., Profesore
L.BĒRZIŅA-CIMDIŅA
Dr. sc. ing., Docente
D.LOČA

Rīga 2014

Dubņika A. Kontrolētas izdalīšanās zāļu piegādes sistēmas uz sudrabu saturoša hidroksilapatīta bāzes. Promocijas darba kopsavilkums.-R.:RTU, 2014.-31 lpp.

Iespiests saskaņā ar VĶT institūta 2013.gada 6. decembra lēmumu, protokols Nr.7-13/14



Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu projektā «Atbalsts RTU doktora studiju īstenošanai».

PROMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS INŽENIERZINĀTŅU DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ

Promocijas darbs inženierzinātņu doktora grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2014.g. Rīgas Tehniskajā Universitātē, Rīgā,

OFICIĀLIE RECENZENTI

Asociētais profesors, Dr.habil.sc.ing. Visvaldis Švinka
Silikātu materiālu institūts, Rīgas Tehniskā universitāte

Profesors, Dr.-Ing. habil. Aldo R. Boccaccini
Biomateriālu institūts, Frīdriha Aleksandra Erlangenas-Nirnbergas
Universitāte, Vācija

Profesors, D.D.S., M.Sc., Dip.prosth. (Toronto), Dr.habil.med., Pēteris Apse
Zobu protezēšanas katedra, Rīgas Stradiņa Universitāte

APSTIPRINĀJUMS

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

Arita Dubņika

Datums:

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu valodā, satur ievadu, 3 nodaļas – literatūras apskatu, eksperimentālo daļu, rezultātus un izvērtējumu, secinājumus, literatūras sarakstu, 74 attēlus, 21 tabula, 2 pielikumus, kopā 157 lappuses. Literatūras sarakstā ir 175 avoti.

PATEICĪBA

Vēlos pateikties promocijas darba vadītājai profesorei Līgai Bērziņai-Cimdiņai par atbalstu un uzticību promocijas darba izstrādē, padomiem un iespējām realizēt visas ieceres. Neizmērojami un nenovērtējami liels paldies darba vadītājai docentei Dagnijai Ločai par veltīto laiku, motivēšanu, idejām, padomiem un objektīvu darba kritiku. Paldies Jānim Ločam par vienmēr nodrošinātajām iespējām realizēt visus, un vēl vairāk, plānotos eksperimentus. Paldies profesoram Jurijam Ozoliņam par padomiem tehnoloģisko shēmu izstrādē.

Neizsakāmi liels paldies VĶTI kolektīvam, īpaši Lāsmai Počai, Marīnai Sokolovai, Ingai Dušenkovai un Vitai Zālītei par sapratni, atbalstu, atsaucību un palīdzību jebkurā diennakts stundā visā promocijas darba izstrādes laikā.

Paldies Neorganiskās ķīmijas institūta darbiniekiem par iespēju veikt XRF analīzes. Īpašs paldies Mārim Kodolam par zinātniskajām konsultācijām, motivāciju un palīdzību.

Paldies Rīgas Stradiņa Universitātes Mikrobioloģijas katedras lektora p.i. Aigaram Reinim par mikrobioloģisko eksperimentu veikšanu.

Paldies RTU Polimērmateriālu institūta direktoram Jānim Zicānam par iespēju veikt Vickers mikrociētības eksperimentus.

Paldies Latvijas Valsts Koksnes ķīmijas institūta vadošajam pētniekam Vladimiram Jakušinam par iespēju veikt mehāniskās izturības spiedē eksperimentus.

Vissirsnīgākais paldies manai ģimenei un draugiem par motivēšanu un atbalstu.

Vārdos neaprstāms paldies manam vīram un abām meitām par izturību, sapratni, ticību un atbalstu.

“ Mīlestība ir vislielākā vērtība pāri atomzinātnei un astronomijai, un to visgrūtāk atstāt, pierādīt un iešifrēt. Tai nav savas zīmes. Tā ir par lielu jebkurai zīmei un visām zīmēm.”

(Epifānijas, Imants Ziedonis).

SATURS

DARBA VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS	6
Tēmas aktualitāte	6
Promocijas darbā izvirzītais mērķis:	7
Promocijas darbam izvirzītie uzdevumi:	7
Darba zinātniskā nozīme:	7
Darba praktiskā nozīme:	7
Darba aprobācija:	7
LITERATŪRAS APSKATS	8
EKSPERIMENTU METODOLOĢIJA	10
Sudrabu saturoša hidroksilapatīta izstrāde un izvērtēšana	10
Sudrabu saturoša hidroksilapatīta pamatņu izstrāde un izvērtēšana	11
Pamatņu modificēšana ar hitosānu un deksametazona nātrija fosfātu	11
Pamatņu modificēšana ar alginātu/hitosānu un lidokaīna hidrohlorīdu	11
REZULTĀTU IZVĒRTĒJUMS	13
1. HAp/Ag iegūšanas metožu un tehnoloģisko shēmu izstrāde	13
2. Termiski neapstrādātu HAp/Ag paraugu analīze	14
3. Termiski apstrādātu HAp/Ag pulverveida paraugu analīze	15
4. Blīvu pamatņu mikrociētības izvērtējums	16
5. Termiskās apstrādes temperatūras ietekme uz HAp/Ag porainu paraugu īpašībām	17
6. Sudraba jonu izdalīšanās ātrums <i>in vitro</i>	18
7. HAp/Ag pamatņu antibakteriālo īpašību novērtējums	20
8. Lidokaīna hidrohlorīda piegādes sistēmas uz poraina hidroksilapatīta bāzes	21
9. Lidokaīna hidrohlorīda piegādes sistēmas uz poraina HAp/Ag bāzes	22
10. Deksametazona nātrija fosfāta piegādes sistēmas	25
SECINĀJUMI	28
PUBLIKĀCIJU SARAKSTS	29
ZINĀTNISKĀS KONFERENCES	30
Dalība zinātniskajās konferencēs ar recenzētām konferenču tēzēm:	30
Recenzētas konferenču tēzes:	31

DARBA VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS

Tēmas aktualitāte

Priekšnosacījums cilvēka dzīves kvalitātes nodrošināšanai un saglabāšanai ir noteiktas struktūras un izmēru kauli. Kauli ir pamats divām svarīgām izdzīvošanas funkcijām: pirmkārt, spējai uzņemt barību un, otrkārt, pārvietoties. Skeleta kaulu veselība cilvēka dzīvē nosaka pilnvērtīgas pārvietošanās spējas, bet žokļu kaulu un zobu stāvoklis atbild par barības uzņemšanu, runāšanas funkciju un psihoemocionālā komforta nodrošināšanu. Daudzas kaulu pataloģijas un traumas ārstē, izmantojot ķirurģiskus paņēmienus un dažādus implantmateriālus, tāpēc daudzfunkcionālu biomateriālu izstrādei ir liela nozīme cieto audu funkciju uzlabošanā un atjaunošanā.

Pasaulē plaši izmanto dažādus uz kalcija fosfātu bāzes veidotos biomateriālus, gan keramikas un cementu veidā, gan kā biostiklus, stikla keramiku vai kā pārklājumus metālu implantmateriāliem. Kalcija fosfātu biomateriāliem piemīt augsta bioaktivitāte un osteokonduktivitāte, līdz ar to šie materiāli cieši saistās ar veselajiem kaulaudiem. Daļa kalcija fosfātu biomateriālu ir bionoārdāmi – tie laika gaitā organismā noārdās, neveidojot toksiskas vielas un ļaujot veselajiem audiem aizstāt implantmateriālu. Vienīgais kalcija fosfātu biomateriālu trūkums ir to zemā mehāniskā izturība, tādēļ tos izmanto slodzi nenesošās vietās, galvenokārt, sejas un žokļu ķirurģijā, kā arī osteoporozes, ārstēšanai.

Medicīnā viens no izplatītākajiem kalcija fosfātu biomateriāliem ir kaulaudu minerālās fāzes pamatā esošais hidroksilapatīts. Papildinot hidroksilapatīta īpašības ar antibakteriālu efektu un veidojot uz šī materiāla bāzes kontrolētas zāļu piegādes sistēmas, iespējams iegūt daudzfunkcionālu materiālu. Iegūtais materiāls būtu ne tikai bioaktīvs un osteokonduktīvs, bet arī antibakteriāls un pēcoperāciju periodā kontrolēti izdalītu medikamentus, novēršot iespējamo infekciju risku.

Hidroksilapatīta struktūra ir viegli modificējama, aizstājot kalcija, fosfātu vai hidroksiljonus ar citiem joniem. Sudraba jonu antibakteriālā iedarbība pazīstama jau gadsimtiem, tādēļ tā ievadīšana hidroksilapatīta struktūrā piešķirtu implantmateriālam antibakteriālas īpašības. Turklāt hidroksilapatīts ir piemērots kontrolētai bioloģiski aktīvo vielu piegādei tieši nepieciešamajā vietā. Hidroksilapatītu iespējams formēt kā mezoporainu materiālu, kurā bioloģiski aktīvās vielas iespējams ievadīt, izmantojot ķīmiskas modifikācijas vai piesūcināšanas tehnoloģijas. Šādiem materiāliem iespējams papildus veidot polimēru pārklājumus, kas modificētu aktīvo vielu izdalīšanās ātrumu. Pilnveidojot materiāla struktūru un bioloģiski aktīvo vielu ievadīšanas metodiku, iespējams kontrolēt to izdalīšanās kinētiku *in vitro*.

Promocijas darbā izvirzītais mērķis:

Izstrādāt tehnoloģisko shēmu sudrabu saturoša hidroksilapatīta lokālu zāļu piegādes sistēmu iegūšanai un pētīt iegūto produktu īpašības.

Promocijas darbam izvirzītie uzdevumi:

- noskaidrot būtiskos parametrus sudrabu saturoša hidroksilapatīta iegūšanai un kontrolētu zāļu piegādes sistēmu izveidei uz tā bāzes. Balstoties uz iegūtajiem rezultātiem izstrādāt tehnoloģisko shēmu sudrabu saturoša hidroksilapatīta izveidei;
- izstrādāt nepieciešamās analīzes metodes iegūto produktu īpašību novērtēšanai;
- veikt aktīvo vielu un sudraba izdalīšanās pētījumus simulētajos ķermeņa šķidrumos;
- noskaidrot izveidoto kompleksu biosaderību un aktīvo vielu biopieejamību.

Darba zinātniskā nozīme:

- pirmo reizi izpētītas sudrabu saturoša hidroksilapatīta īpašības atkarībā no sagatavošanas metodes un iegūtas porainas sudrabu saturoša hidroksilapatīta pamatnes;
- pirmo reizi iegūtas kontrolētas izdalīšanās zāļu piegādes sistēmas, kuru pamatā ir materiāls ar antibakteriālām īpašībām;
- noskaidrota sudrabu saturoša hidroksilapatīta sastāva un tā modifikāciju ietekme uz dažādu bioloģiski aktīvo vielu izdalīšanās kinētiku.

Darba praktiskā nozīme:

- izstrādāta tehnoloģiskā shēma sudrabu saturoša hidroksilapatīta iegūšanai ar kontrolējamām fizikālām un antibakteriālām īpašībām;
- izstrādāta metodika kontrolētas izdalīšanās zāļu piegādes sistēmu iegūšanai, kuru pamatā ir bioaktīvs implantmateriāls ar antibakteriālām īpašībām.

Darba aprobācija:

Par promocijas darba zinātniskajiem sasniegumiem un galvenajiem rezultātiem ziņots 12 starptautiskās konferencēs, publicētas 7 pilna teksta zinātniskās publikācijas un 18 recenzētas zinātniskās konferenču tēzes, kā arī iesniegta viena kolektīvā monogrāfija publicēšanai grāmatā “Hydroxyapatite (HAP) for biomedical applications”.

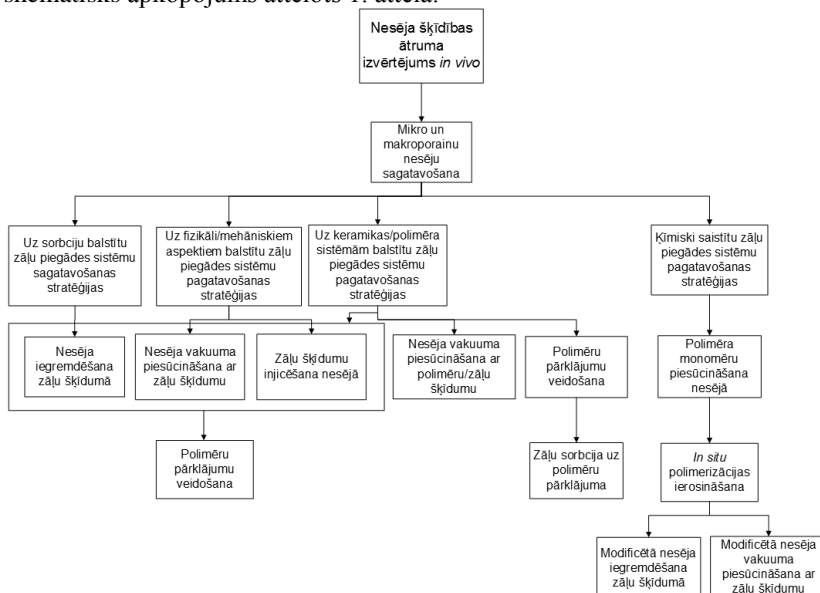
LITERATŪRAS APSKATS

Pasaulē ar katru gadu pieaug ķirurģisko operāciju skaits, kurās izmanto kalcija fosfātu implantmateriālus. Hidroksilapatīta implantmateriālu pētniecībai ir liela nozīme tālākā sejas, žokļu un mutes ķirurģijas attīstībā, lai atvieglotu sāpes un atjaunotu bojāto kaulaudu funkcionalitāti, kā arī lai uzlabotu ķirurģisko operāciju veiksmīgu iznākumu. Hidroksilapatīta līdzība ar kaula mineraloģisko daļu nodrošina materiāla biosaderību, bet ķirurģiskajās operācijās cilvēka audu saskarsmē ar implantmateriāliem pastāv liels risks veidoties iekaisumam, tādēļ vēlamās bioloģiskās mijiedarbības sasniegšanai, nepieciešams izstrādāt funkcionalizētus implantmateriālus.

Hidroksilapatīta struktūrā iespējams iekļaut dažādus jonus, tā īpašību uzlabošanai. Hidroksilapatīta struktūrā iekļaujot sudraba jonus, tiek nodrošināta materiāla antibakteriāla iedarbība. Ar sudrabu aizvietota hidroksilapatīta iegūšanā izmantotas dažādas metodes. Literatūrā norādīts mainīgs fāžu sastāvs termiski apstrādātiem un termiski neapstrādātiem paraugiem, tādēļ nepieciešama padziļināta materiāla īpašību izpēte, lai noteiktu antibakteriālās iedarbības efektivitāti. Papildus jāizvērtē materiāla īpašības atkarībā no iegūšanas metodes, jo atšķirīgi literatūras avoti norāda uz dažādām sudrabu saturošā hidroksilapatīta īpašībām. Tā kā hidroksilapatīts ir nešķīstošs cilvēka organismā, tad būtiski ir izvērtēt arī tā citotoksicitāti, īpaši sudrabu saturošos paraugos. Literatūrā apkopoti *in vitro* sudraba izdalīšanās pētījumi no sudrabu saturošiem hidroksilapatīta pulveriem tikai 3 līdz 14 dienu periodā, bet implantmateriāls organismā atradīsies ilgstoši, tādēļ jānovērtē sudraba jonu izdalīšanās no paraugiem vismaz divus līdz trīs mēnešus. Iegūtā implantmateriāla īpašībām ir būtiska nozīme tā tālākai izmantošanai kontrolētu zāļu piegādes sistēmu izveidē.

Kaulaudu reģenerācijas veicināšanai izmanto dažādus medikamentus, bet visplašāk sejas un žokļu ķirurģijā pietūkuma mazināšanai un atsāpināšanai tiek izmantots deksametazona nātrija fosfāts un lidokaīna hidrohlorīds. Katram zāļu ievadīšanas veidam ir savas priekšrocības un trūkumi, tādēļ ievadīšanas metodes nepārtraukti attīstās un tiek modificētas vai uzlabotas. Vissvarīgākais lokālā zāļu piegādē ir noteiktas aktīvās vielas koncentrācijas nodrošināšana noteiktu laika periodu. Plaši pētījumi kontrolētu zāļu piegādes sistēmu izveidē uz hidroksilapatīta bāzes aizsākti tikai pēdējā desmitgadē, līdz ar to vēl joprojām tiek meklēti optimālie zāļu ievadīšanas apstākļi, lai kontrolētu to izdalīšanos. Kā efektīvākās stratēģijas, kontrolētai medikamenta izdalīšanās nodrošināšanai, minētas polimēru pārklājumu veidošana un ķīmiska medikamenta saistīšana uz dažādām robežvirsmām. Daudzas no metodēm balstītas uz polimēru šķērssaistīšanu, izmantojot šķērssaistīšanas aģentus, kas var būt toksiski, tādēļ to lietošana

implantmateriāliem ir samērā ierobežota. Šī iemesla dēļ nepieciešams apskatīt dabīgo polimēru pārklājumu veidošanu bez šķērssaistīšanas aģentiem, un izvērtēt šķērssaistīšanās aģenta ietekmi uz medikamenta izdalīšanās ātrumu. Literatūrā aprakstītās ķīmiskās medikamenta saistīšanas metodes balstītas uz polimēru pamatnēm un zāļu saistīšanu pie tām. Šīs metodes nepieciešams pārnest uz sudrabu saturoša hidroksilapatīta pamatnēm, veidojot polimēra pārklājumus, kuriem piesaistīt farmaceitiski aktīvo vielu molekulas. Zāļu piegādes sistēmu pagatavošanas stratēģiju shematisks apkopojums attēlots 1. attēlā.



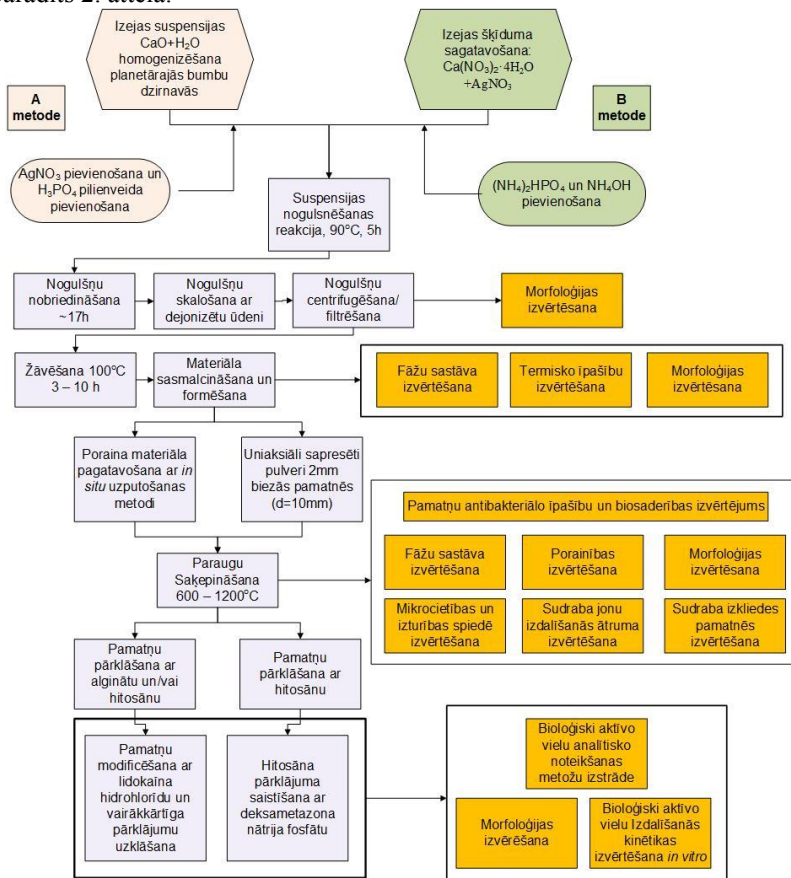
1.att. Zāļu piegādes sistēmu pagatavošanas stratēģiju shematisks apkopojums

Iegūtajām sistēmām jānovērtē ne tikai medikamentu izdalīšanās ātrums, bet, balstoties uz literatūru, jāizvērtē arī tā saistība ar pamatnes porainību, apstrādes tehnoloģiju, kā arī morfoloģiju. Liela nozīme ir medikamenta satura noteikšanas metodikai, lai noteiktu mazas medikamenta koncentrācijas un to vai medikaments pilnībā izdalīties.

Balstoties uz veikto literatūras apskatu, secināts, ka līdz šim kontrolētas zāļu piegādes sistēmas uz sudrabu saturoša hidroksilapatīta bāzes nav pētītas. Tādējādi disertācijas ietvaros veiktie pētījumi paver plašas iespējas tādu materiālu ieguvē, kas vienlaicīgi spēs nodrošināt medikamenta terapeitisko iedarbību pirmās 3 līdz 5 dienas pēc operācijas un pēc tam ilgstošu antibakteriālu iedarbību sudraba jonu ietekmē.

EKSPERIMENTU METODOLOĢIJA

Promocijas darba izstrādes shēma un noteikto parametru apkopojums parādīts 2. attēlā.



2.att. Paraugu iegūšanas process un pētītās īpašības katrā no procesa etapiem

Sudrabu saturošā hidroksilapatīta izstrāde un izvērtēšana

Sudrabu saturošā hidroksilapatīta (HAP/Ag) iegūšanai izmantotas divu tipu ķīmiskās nogulsnešanas metodes ar atšķirīgiem reaģentiem. Reakcija veikta 90 °C temperatūrā un iegūtās nogulsnes nobriedinātas 17 h. Neizreaģējušo jonu aizvadišanai, sintēzes produkti vairākkārtīgi skaloti ar dejonizētu ūdeni. Reakcijas gaitā un pēc tās, izvērtētas daļiņu morfoloģiskās izmaiņas, suspensiju paraugi žāvēti 100 °C un analizēti, izmantojot lauka emisijas skenējošo elektronu mikroskopu (SEM, Tescan, Mira/LMU).

Iegūtās suspensijas centrifugētas vai filtrētas un žāvētas 100 °C 3 – 10 h. Iegūtajam pulverveida materiālam izvērtēts fāžu sastāvs, izmantojot Furjē transformācijas infrasarkanās spektrometrijas analīzi (FT-IR, Varian 800 FT-IR Scimitar Series), rentgendifratometrijas (XRD, PANalytical X-Pert Pro) un rentgenfluorescences (XRF, Bruker Pioneer S4) analīzi. Termiskās īpašības novērtētas, izmantojot augsttemperatūras mikroskopiju (ATM, EMO-1750/30-K) un diferenciāltermisko analīzi (DTA, BÄHR diferenciāltermiskais analizators „DTA703”). Paraugu virsmas laukums izvērtēts, izmantojot slāpekļa sorbtometriju (BET, Quantachrome QuadraSorb SI).

Sudrabu saturoša hidroksilapatīta pamatņu izstrāde un izvērtēšana

Iegūto pulverveida materiālu formē porainās pamatnēs, izmantojot *in situ* uzpuošanas metodi (uzpuošanas aģents amonija hidroģēnkarbonāts), vai blīvās pamatnēs, cilindveida formā uniaksiāli presējot ar spēku 2 – 15 kN. Gatavus paraugus termiski apstrādā 600 līdz 1000 °C temperatūrā 1 - 2 stundas.

Paraugiem izvērtēts fāžu sastāvs, izmantojot XRD, XRF un FTIR, porainība noteikta ar Arhimēda metodi, sudraba jonu izdalīšanās kinētika ar elektrotermālo atomabsorbcijas spektrometru (ETAAS, ANALYST 600, PerkinElmer), pamatņu morfoloģija novērtēta, izmantojot SEM un paraugu virsmas laukums noteikts, izmantojot BET. Porainām pamatnēm noteikta mehāniskā izturība spiedē (Zwick/Roell). Blīvām pamatnēm noteikta Vickers mikrociētība (Vickers M41) un novērtētas antibakteriālās īpašības pret divu veidu baktēriju tīrkultūrām *Ps.aeruginosa* ATCC 27853 un *S.epidermidis* ATCC 12228.

Pamatņu modificēšana ar hitosānu un deksametazona nātrija fosfātu

Blīvas un porainas pamatnes vakuumā piesūcinātas un izostatiski presētas 4 wt% hitosāna 5% etiķskābes ūdens šķīdumā - izostatiskā presēšanā izmantots hidrauliskais cilindrs. Izzāvētas pamatnes skalotas ar 1M NaOH ūdens šķīdumu, dihlormetānu un dimetilformamīdu. Pamatnes atkārtoti izžāvētas un piesūcinātas vakuumā ar deksametazona nātrija fosfāta šķīdumu dimetilformamīdā un izostatiski presētas deksametazona šķīdumā, pievienojot katalizatoru N,N-diizopropiletilamīnu.

Pamatņu morfoloģija analizēta, izmantojot SEM, medikamenta izdalīšanās kinētika noteikta simulētajā ķermeņa šķīdumā (SBF), izmantojot ultra augsti efektīvās šķīdumu hromatogrāfijas metodi (UPLC, Waters Acquity UPLC).

Pamatņu modificēšana ar alginātu/hitosānu un lidokaīna hidrohlorīdu

HAp un HAp/Ag porainās keramiskās pamatnes piesūcinātas ar lidokaīna hidrohlorīda ūdens šķīdumu (60 mg/mL) un polimēru/ūdens šķīdumu, izmantojot vakuuma piesūcināšanas metodi. Šķērssaistīšanai ar

alginātu/lidokaīnu/alginātu pārklātas HAp/Ag pamatnes ievietotas 30% CaCl₂ ūdens šķīdumā uz 4h. Pārklājumu veidošanas secības shēma uz porainām keramiskajām pamatnēm parādīta 3. attēlā.



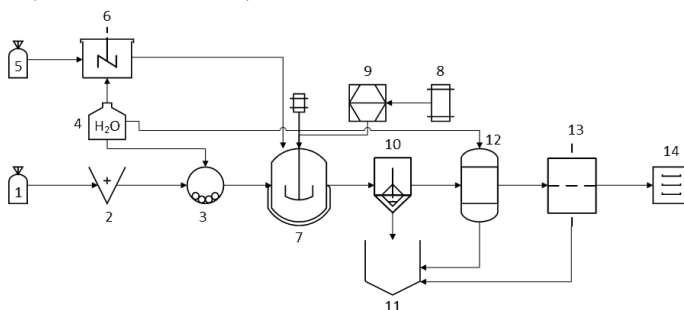
3.att. Lidokaīna piegādes sistēmu izveides shēma uz porainām keramiskām pamatnēm

Pamatņu morfoloģija analizēta, izmantojot SEM un medikamenta izdalīšanās kinētika noteikta fosfātu buferšķīdumā (PBS), izmantojot augsti efektīvo šķīdumu hromatogrāfiju (HPLC, Waters 2695 Alliance Separations Module).

REZULTĀTU IZVĒRTĒJUMS

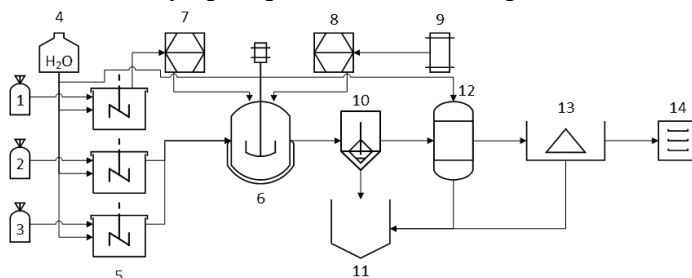
1. HAp/Ag iegūšanas metožu un tehnoloģisko shēmu izstrāde

HAp/Ag iegūšanai izvēlētas literatūrā aprakstītās slāpās ķīmiskās nogulsnešanas metodes, kuru pamatā ir ūdens šķīdumā esošo jonu izgulsnēšana. Lai nodrošinātu lielāku HAp/Ag iznākumu un līdz ar to plašākas izmantošanas iespējas, literatūrā aprakstītās metodes pārnestas no reaktoriem ar 0,2 L tilpumu uz reaktoriem ar tilpumu 2,0 L. Ņemot vērā mērogošanas nepieciešamību, modificēti literatūrā aprakstīto metožu tehnoloģiskie parametri, kā arī izveidotas tehnoloģiskās shēmas HAp/Ag iegūšanai, izmantojot divu tipu reaģentus – A metodes gadījumā CaO, H₃PO₄, AgNO₃ un B metodes gadījumā Ca(NO₃)₂, (NH₄)₂HPO₄, NH₄OH, AgNO₃. (skatīt 4. un 5. attēlu).



1 – CaO, 2 – koniskais smalcinātājs, 3 – planetārās bumbu dzirnavas, 4 – dejonizēts ūdens, 5 – AgNO₃, 6 – šķīdināšanas trauks ar maisītāju, 7 – termostatējams reaktors ar mehānisko maisītāju un pH sensoru, 8 – 2M H₃PO₄, 9 – dozators, 10 – nostādīšanas trauks, 11 – atdalīto šķīdumu konteiners, 12 – skalošanas tvertne ar pH sensoru, 13 – filtrēšanas iekārta, 14 – žāvēšanas skapis.

4.att. HAp/Ag A iegūšanas metodes tehnoloģiskā shēma



1 – (NH₄)₂HPO₄, 2 – AgNO₃, 3 – Ca(NO₃)₂, 4 – dejonizēts ūdens, 5 – šķīdināšanas trauki ar maisītājiem, 6 – termostatējams reaktors ar mehānisko maisītāju un pH sensoru, 7, 8 – dozatori, 9 – NH₄OH šķīdums, 10 – nostādīšanas trauks, 11 – atdalīto šķīdumu konteiners, 12 – skalošanas tvertne ar pH sensoru, 13 – centrifūga, 14 – žāvēšanas skapis.

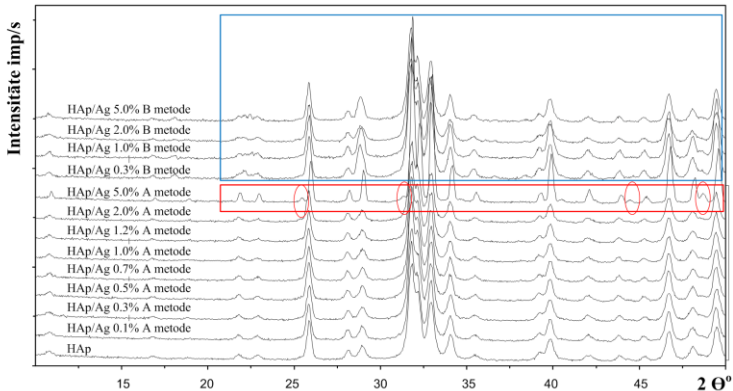
5.att. HAp/Ag B iegūšanas metodes tehnoloģiskā shēma

2. Termiski neapstrādātu HAp/Ag paraugu analīze

Pēc izstrādātajām tehnoloģiskajām shēmām veiktas astoņas A metodes sintēzes un četras B metodes sintēzes ar dažādu sudraba masas daļu paraugā. Katra sintēze atkārtota vismaz 3 reizes. Iegūtajiem materiāliem noteikts:

- 1) fāžu sastāvs – lai apstiprinātu Ag^+ jonu iekļaušanos struktūrā, nevis blakusproduktu veidošanos;
- 2) iekļautais sudraba saturs struktūrā – lai noteiktu sudraba jonu iekļaušanās efektivitāti HAp struktūrā;
- 3) BET īpatnējais virsmas laukums un daļiņu morfoloģija – lai noteiktu daļiņu izmērus un paredzētu termiski apstrādātu paraugu īpašības;
- 4) termiskās īpašības – lai noteiktu termisko stabilitāti un optimālos termiskās apstrādes apstākļus.

Iegūto pulvera paraugu rentgendifrakcijas ainās apkopotas 6. attēlā.



6.att. A un B metožu HAp/Ag un HAp neapdedzinātu pulvera paraugu rentgendifrakcijas ainās

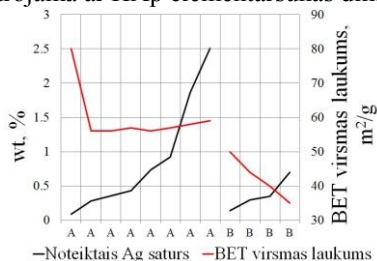
Iegūtie pulveru paraugi atbilst heksagonālas kristāliskās struktūras HAp fāzei, kas liecina par sudraba jonu ieslēgšanos hidroksilapatīta struktūrā. Sasniedzot sudraba masas daļu 5,0%, A metodes paraugos novērojama β -trikalcijs fosfāta ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) fāzes veidošanās.

Sudraba jonu iekļaušanos struktūrā apstiprināja aprēķināto režģa parametru a un c palielināšanās HAp/Ag paraugu gadījumā, kas atbilst literatūrā norādītajām izmaiņām, ja sudraba joni iekļaujas HAp struktūrā.

Darba gaitā noteikta HAp struktūrā iekļautā sudraba masas daļa % (wt%) pulveru paraugiem. Sudraba jonu iekļaušanas efektivitāte HAp struktūrā samazinās, palielinoties teorētiski pievienotajam sudraba saturam. A metodes gadījumā sudraba jonu iekļaušanās efektivitāte HAp struktūrā samazinās no $99 \pm 1\%$ paraugiem ar 0,1% teorētisko masas daļu līdz $50 \pm 2\%$ paraugiem ar 5,0% teorētisko masas daļu. B metodes gadījumā

novērojams daudz straujāks sudraba atgūstamības kritums no $50 \pm 2\%$ paraugiem ar 0,3% teorētisko masas daļu līdz $15 \pm 4\%$ paraugiem ar 2,0% teorētisko masas daļu. Sudraba jonu iekļaušanās efektivitātes samazināšanās liecina par citu blakusproduktu veidošanos.

Novērots, ka BET īpatnējās virsmas laukums samazinās, palielinoties pievienotajai sudraba masas daļai %. BET īpatnējās virsmas laukuma samazināšanās skaidrojama ar HAp elementāršūnas dimensiju mainīšanos.

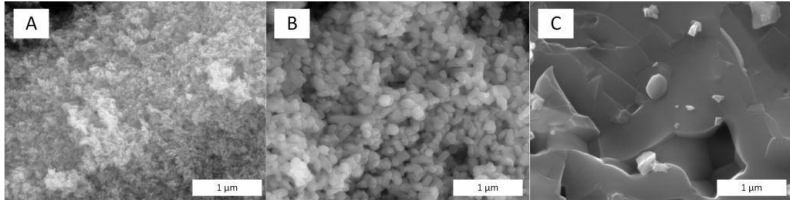


7. att. HAp/Ag īpatnējās virsmas laukuma izmaiņas salīdzinātas ar sudraba masas daļu % HAp/Ag paraugos

Augsttemperatūras mikroskopijas rezultāti apstiprināja HAp/Ag struktūras izmaiņas. Saķepšanas temperatūra palielinājās par $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ HAp/Ag paraugiem, kas sintezēti izmantojot A metodi, salīdzinājumā ar hidroksilapatīta paraugiem bez sudraba jonu piedevas. Noteikts, ka B metodes HAp/Ag pulveru paraugu sudraba masas daļa HAp/Ag paraugos ietekmē saķepšanas temperatūru. Iekļaujot 0,14 wt% sudraba jonu HAp struktūrā, saķepšanas temperatūra paaugstinās par $50 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, savukārt, iekļaujot 0,70 wt% sudraba HAp struktūrā, saķepšanas temperatūra paaugstinās par $200 \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ salīdzinājumā ar tīru HAp fāzi. Šie rezultāti saskan ar BET īpatnējās virsmas laukuma rezultātiem, ka HAp/Ag pulveru daļiņu izmērs palielinās, palielinot pievienoto sudraba daudzumu, metodes B gadījumā, līdz ar to sablīvēšanās notiek lēnāk un augstākās temperatūrās, kā rezultātā pieaug saķepšanas temperatūra.

3. Termiski apstrādātu HAp/Ag pulverveida paraugu analīze

HAp/Ag pulverveida paraugu morfoloģijas izmaiņas saķepšanas procesā attēlotas 8. attēlā. HAp/Ag pulvera daļiņām raksturīga adatveida morfoloģija un to garums ir no 20 nm līdz 65 nm. Apdedzinot pulvera paraugus $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā 2 h, daļiņu izmērs palielinās līdz 70 – 200 nm, kas liecina par graudu augšanu, turklāt to forma kļūst sfēriskāka. Pēc pulveru apdedzināšanas $1150\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā 2 h, daļiņas ir sablīvējušās.



8. att. SEM mikrofotogrāfijas A metodes HAp/Ag daļiņām: A– termiski neapstrādāts pulveris; B– pulveris 1000 °C 2h; C– pulveris 1150 °C 2h

Izvērtējot pamatņu morfoloģiju un fāžu sastāvu pēc termiskās apstrādes, noteikts, ka blīvām pamatnēm termiskās apstrādes procesā sudrabs, kas atrodas uz HAp pamatņu virsmas, palielinoties temperatūrai, iztvaiko. Savukārt fāžu sastāva maiņa novērojama ne tikai termiskās apstrādes temperatūras ietekmē, bet arī atkarībā no HAp/Ag iegūšanas metodes. 1. tabulā salīdzināts fāžu sastāvs un tā izmaiņas temperatūras ietekmē starp termiski apstrādātiem pulverveida paraugiem atkarībā no izmantotās iegūšanas metodes.

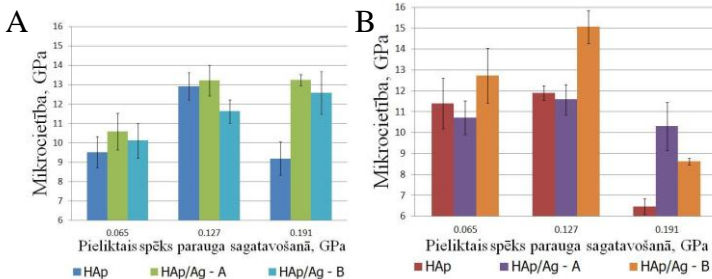
1. tabula

HAp/Ag paraugu fāžu sastāva maiņa pēc termiskās apstrādes dažādās temperatūrās

HAp/Ag iegūšanas metode	500 °C	700 °C	900 °C	1000 °C	1150 °C
A	HAp	HAp	HAp AgO	HAp AgO Ag	HAp AgO Ag
B	HAp	HAp Ag	HAp Ag AgO	HAp AgO	HAp AgO

4. Blīvu pamatņu mikrociētības izvērtējums

Salīdzinot paraugu mikrociētību pēc termiskās apstrādes 1000 un 1150 °C temperatūrā (skatīt 9. attēlu), novērots, ka parauga sagatavošanas procesā pieliktais spēks ietekmē tā mikrociētību.

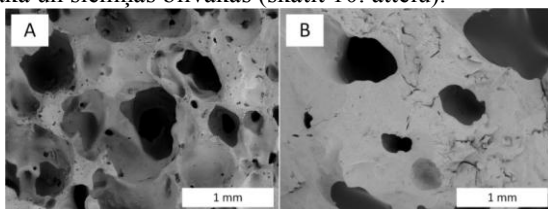


9. att. 1000 °C (A) un 1150 °C (B) temperatūrā apstrādātu HAp un HAp/Ag blīvu paraugu mikrociētība atkarībā no pieliktā spēka presēšanas laikā

Blīvu pamatņu mikrociētība palielinās, ja pieliktais spēks presēšanai tiek palielināts no 0,065 uz 0,127 GPa. Palielinot pielikto spēku presēšanas procesā līdz 0,191 GPa, novērojama paraugu mikrociētības samazināšanās. Izmantojot lielāku pielikto spēku presēšanas procesā, daļiņas tiek sapakotas. Pārsniedzot sapakošanās efektivitātes līmeni, šajā gadījumā pie augstāka pieliktā spēka, daļiņas tiek deformētas, tādēļ mainās saskares virsma starp daļiņām, kā rezultātā samazinās pamatņu mikrociētība. Noteikts ka kļūdu robežās visoptimālākais spēks paraugu sagatavošanā ir 0,127 GPa, kas nodrošina visaugstāko mikrociētību abu tipu HAp/Ag un tīra HAp blīviem keramikajiem paraugiem, kas termiski apstrādāti 1000 vai 1150 °C temperatūrā divas stundas.

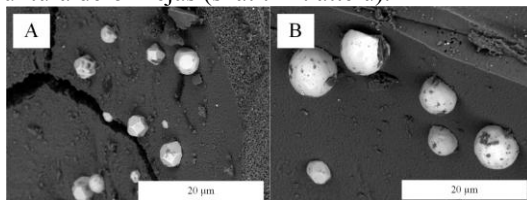
5. Termiskās apstrādes temperatūras ietekme uz HAp/Ag porainu paraugu īpašībām

Analizējot A un B metodes HAp/Ag porainu pamatņu morfoloģiju noteikts, ka A metodes HAp/Ag porainās pamatnes satur vairāk mikro un nano poras salīdzinājumā ar B metodes HAp/Ag pamatnēm, kurām poru virsma ir gludāka un sienīņas blīvākas (skatīt 10. attēlu).



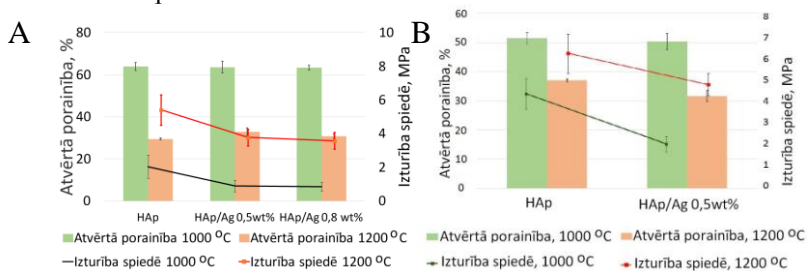
10. att. Poraini paraugi, kas termiski apstrādāti 1000 °C temperatūrā: A – iegūts no A sintēzes metodes pulvera, B – iegūts no B sintēzes metodes pulvera

Abu tipu metodēm sudrabu saturošas daļiņas novērojamas poru sienīņu šķērsgrīzumā, bet A metodes gadījumā sudrabu saturošas daļiņas novērojamas arī uz iekšējo poru virsmas. Sudrabs augsttemperatūras apstrādes laikā, tiek pakļauts atgriezeniskai reakcijai $2Ag + O_2 \rightleftharpoons 2AgO$. Sudrabu saturošās daļiņas, kas izveidojošās poru iekšienē, ir poliedriskas kristāliskas struktūras un, paaugstinoties termiskās apstrādes temperatūrai, to kristāliskā struktūra deformējas (skatīt 11. attēlu).



11. att. Termiski apstrādāti A metodes HAp/Ag poraini paraugi: A – 1000 °C, B – 1150 °C

Porainu HAp/Ag paraugu izturība spiedē korelē ar paraugu blīvumu. Blīvākiem paraugiem, attiecīgi 1200 °C termiski apstrādātiem, ir augstāka mehāniskā izturība spiedē. Paaugstinot termiskās apstrādes temperatūru no 1000 līdz 1200 °C iespējams iegūt paraugus ar 2 – 4 reizes augstāku mehānisko izturību spiedē. HAp/Ag porainām pamatnēm ar 0,5 – 0,8 wt% sudraba saturu mehāniskā izturība spiedē ir 1,3 – 2,1 reizi zemāka nekā HAp porainām pamatnēm (skatīt 12. attēlu). Viens no iemesliem, kādēļ samazinās paraugu mehāniskā izturība spiedē ir Ca²⁺ jonu aizvietošana ar Ag⁺ joniem, jo Ca²⁺ joni (0,99 Å) ir mazāki nekā Ag⁺ joni (1,28 Å). Rentgendifrakcijas ainas un SEM mikrofotogrāfijas apstiprināja Ag saturošu savienojumu veidošanos uz pamatņu poru virsmas, atstājot vakances HAp struktūrā, kā rezultātā HAp struktūra tiek deformēta.

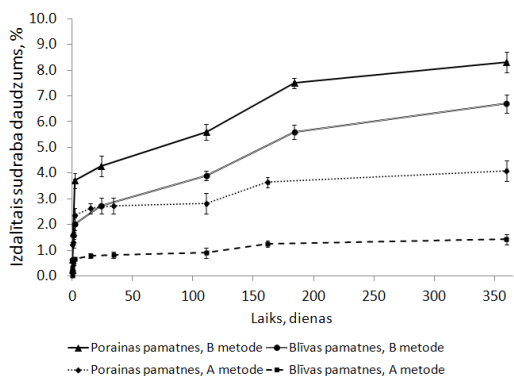


12.att. HAp/Ag porainu paraugu izturība spiedē: A – A iegūšanas metode, B – B iegūšanas metode.

6. Sudraba jonu izdalīšanās ātrums *in vitro*

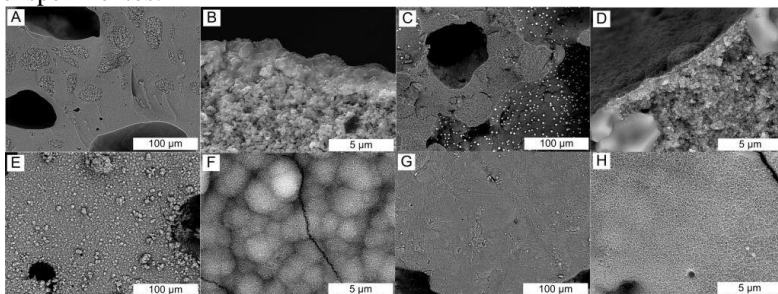
Sudrabu saturošu materiālu antibakteriālās īpašības ir atkarīgas ne tikai no sudraba masas daļas % materiālā, bet arī no materiāla fāžu sastāva un šķīdības ātruma. Lai izvērtētu sudraba jonu izdalīšanos no iegūtajiem materiāliem, gadu izvērtēts sudraba jonu izdalīšanās ātrums simulētajā ķermeņa šķīdumā.

13. attēlā salīdzināts sudraba izdalīšanās ātrums SBF no blīvām un porainām HAp/Ag pamatnēm, kas 2 h termiski apstrādātas 1000 °C temperatūrā.



13. att. *In vitro* sudraba jonu izdalīšanās kinētika no HAp/Ag pamatnēm

Analizējot iegūtās sudraba jonu izdalīšanās kinētikas līknes, noteikts, ka sudraba jonu izdalīšanās ātrums pirmajās 2 dienās ir divas reizes lielāks no pamatnēm, kas pagatavotas no kalcija nitrāta, amonija hidroģēnfosfāta, sudraba nitrāta un amonjaka (B metode), salīdzinot ar A metodes pamatnēm. Pēc divām dienām sudraba jonu izdalīšanās stabilizējas, un nākamās trīs mēnešus no abu tipu bļīvām un porainām HAp/Ag pamatnēm Ag^+ joni izdalās ar ātrumu $0,001 \pm 0,0005 \text{ wt\%/h}$ no pamatnēs esošā sudraba daudzuma. Izmantojot HAp/Ag pamatnes ar 1 wt% Ag saturu, sudraba jonu koncentrācija ir zem $0,025 \pm 0,008 \mu\text{g/L}$ stundā. Šāda sudraba jonu koncentrācija, balsoties uz literatūras datiem, nav toksiska cilvēka organismam. Apskatot HAp/Ag pamatņu morfoloģiju pēc 12 mēnešu inkubācijas perioda SBF (skatīt 14. attēlu), uz pamatņu virsmas un poraino pamatņu šķērsgrīzumā redzama HAp kārtiņa. Ja SBF šķīdumā uz materiāla virsmas veidojas HAp kārtiņa, tad materiāls būs bioaktīvs arī *in vivo* eksperimentos.

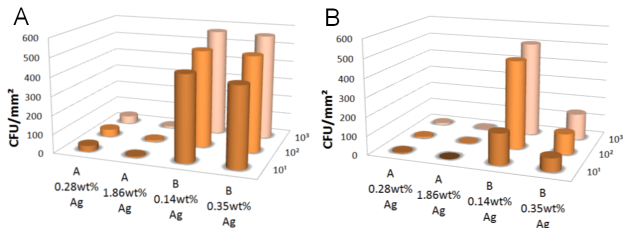


14. att. Porainu HAp/Ag pamatņu mikrostruktūra pēc gada izturēšanas SBF: A,B – B metodes pamatnes lūzums, C,D – A metodes pamatnes lūzums, E,F – B metodes pamatnes virsma, G,H – A metodes pamatnes virsma

7. HAp/Ag pamatņu antibakteriālo īpašību novērtējums

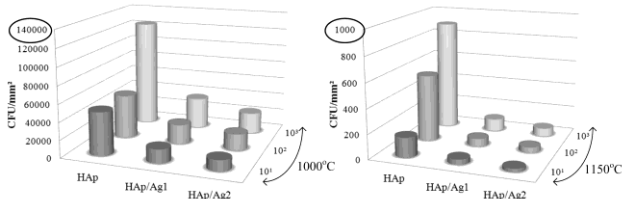
Lai noteiktu optimālos iegūšanas un apstrādes parametrus antibakteriālu porainu pamatņu izstrādei, antibakteriālās īpašības izvērtētas atkarībā no paraugu termiskās apstrādes temperatūras, sudraba masas daļas paraugā un paraugu pagatavošanas metodes. Pētījumos izmantotas gan *gram* pozitīvas *S. epidermidis*, gan *gram* negatīvās *Ps. aeruginosa* baktērijas. Šīm baktērijām atšķiras šūnapvalki, līdz ar to pretestība pret antibakteriālajiem preparātiem.

Sudrabu nesaturoši HAp paraugi neuzrādīja antibakteriālo aktivitāti. Abu tipu baktēriju kolonizācijas intensitāte tika aizkavēta sudrabu saturošajiem paraugiem, īpaši tiem, kas pagatavoti izmantojot metodi A ar sudraba masas daļu 1,86% (skatīt 15. attēlu). SEM mikrofotogrāfijās uz HAp/Ag paraugu virsmas tika novērotas ļoti retas un atdalītas *S.epidermidis* baktērijas. Turklāt tās neveidoja glikokaliksu, kas atbild par biofilmu veidošanos uz implantmateriāliem organismā.



15. att. Baktēriju kolonizācijas intensitāte uz HAp/Ag paraugu virsmas:
A – *S. epidermidis*, B – *Ps. aeruginosa*

Baktēriju kolonizācijas rezultāti apstiprināja HAp/Ag antibakteriālo īpašību atkarību no sudraba masas daļas un apstrādes temperatūras (skatīt 16. attēlu). *S.epidermidis* baktēriju kolonizācijas intensitāte tiek kavēta uz sudrabu saturošajiem paraugiem, īpaši tiem, kas apstrādāti 1150 °C temperatūrā. Paaugstinot pamatņu apstrādes temperatūru, HAp un HAp/Ag daļiņas sablīvējas un pamatņu porainība samazinās, kā rezultātā baktērijām ir grūtāk piekerties un izplatīties pa pamatņu virsmu.



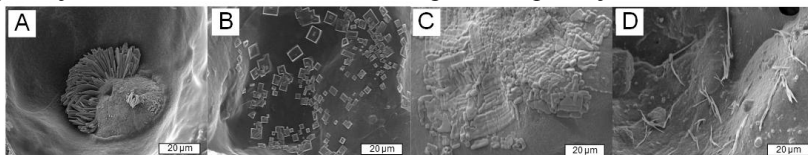
16. att. *S.epidermidis* baktēriju kolonizācijas intensitāte uz HAp un A metodes HAp/Ag blīviem paraugiem. HAp/Ag1 - Ag masas daļa 0,2%; HAp/Ag2 - Ag masas daļa 1,1%.

Apkopojot iegūtos antibakterialitātes pētījumu rezultātus, secināts, ka A metodes paraugi, kas satur 1,1 masas daļas % sudrabu un ir apstrādāti 1150 °C temperatūrā uzrāda vislabākās antibakteriālās īpašības pret *gram* pozitīvajām (*S. epidermidis*) un *gram* negatīvajām (*Ps. aeruginosa*) baktērijām.

8. Lidokaīna hidrohlorīda piegādes sistēmas uz poraina hidroksilapatīta bāzes

Priekšpētījumi veikti izmantojot tīra HAp porainās pamatnes. Pamatnes pārklātas ar alginātu un/vai hitosāna pārklājumiem un piesūcinātas ar lidokaīnu dažādā secībā (skatīt 3. attēlu).

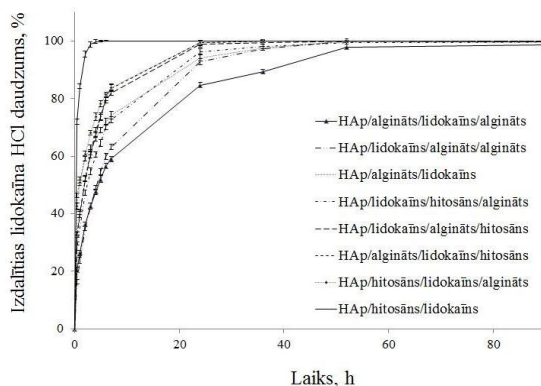
FTIR analīze iegūtajiem kompozītiem norādīja, ka starp HAp, lidokaīna hidrohlorīdu un nātrija alginātu un/vai hitosānu piesūcināšanas procesa laikā un pēc tā ķīmiskas reakcijas nenotiek. Taču SEM mikrofotogrāfijās (skatīt 17. attēlu) redzams, ka lidokaīna kristāliskā struktūra ir atkarīga no polimēra pārklājumu kārtības un mainās atbilstoši polimēra pārklājumu veidam.



17. att. SEM mikrofotogrāfijas: A – HAp/hitosāns/lidokaīns;
B – HAp/algināts/lidokaīns; C – HAp/algināts/lidokaīns/algināts;
D – HAp/algināts/lidokaīns/hitosāns;

Lidokaīna kristālisko struktūru ietekmē gan kristalizācijas centru veidošanās iespējas, gan šķīdība polimēru šķīdumos to uznešanas gaitā. Atkārtoti šķīstot un kristalizējoties, mainās lidokaīna struktūra, kristalizācijas centri, turklāt spiediena ietekmē tā var tikt deformēta. Hitosāna šķīdums ir viskozāks, līdz ar to ūdens iztvaikošanas process norisinās lēnāk, kā rezultātā lidokaīns vienā punktā var kristalizēties lielākā koncentrācijā.

Lidokaīna kristālu morfoloģija un to izvietojums pamatnē, ietekmē medikamenta izdalīšanās ātrumu. Lai izvērtētu lidokaīna izdalīšanās kinētiku, paraugi ievietoti PBS šķīdumā uz 148 stundām. Izdalītais lidokaīna daudzums noteikts inkubēšanas (37 °C, 50 rpm) laikā (skatīt 18. attēlu).



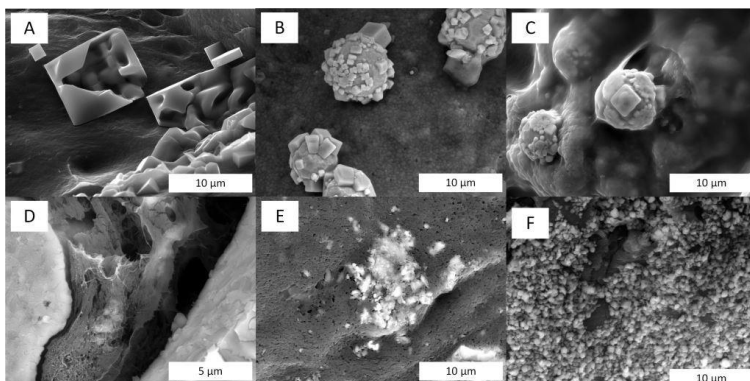
18. att. Lidokaīna hidrohlorīda izdalīšanās kinētika no HAp/polimēru/lidokaīna kompozītiem

Iegūtie rezultāti parādīja, ka ar hitosānu pārklātiem kompozītmateriāliem pirmajā stundā novērojama strauja medikamenta izdalīšanās, līdz pat 70% no ievadītā daudzuma. Pamatnēm, kas pārklātas ar algīnātu, pirmajā stundā novērojama lidokaīna izdalīšanās no 16 līdz 30%. Inkubēšanas laikā vislēnākā lidokaīna izdalīšanās novērota HAp/algīnāts/lidokaīns/algīnāts kompozītiem. Šādiem materiāliem lidokaīna izdalīšanās tika aizkavēta līdz pat 60 stundām, salīdzinājumā ar HAp/hitosāns/lidokaīns pamatnēm, kur pilnīga lidokaīna izdalīšanās novērota jau pēc pirmajām 6 stundām.

60 h lidokaīna kontrolēta izdalīšanās ir pietiekami ilgs laiks, lai pirmās dienas pēcooperāciju periodā nodrošinātu pretsāpju efektu, tādēļ pētījumi ar HAp/Ag pamatnēm veikti veidojot kompozītmateriālus HAp/Ag ar algīnāta/lidokaīna/algīnāta, HAp/Ag ar lidokaīna/algīnāta/algīnāta un HAp/Ag ar lidokaīns/hitosāns/algīnāts pārklājumiem, kas uzrādīja vislabākos rezultātus pētījumā ar HAp porainajām pamatnēm.

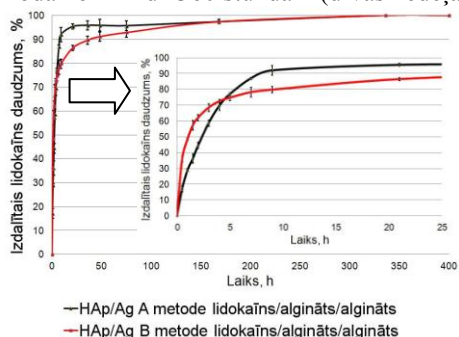
9. Lidokaīna hidrohlorīda piegādes sistēmas uz poraina HAp/Ag bāzes

Analizējot FTIR spektrus, noteikts, ka arī starp HAp/Ag, lidokaīna hidrohlorīdu un nātrija algīnātu/hitosānu, piesūcināšanas procesa laikā un pēc tā, ķīmiskas reakcijas nenotiek. Savukārt apskatot SEM mikrofotogrāfijas (skatīt 19. attēlu), redzams, ka sudraba daļiņas darbojas kā kristalizācijas centri lidokaīna kristāliem.



19. att. SEM mikrofotogrāfijas: A – HAp/Ag A metode algināts/lidokaīns/algināts; B – HAp/Ag A metode lidokaīns/algināts/algināts; C – HAp/Ag A metode lidokaīns/algināts/hitosāns; D – HAp/Ag B metode algināts/lidokaīns/algināts; E – HAp/Ag B metode lidokaīns/algināts/algināts; F – HAp/Ag B metode lidokaīns/algināts/hitosāns

Analizējot iegūtos lidokaīna izdalīšanās rezultātus no HAp/Ag pamatnēm secināts, ka sudraba klātbūtne pamatnēs ietekmē lidokaīna morfoloģiju un polimēru pārklājumu veidošanos, kā rezultātā lidokaīns no sudraba saturošām pamatnēm izdalās straujāk, salīdzinot ar tūrām HAp pamatnēm pārklātām ar algināta/lidokaīna/algināta un lidokaīna/hitosāna/algināta pārklājumiem. HAp/Ag pamatnēm ar šādiem pārklājumiem pirmajās 10 līdz 24 h pilnībā izdalās viss ievadītais lidokaīns. Kontrolētu lidokaīna izdalīšanos no HAp/Ag porainām pamatnēm var iegūt, pamatnes piesūcinot ar lidokaīnu un divas reizes pārklājot ar alginātu (skatīt 20. attēlu). No šāda materiāla novērojama kontrolēta medikamenta izdalīšanās laika periodā no 24 līdz 360 stundām (divas nedēļas).



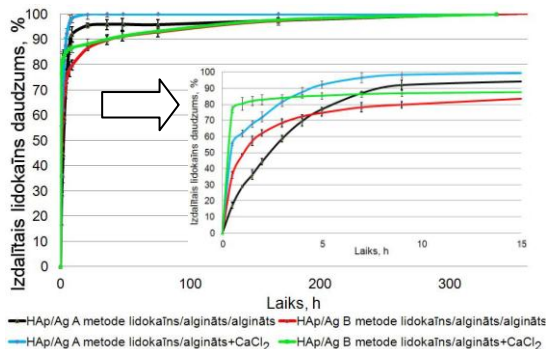
20. att. Lidokaīna hidrohlorīda izdalīšanās kinētika no HAp/Ag lidokaīns/algināts/algināts kompozītiem

HAp/Ag A sintēzes metodes pamatnēm lidokaīna izdalīšanās ātruma līdzsvars iestājas vēlāk, turklāt pirmajās stundās izdalītais lidokaīna daudzums ir par 3 – 6% augstāks, salīdzinot ar B sintēzes metodes HAp/Ag pamatnēm. Iespējams tas saistīts ar pamatnes poru struktūru un lidokaīna kristalizēšanos uz sudraba saturošām daļiņām.

Ņemot vērā iegūtos rezultātus un balstoties uz literatūras datiem, lai iegūtu kontrolētu medikamenta izdalīšanos līdz 30 dienām, papildus HAp/Ag paraugi modificēti ar lidokaīnu un alginātu, algināta pārklājumus šķērssaistot ar kalcija hlorīdu.

Iegūto kompozītu FTIR analīze apstiprināja šķērssaistīšanās faktu. Ag^+ joniem izdaloties no pamatnēm, tie var saistīties ar COO^- grupu, tādēļ novērojama simetriskās $C=O$ grupas absorbcijas palielināšanās, turklāt B metodes HAp/Ag lidokaīns/algināts+ $CaCl_2$ pamatnēm novērojama augstāka COO^- saišu absorbcija, kas saistīta ar divreiz lielāku sudraba jonu izdalīšanās ātrumu, salīdzinājumā ar A metodes pamatnēm.

Lidokaīna izdalīšanās kinētika no HAp/Ag lidokaīns/algināts+ $CaCl_2$ pamatnēm neuzrādīja gaidītos rezultātus. Salīdzinot ar HAp/Ag pamatnēm ar algināta pārklājumu bez šķērssaistīšanas, pirmajās 10 stundās novērojama ātrāka lidokaīna izdalīšanās (skatīt 21. attēlu), kam seko līdzsvara iestāšanās.



21. att. Lidokaīna izdalīšanās kinētika no HAp/Ag lidokaīns/algināts+ $CaCl_2$ pamatnēm

Šī straujā izdalīšanās ir saistīta ar pamatnes morfoloģiju, plaisām, poru struktūru un sudraba daļiņām, kas atrodas uz pamatnes porām. Visi šie faktori ietekmē pārklājuma veidošanos, radot tajā defektus, kā rezultātā lidokaīns izdalās ātrāk.

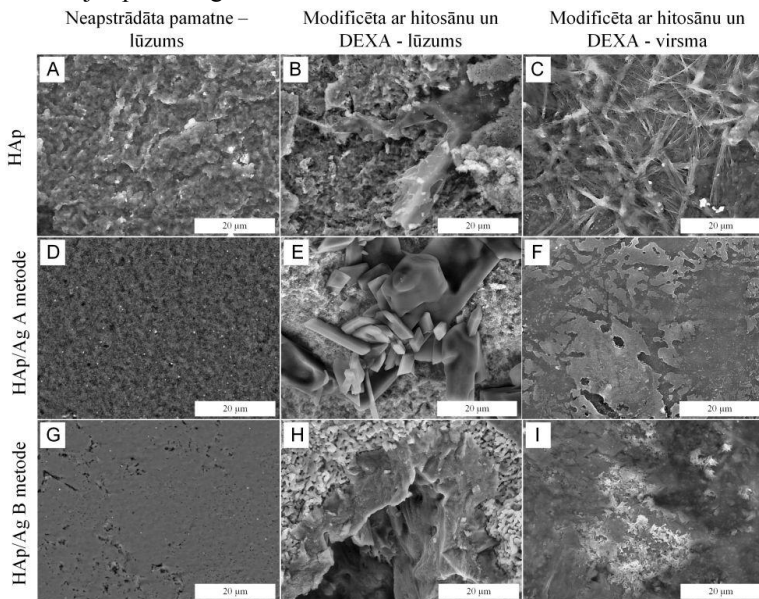
Izvērtējot visus lidokaīna izdalīšanās kinētikas rezultātus, noteikts, ka visefektīvāk lidokaīna izdalīšanos no porainām HAp vai HAp/Ag pamatnēm var aizkavēt, veicot sākotnēju pamatnes piesūcināšanu ar lidokaīnu, kam

seko divkāršs algināta pārklājums. Uznesot šādu pārklājumu uz HAp/Ag pamatnēm, iespējams nodrošināt lidokaīna piegādi līdz pat divām nedēļām.

10. Deksametazona nātrija fosfāta piegādes sistēmas

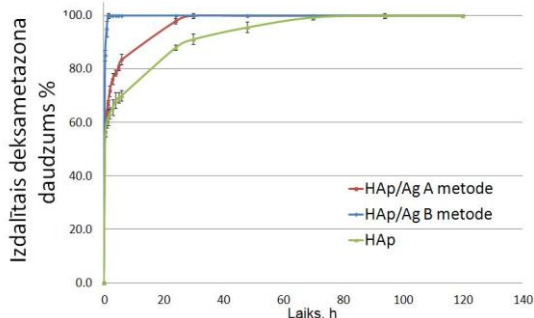
Balstoties uz literatūras pētījumiem par deksametazona (DEXA) imobilizēšanu uz hitosāna pamatnēm un kārtiņām, promocijas darbā šī metode pārnesta uz HAp un HAp/Ag keramiskajām pamatnēm.

HAp un A metodes HAp/Ag gadījumā paraugu FTIR analīze apstiprināja hitosāna C=O un C=C (cikla saites) struktūras konjugēšanos ar C=O saitēm deksametazonā. B metodes HAp/Ag gadījumā papildus absorbcijas joslas neveidojās, kas liecina par to, ka DEXA nav saistījies ar hitosāna pārklājumu. Izvērtējot iegūto pamatņu morfoloģiju, novērots, ka atkarībā no pamatņu veida mainās deksametazona kristālu struktūra un saistīšanās pie hitosāna. 22. attēlā apkopotas pamatņu morfoloģijas izmaiņas modifikācijas procesa gaitā.



22. att. HAp (A – C), A metodes HAp/Ag (D – F) un B metodes HAp/Ag (G – I) pamatnes: A, D, G – nemodificētas; B, E, H – lūzums modificētām ar hitosānu un DEXA; C, F, I – virsma modificētām ar hitosānu un DEXA

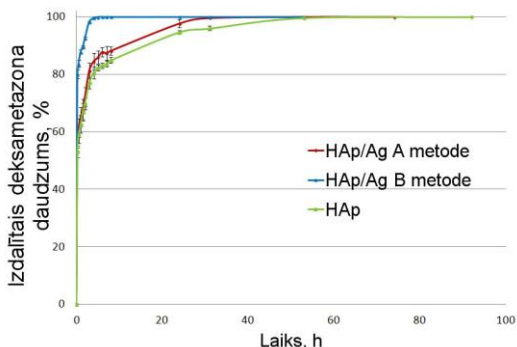
Ņemot vērā saistīto DEXA daudzumu, noteikta DEXA izdalīšanās kinētika SBF šķīdumā (skatīt 23. attēlu).



23. att. DEXA izdalīšanās kinētika no blīvām HAp un HAp/Ag pamatnēm

Viss uznestais DEXA daudzums uz B metodes HAp/Ag pamatnēm SBF šķīdumā izdalās pusotras stundas laikā. Tas apstiprina FTIR rezultātus, ka nav notikusi DEXA imobilizācija uz hitosāna pārklājuma. HAp pamatņu gadījumā kontrolētu DEXA izdalīšanos iespējams iegūt līdz 70 h, savukārt, A metodes HAp/Ag paraugu gadījumā DEXA izdalās 30 stundu laikā. Līdz ar to var secināt, ka sudraba jonu izdalīšanās no HAp/Ag pamatnēm kavē DEXA saistīšanos uz hitosāna pārklājuma.

Modificējot porainas HAp un HAp/Ag pamatnes ar hitosānu un DEXA, iespējams aizkavēt DEXA izdalīšanos no A metodes HAp/Ag pamatnēm līdz 40 stundām, līdz 70 stundām no HAp pamatnēm un līdz 5 stundām no B metodes HAp/Ag pamatnēm (skatīt 24. attēlu).

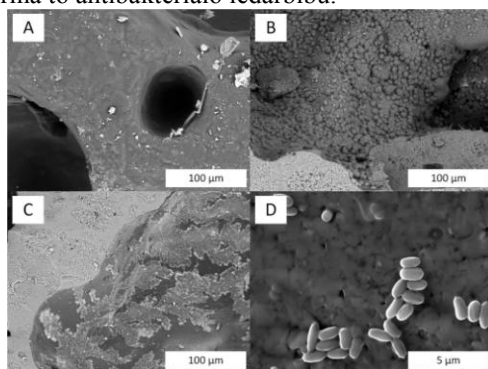


24. att. DEXA izdalīšanās kinētika no porainām HAp un HAp/Ag pamatnēm

Analizējot iegūtos DEXA izdalīšanās rezultātus no porainām HAp un HAp/Ag pamatnēm modificētām ar hitosānu un DEXA, novērota līdzīga tendence saistībā ar B metodes HAp/Ag pamatnēm. Tā kā no porainām modificētām B metodes HAp/Ag pamatnēm viss uznestais DEXA izdalījās 5 stundās, var secināt, ka sudraba jonu izdalīšanās no pamatnēm traucē

hitosāna un DEXA saistīšanu pie tām. Tā kā DEXA saistīšana pie hitosāna ir nukleofila reakcija, sudraba katjons var iesaistīties reakcijā, tādējādi neļaujot notikt DEXA un hitosāna reakcijai.

Pēc DEXA izdalīšanās pētījumu veikšanas, pamatnes uz mēnesi atstātas SBF šķīdumā. Pēc mēneša uz A HAp/Ag porainajām pamatnēm veidojas blīva HAp kārtiņa (skatīt 25.A. attēlu), savukārt uz B metodes HAp/Ag novērojama amorfas HAp kārtiņas veidošanās (skatīt 25.B. attēlu), kas liecina par HAp/Ag bioaktivitāti. Savukārt uz HAp pamatnēm novērojama ne tikai jaunas HAp kārtiņas veidošanās, bet arī baktēriju koloniju veidošanās (skatīt 25.C un D attēlus). Sudrabu saturošu HAp gadījumā baktērijas netika novērotas nevienā no ilgtermiņa SBF eksperimentiem, kas papildus apstiprina to antibakteriālo iedarbību.



25. att. Pamatnes pēc DEXA izdalīšanās, izturētas 1 mēnesi SBF: A – A metodes HAp/Ag, B – B metodes HAp/Ag, C un D: HAp

SECINĀJUMI

1. Izmantojot dažādus reaģentus un pagatavošanas tehnoloģijas, iespējams iegūt sudrabu saturoša hidroksilapatīta pamatnes ar sudraba masas daļu līdz $2,51 \pm 0,07\%$.
2. Sudrabu saturoša hidroksilapatīta fāžu sastāvs un tā izmaiņas ir atkarīgas no materiāla iegūšanas veida, iekļautā sudraba daudzuma un termiskās apstrādes temperatūras.
3. Sudraba jonu izdalīšanās ātrumu no HAp/Ag pamatnēm nosaka pamatņu fāžu sastāvs un virsmas laukums. Sudraba joni terapeitiskā koncentrācijā ($0,025 \pm 0,008 \mu\text{g/L}$ stundā) no pagatavotajām pamatnēm izdalās vairāk kā gadu. Izvēloties atbilstošu sudrabu saturošā hidroksilapatīta iegūšanas metodi un formēšanas procesu, iespējams kontrolēt sudraba jonu izdalīšanās ātrumu un izdalīto koncentrāciju.
4. Sudrabu saturoša hidroksilapatīta antibakteriālā iedarbība ir atkarīga no materiāla termiskās apstrādes temperatūras, kā arī no sudraba jonu izdalīšanās ātruma un satura materiālā.
5. Sudrabu saturošas hidroksilapatīta pamatnes modificējot ar nātrija alginātu un/vai hitosānu, iespējams iegūt kontrolētas izdalīšanās zāļu piegādes sistēmas, kur aktīvo vielu izdalīšanās ātrums ir atkarīgs no pārklājuma veida un aktīvās vielas ievadīšanas metodes.
6. Ja ar sudrabu aizvietota hidroksilapatīta pamatņu iegūšanā kā reaģentus izmanto $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4OH un AgNO_3 , strauja sudraba jonu izdalīšanās pirmajās dienās kavē pamatņu saistīšanu ar hitosānu un deksametazona nātrija fosfātu.
7. Veidojot zāļu piegādes sistēmas, sudraba daļiņas uz sudrabu saturoša hidroksilapatīta poraino pamatņu poru virsmas darbojas kā lidokaīna hidrohlorīda kristalizācijas centri.
8. Nātrija algināta un hitosāna pārklājumu izmantošana lidokaīna hidrohlorīda piegādes sistēmu izveidē uz sudrabu saturoša hidroksilapatīta bāzes, nodrošina medikamenta kontrolētu izdalīšanos periodā no 3 līdz 14 dienām.
9. Hitosāna pārklājuma saistīšana ar deksametazona nātrija fosfātu uz sudrabu saturoša hidroksilapatīta bāzes, nodrošina medikamenta kontrolētu izdalīšanos periodā no 2 līdz 3 dienām.

PUBLIKĀCIJU SARAKSTS

1. A.Dubnika, D.Loca, L.Berzina-Cimdina. Functionalized hydroxyapatite scaffolds coated with sodium alginate and chitosan for controlled drug delivery. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, **2012**, 61(3), 193-199.
2. D.Loca, A.Dubnika, A.Reinis, N.Romancikova. In vitro evaluation of osteoblast cell behavior and antimicrobial properties of biphasic calcium phosphate ceramics. Springer, *IFMBE Proceedings*. **2013**, 38, 186-189.
3. A.Dubnika, D.Loca, A.Reinis, M.Kodols, L.Berzina-Cimdina. Impact of sintering temperature on the phase composition and antibacterial properties of silver doped hydroxyapatite. *Pure and Applied Chemistry*. **2013**, 85(2), 453-462.
4. A.Dubnika, D.Loca, I.Salma, A.Reinis, L.Poca, L.Berzina-Cimdina. Evaluation of physical and antimicrobial properties of silver doped hydroxyapatite depending on the preparation method. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. **2014**, 25(2), 435-444.
5. A.Dubnika, V.Zalite. Preparation and characterization of porous Ag doped hydroxyapatite bioceramic scaffolds. *Ceramics International*. **2014**, 40(7), 9923-9930.
6. L.Poca, A.Dubnika, D.Loca, L.Berzina-Cimdina. Evaluation of silver doped hydroxyapatite scaffold bioactivity in simulated body fluids. *Key Engineering Materials*. **2014**, 604, 175-179.
7. A.Dubnika, V.Rudovica. Evaluation of silver ion bioavailability from silver doped hydroxyapatite. *Key Engineering Materials*. **2014**, 604, 200-203.

Iesniegta monogrāfija

D.Loca, J.Locs, A.Dubnika, V.Zalite, L.Berzina-Cimdina. 12. Porous hydroxyapatite for drug delivery. Nodaļas saturs iesniegts „Hydroxyapatite (HAP) for biomedical applications” (Edited by: Professor Michael Mucalo, University of Waikato, New Zealand, Woodhead publishing). ISBN – 13:878 1 78242 033 0. Plānotais publicēšanas laiks **2015**. gada sākums. 36 lpp.

ZINĀTNISKĀS KONFERENCES

Dalība zinātniskajās konferencēs ar recenzētām konferenču tēzēm:

1. A.Dubnika, D.Loca, L.Berzina-Cimdina. Functionalized hydroxyapatite scaffolds coated with sodium alginate and chitosan for controlled drug delivery. *Baltic Polymer symposium 2011*, **2011**, September 21 - 24, Parnu, Estonia. Book of abstracts, page No. 13. Mutiskais referāts.
2. A.Dubnika, D.Loca, L.Berzina-Cimdina. Synthesis of silver-doped hydroxyapatite scaffolds for controlled drug delivery. *The 52nd International Scientific Conference of Riga Technical University*, **2011**, October 13 – 15, Riga, Latvia. Book of abstracts, page No. 13. Mutiskais referāts.
3. A.Dubnika, D.Loca, A.Reinis, L.Berzina-Cimdina. A. Miglane. Preparation and Antibacterial Properties of Silver Doped Hydroxyapatite Scaffolds. *12th Eurasia Conference on Chemical Sciences*, **2012**, April 16 – 21, Corfu, Greece. Book of abstracts, page No. S1-OP27. Mutiskais referāts.
4. A.Dubnika, D.Loca, B.J. Nebe, L.Berzina-Cimdina. In vitro studies of osteoblast activity on biphasic calcium phosphate ceramic surfaces. *5th Annual meeting of the Scandinavian Society for Biomaterials*, **2012**, May 8 – 9, Uppsala, Sweden. Abstract published in *European Cells and Materials*, Volume 23, Supplement 5, 2012, p 34. Stenda referāts.
5. A.Dubnika, D.Loca, L.Berzina-Cimdina. Preparation and Characterization of Silver Doped Hydroxyapatite Scaffolds with Chitosan for Controlled Drug Delivery. *Colloids and Nanomedicine 2012*, **2012**, July 15-17, Amsterdam, Netherlands. Book of abstracts, page No.P.3.1. Stenda referāts.
6. A.Dubnika, I.Salma, D.Loca, L.Berzina-Cimdina. Controlled Release of Dexamethasone from Fibrin Mixed with Biphasic Calcium Phosphate Bioceramics. *RTU 53rd International Scientific Conference*, **2012**, October 11 – 12, Riga, Latvia. Book of abstracts, page No.88. Mutiskais referāts.
7. D. Loca, A. Dubnika, A. Reinis, N.Romancikova. In Vitro evaluation of osteoblast cell behavior and antimicrobial properties of biphasic calcium phosphate ceramics. *ISBEMP-12*, **2012**, October 11 – 12, Riga, Latvia. Mutiskais referāts.
8. A.Dubnika, D.Loca, L.Poca. Investigation of silver doped hydroxyapatite. *Bioceramics and cells for reinforcement of bone*, **2012**, October 18 – 20, Riga, Latvia. Book of abstracts, page No.47. Stenda referāts.
9. A.Dubnika, D.Loca, D.Jakovlevs, L.Berzina-Cimdina. Evaluation of silver distribution within the silver doped hydroxyapatite. 6th annual meeting of SCSB Materials for Tissue engineering, **2013**, March 13 – 15 Hafjell, Norway, Book of abstracts, ScSB – Poster #3. Stenda referāts.

10. A.Dubnika, I.Salma, D.Loca, A.Reinis, L. Berzina-Cimdina. Evaluation of physical and antimicrobial properties of silver doped hydroxyapatite. 13th International Conference of the European Ceramic Society, **2013**, June 23 – 27, Limoges, France. Book of abstracts, page No. 320. Mutiskais referāts.

11. A.Dubnika, L.Poca, A.Miglane, D.Loca, V.Rudovica, L.Berzina-Cimdina. Preparation and evaluation of porous silver doped hydroxyapatite scaffolds. Riga Technical University 54th International Scientific Conference. **2013**, October 14 – 16, Riga, Latvia. Book of abstracts, page No. 41. Mutiskais referāts

12. A.Dubnika, V.Rudovica, A. Miglane, D.Loca. Evaluation of silver ion bioavailability from silver doped hydroxyapatite. BALTMATTRIB 2013. **2013**, November 14 – 15, Riga, Latvia. Book of abstracts, page No. 43. Stenda referāts.

Recenzētas konferenču tēzes:

1. A. Reinis, J. Kroiča, J. Vētra, M. Pilmane, A. Stunda, A. Pūra, D. Loča, A. Dubnika, I. Skadiņš, D. Rostoka. In vitro and in vivo study of bacterial adhesion and colonisation on different biomaterials. *Bioceramics and cells for reinforcement of bone*, **2012**, October 18 – 20, Riga, Latvia. Book of abstracts, page No.p.22.

2. K. Salma-Ancane, A. Dubnika, L. Stipniece, M. Sokolova, N. Borodajenko. Synthesis methodology and investigation of calcium phosphate biomaterials for bone tissue replacement in regenerative medicine. *Bioceramics and cells for reinforcement of bone*, **2012**, October 18 – 20, Riga, Latvia. Book of abstracts, page No.39.

3. D. Loca, A. Dubnika, V. Zalite. Preparation of controlled release drug delivery systems based on calcium phosphates. *Bioceramics and cells for reinforcement of bone*, **2012**, October 18 – 20, Riga, Latvia. Book of abstracts, page No.45.

4. D.Loca, A.Dubnika, L.Berzina-Cimdina. Multifunctional hydroxyapatite/poly(lactic acid) hybrid microcapsules as local drug delivery systems. Euro BioMAT. **2013** April 23-24, Weimar, Germany. Available online: <http://www.dgm.de/tagungen/?tgnr=1315&cat=&edate=23.04.2013&lg=en>.

5. L.Poca, A.Dubnika, D.Loca, L.Berzina-Cimdina. Synthesis method modification of silver doped hydroxyapatite. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialie. **2013**, September 26 – 28, Erlangen, Germany.

6. L.Poca, A.Dubnika, D.Loca, L.Berzina-Cimdina. Evaluation of silver doped hydroxyapatite scaffolds bioactivity in simulated body fluids. BALTMATTRIB 2013. **2013**, November 14 – 15, Riga, Latvia. Book of abstracts, page No. 42.