

RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE
MATERIĀLZINĀTNES UN LIETIŠĶĀS ĶĪMIJAS
FAKULTĀTE

Linda VECBIŠKENA

Doktora studiju programma “Ķīmijas tehnoloģija”

NANOIZMĒRA KALCIJA FOSFĀTI UN TO
POTENCIĀLAIS PIELIETOJUMS BIOMEDICĪNĀ

Promocijas darba kopsavilkums

Zinātniskie vadītāji:

asoc. profesors

Ph.D. **Kārlis Agris GROSS**

asoc. profesors

Ph.D. **Luigi DE NARDO**

RTU Izdevniecība
Rīga 2016

Vecbiškēna L. Nano-izmēra kalcija fosfāti un to potenciālais pielietojums biomedicīnā. Promocijas darba kopsavilkums. – R.: RTU Izdevniecība, 2016. – 31 lpp.

Iespiests saskaņā ar Promocijas padomes P-02 2016. gada 16. marta lēmumu.

Promocijas darbs izstrādāts Rīgas Tehniskās universitātes Biomateriālu zinātniski pētnieciskajā laboratorijā un Milānas Politehniskās universitātes Ķīmijas, materiālu un ķīmijas tehnoloģijas institūtā “G. Natta”.



**POLITECNICO
DI MILANO**

Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu projektā “Atbalsts Rīgas Tehniskās universitātes doktora studiju īstenošanai” pirmajā mācību gadā.



ISBN 978-9934-10-799-3

POMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS INŽENIERZINĀTŅU DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ

Promocijas darbs inženierzinātņu doktora grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2016. gada 12. maijā Rīgas Tehniskās universitātes Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultātē, Paula Valdena ielā 3/7, 272. auditorijā.

OFICIĀLIE RECENZENTI

Asociētais profesors, *Dr. habil. sc. ing.* Visvaldis Švinka,
Rīgas Tehniskā universitāte, Latvija

Asociētā profesore, *Ph.D.* Edita Garskaite,
Viļņas Universitāte, Lietuva

Vadošais pētnieks, *Ph.D.* Martin Järvekülg,
Tartu Universitāte, Igaunija

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.

.....
Linda VECBIŠKENA

.....
Datums

Promocijas darbs ir uzrakstīts angļu valodā, satur ievadu, 4 nodaļas un secinājumus. Darba apjoms ir 120 lappuses, tajā ietverti 43 attēli, 18 tabulas, 35 vienādojumi, 17 pielikumi un literatūras sarakstu ar 254 avotiem.

PATEICĪBA

Man ir patiesi liels prieks pateikties ikvienam, kas palīdzēja tapt šim promocijas darbam. Milzīgs paldies jums!

Vispirms, es gribu pateikt paldies visiem, kas dalījās savās zināšanās, iedvesmoja, atbalstīja un izpalīdzēja visu šo gadu garumā:

Prof. **Andrim Actiņam** un viņa grupai no Latvijas Universitātes Fizikālās ķīmijas katedras, kā arī Prof. **Arturam Vīksnam** un viņa grupai no Latvijas Universitātes Analītiskās ķīmijas katedras (Rīga, Latvija);

Prof. **Thomas Chung-Kuang Yang, Ph.D. Po-Yang Peng** un **Yang Sung-Wei** no Taibejas Nacionālā tehnoloģiju universitātes Ķīmijas tehnoloģijas un biotehnoloģijas institūta (Taibeja, Taivāna);

Prof. **Unai Riekstiņai** no Latvijas Universitātes Farmakoloģijas katedras (Rīga, Latvija);

Prof. **Roberto Chiesa**, Asoc. prof. **Luigi de Nardo**, Asoc. Prof. **Gabriele Candiani**, **Ph.D. Lina Altomare, Ph.D. Elena Tallarita, Ph.D. Monika Moscatelli, Mattia Ronchi** un **Andrea Serafini**, no Milānas Politehniskās universitātes Ķīmijas, materiālu un ķīmijas tehnoloģijas institūts "G. Natta" (Milāna, Itālija);

Prof. **Aivaras Kareiva** un viņa grupai no Viļņas Universitātes Neorganiskās ķīmijas katedras, kā arī Assist. Prof. **Živilė Stankevičiūtė** no Viļņas Universitātes Lietišķās ķīmijas katedras (Viļņa, Lietuva);

protams, **RTU Doktorantūras skolai** un Asoc. Prof. **Kārlim Agrim Grosam** no Rīgas Tehniskā universitātes Biomateriālu zinātniski pētnieciskās laboratorijas (Rīga, Latvija). Ne katram ir dotas tādas sadarbības iespējas!

Paldies **Rīgas Tehniskajai universitātei, Taivānas-Latvijas-Lietuvas sadarbības programmai, Itālijas** and **Lietuvas valdībām** par finansējumu. Tas tiešām ir liels gods būt Itālijas un Lietuvas valdību stipendiju laureātei! Darbs finansiāli atbalstīts ar:

Eiropas Sociālā fonda atbalstu projektā "Atbalsts Rīgas Tehniskās universitātes doktora studiju īstenošanai" (akadēmiskais gads 2011/2012);

Taivānas-Latvijas-Lietuvas sadarbības programmu projektā "Funkcionāli nanolīmeņa materiāli biotehnoloģiskiem un optiskiem pielietojumiem" (akadēmiskais gads 2011/2012);

Eiropas Savienības studentu apmaiņas programmu "ERASMUS Studentu prakse" (akadēmiskais gads 2012/2013);

Itālijas valdības studiju grantu "Itālijas valdības stipendija ārvalstu un I.R.E. studentiem" (akadēmiskais gads 2013/2014);

Lietuvas valdības studiju grantu "Lietuvas valdības stipendija studentiem, lektoriem un pētniekiem" (akadēmiskais gads 2014/2015).

Darba tapšana nebūtu iedomājama bez vecāku, **Māra Vecbiškēna** un **Baibas Vecbiškēnas**, kā arī māsas **Zanes Vecbiškēnas** mīlestības un nemītīga atbalsta. Mīļie, paldies jums par iedrošinājumu zinātniskās izpētes un ceļojuma laikā apkārt pasaulei! Es to ļoti novērtēju!

Liels paldies visiem maniem draugiem, kas bija man blakus visu šo laiku un dalījās savā pieredzē, padomos un ieteikumos. Īpaši sirsnīgs paldies **Laurai Vīķelei**!

Visbeidzot, mīļš paldies visiem maniem kolēģiem Latvijā, Itālijā un Lietuvā. Novēlu jums visu to labāko studijās un turpmākajā karjerā! *In bocca al lupo!*

SATURS

PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS	7
Tēmas aktualitāte	7
Pētījuma mērķis un uzdevumi	7
Aizstāvāmās tēzes	8
Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti	8
Darba praktiskā nozīme	9
Darba struktūra un apjoms	9
Darba aprobācija un publikācijas	9
LITERATŪRAS APSKATS	10
EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA	11
PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI	12
1. Nanoizmēra α -trikalcija fosfāta pielietojums kaulu cementā	12
α -TCP tīrība atkarībā no sintēzes apstākļiem	12
Nanodaļiņu veidošanās	13
α -TCP stabilitāte etanola ietekmē	14
α -TCP hidrolīze nestehiometriskā hidroksilapatītā ar kalcija deficītu	16
Šūnu biosaderība	18
2. Nanoizmēra hidroksilapatīta un β -trikalcija fosfāta pielietojums biokompozītmateriāla pārklājumā	18
Hidroksilapatīta un β -trikalcija fosfāta izpēte	18
Hitozāna-kalcija fosfātu pārklājumu morfoloģija	20
<i>In vitro</i> bioaktivitāte simulētā ķermeņa šķidrumā	21
Šūnu biosaderība	23
3. No fundamentālā pētījuma līdz tehnoloģijai	25
SECINĀJUMI	27
JAUNINĀJUMI	27
LITERATŪRAS SARAKSTS	28

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

ACP	amorfais kalcijs fosfāts
<i>aq</i>	šķīdumā
<i>a.u.</i>	relatīvā intensitāte
CaP	kalcijs fosfāts(-i)
CDHA	nestehiometrisks hidroksilapatīts ar kalcijs deficītu
CH	hitozāns
CPC	kalcijs fosfātu kaulu cements
E-CH	hitozāna-etiķskābes šķīdums
E-15	hitozāna-etiķskābes šķīdums, kas satur 15 % [v/v] kalcijs fosfātu šķīdumu ($[Ca^{2+}] = 0,42\text{ M}$ and $[PO_4^{3-}] = 0,25\text{ M}$)
E-25	hitozāna-etiķskābes šķīdums, kas satur 25 % [v/v] kalcijs fosfātu šķīdumu ($[Ca^{2+}] = 0,42\text{ M}$ and $[PO_4^{3-}] = 0,25\text{ M}$)
E-70/30	hitozāna-etiķskābes šķīdums, kas satur nanoizmēra hidroksilapatīta un β -trikalcijs fosfāta daļiņas (HA-II/ β -TCP = 70/30 wt %)
E-HA-I	hitozāna-etiķskābes šķīdums, kas satur nanoizmēra hidroksilapatīta daļiņas ($[HA-I] = 0,05\text{--}0,40\text{ g/L}$)
E-HA-II	hitozāna-etiķskābes šķīdums, kas satur nanoizmēra hidroksilapatīta daļiņas ($[HA-II] = 0,05\text{--}0,40\text{ g/L}$)
E-TCP	hitozāna-etiķskābes šķīdums, kas satur nanoizmēra β -trikalcijs fosfāta daļiņas ($[\beta\text{-TCP}] = 0,30\text{ g/L}$)
FT-IR	Furjē transformāciju infrasarkanā spektroskopija
HA	hidroksilapatīts
<i>in situ</i>	izcelsmes vietā
<i>in vitro</i>	bioloģiskās studijas, kas veiktas ārpus dzīvā organisma
<i>in vivo</i>	bioloģiskās studijas, kas veiktas dzīvā organismā
MSCs	mezenhimālās cilmes šūnas
<i>s</i>	cietā stāvoklī
<i>Saos-2</i>	osteosarkoma šūnu līnija <i>Saos-2</i>
SBF	simulētais ķermeņa šķidrums
SEM	skenējošā elektronu mikroskopija
TCP	trikalcijs fosfāts
TCPS	šūnu kultūras plate
TEM	transmisijas elektronu mikroskopija
Ti	titāns
XRD	rentgenstaru difraktometrija

PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

Tēmas aktualitāte

Kalcija fosfāti tiek plaši lietoti kā biomateriāli bojātu kaulaudu aizstāšanai, labošanai un atjaunošanai, jo tie ietilpst mūsu kaulu un zobu minerālās daļas sastāvā. Mūsdienās akcentēta nanoizmēra kalcija fosfātu, īpaši trikalcija fosfāta un hidroksilapatīta, kas lietojami kā kaulu aizvietotājmateriāli, izstrāde un pētniecība. Lai gan pēdējo gadu laikā rekonstruktīvā ķirurģija ir ievērojami progresējusi, nanoizmēra kalcija fosfāti var virzīt esošo progresu un nākotnē uzrādīt daudzsoļu klīnisko efektivitāti bojāto kaulaudu aizstāšanai, labošanai un atjaunošanai.^{1,2}

2012. gadā Pasaules Biomateriālu tirgus apjoms bija sasniedzis \$ 44,0 miljardus, 2017. gadā prognozēts tā pieaugums līdz \$ 88,4 miljardiem. Turklāt jaunākajā ziņojumā 2015. gada Pasaules Biomateriālu tirgus apjoms novērtēts ar \$ 62,1 miljardu, bet 2020. gadā prognozēts divkārtīgs tirgus apjoma pieaugums, kas ir \$ 130,6 miljardi.³ Katru gadu Biomateriālu tirgus daļu veido miljoniem pacienti, kuriem ir nepieciešami kaulu aizvietotājmateriāli, kas uzrāda tādas īpašības kā biosaderība¹, bioaktivitāte² un osteokonduktivitāte³.

Līdz ar pirmajiem pašcietējošiem trikalcija fosfātu kaulu cementiem, kas bija paredzēti dažādu kaulu defektu aizpildīšanai un labošanai slodzi nenesošās vietās, izmantojot minimāli invazīvas ķirurģiskās procedūras, aizsākās jauns biomateriālu virziens.^{1,7} Kad kaulu cementa cieto fāzi, α -trikalcija fosfāts (α -TCP), sajauc ar tā šķidro fāzi, ūdens vai sāļu šķīdumu, iegūtā pasta šķīšanas–nogulsnešanās reakciju rezultātā sacietē *in vivo*/dzīvā organismā, veidojot nestehiometrisku hidroksilapatītu ar kalcija deficītu.⁸ *In situ* apatīta nanokristālu nogulsnešanās nodrošina tāda biomateriāla izveidi, kura struktūra, ķīmiskais sastāvs un kristāliskums ir tuvs dabīgajam kaulam.⁹ Nanoizmēra α -TCP kā kaulu cementa cietā fāze paver iespēju izstrādāt jaunas paaudzes injicējamus un/vai veidojamus kaulu cementus, uzlabojot esošos trūkumus: injicējamība un/vai veidojamība, kā arī mehāniskās īpašības.

Kopš 2008. gada katru gadu miljoniem pacientu visā pasaulē ir ievietoti ortopēdiskie implantanti, kuri galvenokārt pārklāti ar kalcija fosfātiem, lai uzlabotu biosaderību un veicinātu kaulaudu augšanu uz implantmateriāla virsmas.¹⁰ 2020. gadā Amerikas Savienotajās valstīs prognozēts ievērojams skaists ortopēdisko operāciju: 3800 000 gūžas locītavu un virs 1500 000 ceļa locītavu endoprotezēšanas procedūru.¹¹ Biokompozītmateriālu pārklājumi, kas veidoti uz titāna un tā sakausējumu virsmas, iekļaujot nanoizmēra hidroksilapatītu biodegradējoša polimēra (hitozāna) matricā, veicina *in situ* implantmateriāla un kaula šūnu savstarpējo mijiedarbību, kā rezultātā notiek šūnu proliferācija (dalīšanās/vairošanās), diferenciācija (funkcionāla pilnveidošanās) un ekstracelulārās matricas nostiprināšanās. Tāda veida pārklājumi uzrāda lielisku biosaderību, veicina šūnu adhēziju un proliferāciju, kā arī nodrošina vienmērīgu kaulaudu atjaunošanos.^{12,13}

Pētījuma mērķis un uzdevumi

Promocijas darba mērķis ir izstrādāt efektīvu sintēzes tehnoloģiju nanoizmēra kalcija fosfātu iegūšanai, kuru varētu mērogot uz liela apjoma rūpniecisko ražošanu.

– Raksturot nanoizmēra α -trikalcija fosfāta potenciālo pielietojumu kalcija fosfātu kaulu cementu cietās fāzes sastāvā.

– Raksturot nanoizmēra hidroksilapatīta un β -trikalcija fosfāta potenciālo pielietojumu biokompozītmateriālu pārklājumu izveidē.

¹ Biosaderība – biomateriāla īpašība, kas norāda materiāla saderību ar dzīvjiem audiem, nerada nevēlamas audu atbildes reakcijas un, ievietots organismā, nenodara tam kaitējumu.⁴

² Bioaktivitāte – aktīva mijiedarbība ar organismu, kuras rezultātā veidojas bioloģiskais apatīts, kas nodrošina ķīmisko sasaisti starp biomateriālu un dabīgo kaulu.⁵

³ Osteokonduktivitāte – biomateriāla spēja veicināt kaula augšanu.⁶

Darba mērķa īstenošanai izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Apkopot literatūrā esošo informāciju par kalcija fosfātiem un atspoguļot to attīstības tendences.
2. Izstrādāt un optimizēt nanoizmēra kalcija fosfātu iegūšanas metodi.
3. Izvērtēt iegūto nanoizmēra kalcija fosfātu fāžu sastāvu un mikrostruktūru.
4. Pētīt nanoizmēra α -TCP reaktivitāti.
5. Pētīt šūnu atbildes reakciju uz nestehiometrisku hidroksilapatītu ar kalcija deficītu, kas veidojies hidrolīzes rezultātā no nanoizmēra α -TCP.
6. Salīdzināt nanoizmēra hidroksilapatīta un β -TCP ietekmi uz biokompozītmateriālu pārklājumiem.
7. Pētīt biokompozītmateriālu pārklājumu *in vitro* bioaktivitāti.
8. Pētīt šūnu atbildes reakciju uz biokompozītmateriālu pārklājumiem.

Aizstāvāmās tēzes

1. Apstrādājot ACP etanolā, var iegūt tīru α -TCP, kas ir stabils temperatūru intervālā no 800 °C līdz 1000 °C.
2. Nanoizmēra tīrs α -TCP ūdens vai sāļu šķīduma iedarbībā ātrāk hidrolizējas nestehiometriskā hidroksilapatītā ar kalcija deficītu nekā augsttemperatūras cietvielu reakcijā sintezētais α -TCP.
3. Nanoizmēra HA un β -TCP (HA/ β -TCP = 70/30 wt %) iekļaušana hitozāna matricā, izmantojot elektroķīmiskās nogulsnešanas metodi, veido biokompozītmateriālu pārklājumu, kas uzrāda visaugstāko *in vitro* bioaktivitāti un šūnu atbildes reakciju salīdzinājumā ar hitozāna pārklājumu.

Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti

Izstrādāta un aprobēta efektīva sintēzes tehnoloģija nanoizmēra trikalciya fosfāta un hidroksilapatīta iegūšanai. Izpētīti nanoizmēra kalcija fosfātu potenciālie pielietojumi: tīra α -TCP kā kalcija fosfātu kaulu cementu cietās fāzes sastāvdaļa, kā arī nanoizmēra HA un β -TCP kā pildvielas biopolimēra matricā.

Iegūtie rezultāti atspoguļo jaunu paņēmieni, kā no amorfa kalcija fosfāta var iegūt tīru α -TCP, un šis atklājums nodrošina ātrāku ceļu uz kalcija fosfātu kaulu cementiem. Ir noskaidrots, ka iegūtās tīrās α -TCP nanodaļiņas nav nepieciešams papildus malt, lai sasniegtu nepieciešamo reaktivitāti sacietēšanas procesā. Tīrās α -TCP nanodaļiņas, kurām ir lielāks kristalītu izmērs un kas iegūtas pēc apstrādes ar etanolu, uzrādīja labu šūnu biosaderību. *Highlights:* Apstrāde ar etanolu nodrošina, ka tīrs α -TCP ir stabils temperatūru intervālā no 800 °C līdz 1000 °C (α -TCP modifikācijas veidošanās temperatūru intervāli: 600 °C līdz 850 °C un 1125 °C līdz 1400 °C). Nanoizmēra tīrs α -TCP uzrāda lielisku potenciālu divreiz ātrākai hidrolizācijai nestehiometriskā hidroksilapatītā ar kalcija deficītu nekā augsttemperatūras cietvielu reakcijā sintezētais α -TCP.

Līdz šim nav pētīta nanoizmēra HA un β -TCP iekļaušana hitozāna matricā, izmantojot elektroķīmisko nogulsnešanu. Iegūtie rezultāti parādīja funkcionālu biokompozītmateriālu pārklājumu uz titāna potenciālo dizainu, akcentējot pārklājuma *in vitro* bioaktivitāti un šūnu biosaderību. Nanoizmēra kalcija fosfātu iekļaušana hitozāna matricā nodrošināja strauju bioloģiskā apatīta slāņa veidošanos uz biokompozītmateriāla pārklājuma virsmas pēc iemērķšanas SBF, kā arī uzlaboja osteosarkomas šūnu piestiprināšanos un vārpstveida formas veidošanos. *Highlights:* HA iegūts arī no amorfa kalcija fosfāta, kas sintezēts, izmantojot alternatīvu fosfora avotu, amonija dihidrogēnfosfātu. Nanoizmēra HA, kas sintezēts, izmantojot amonija dihidrogēnfosfātu, un β -TCP (HA/ β -TCP = 70/30 wt %) iekļaušana hitozāna matricā uzrādīja visaugstāko *in vitro* bioaktivitāti un piemērotu šūnu atbildes reakciju, salīdzinot ar hitozāna pārklājumu.

Darba praktiskā nozīme

Izstrādātā un aprobētā sintēzes tehnoloģija nanoizmēra kalcija fosfātu iegūšanai var tikt uzskatīta kā pirmais solis, kurā noskaidroti pamatprincipi, lai turpinātu attīstīt jaunu pieeju nanoizmēra kalcija fosfātu – α -trikalcija fosfāta, β -trikalcija fosfāta un hidroksilapatīta – eksperimentālā ražošanā un izzināt to praktisko pielietojumu biomedicīnā.

Darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs ir uzrakstīts angļu valodā, tā apjoms 120 lappuses. Promocijas darbā ietverti 43 attēli, 18 tabulas, 35 vienādojumi, 17 pielikumi un literatūras sarakstu ar 254 avotiem.

Darba aprobācija un publikācijas

Par promocijas darba zinātniskajiem sasniegumiem un galvenajiem rezultātiem ziņots 8 starptautiskās konferencēs, publicētas 5 pilna teksta zinātniskās publikācijas un 8 recenzētas zinātniskās konferenču tēzes.

Raksti zinātniskajos žurnālos

1. **Vecbiskena L.**, et al. Inclusion of nano-sized calcium phosphates via electrochemical/electrophoretic deposition into chitosan matrix, *SCI journal*, 2016. (*ieniegšanas procesā*)
2. **Vecbiskena L.**, Gross K.A., Riekstina U., Yang C.K.T. Formation of calcium-deficient hydroxyapatite via hydrolysis of nano-sized pure α -tricalcium phosphate, *Adv. Mater. Res.*, 1117, 2015, pp. 201–204.
3. **Vecbiskena L.**, Gross K.A., Riekstina U., Yang C.K.T. Crystallized nano-sized alpha-tricalcium phosphate from amorphous calcium phosphate: microstructure, cementation and cell response, *Biomed. Mater.*, 10, 2015, pp. 1–10. (*Scopus*)
4. **Vecbiskena L.**, De Nardo L., Chiesa R. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications, *Key Eng. Mater.*, 604, 2014, pp. 212–215. (*Scopus*)
5. **Vecbiskena L.**, Berzina-Cimdina L., Gross K.A. Influence of the tricalcium phosphate phase on the mechanical strength and biocompatibility of calcium phosphate bone cements, *Eur. Cell. Mater.*, 23 (Suppl 3), 2012, S54.
6. Irbe Z., **Vecbiskena L.**, Berzina-Cimdina L. Setting Properties of Brushite and Hydroxyapatite Compound Cements, *Adv. Mater. Res.*, 222, 2011, pp. 239–242. (*Scopus*)

Raksti pilna teksta konferenču rakstu krājumā

1. **Vecbiskena L.** Biodegradable polymer–bioceramic composite coatings. *Proceedings of International Conference of Lithuanian Chemical Society: Chemistry and Chemical Technology 2015*, Vilnius, Lithuania, 23 Jan 2015, pp. 158–161. (ISBN 978-609-459-461-8)
2. **Vecbiskena L.**, Gross K.A., Riekstina U., Sung-Wei Y., Yang T.C.K. Formation of calcium-deficient hydroxyapatite via hydrolysis of nano-sized pure α -tricalcium phosphate. *INTER ACADEMIA 2014: 13th International Conference on Global Research and Education*, Riga, Latvia, 10–12 Sep 2014, pp. 212–213. (RTU Press, Riga, Latvia, ISBN 978-9934-10-583-8)
3. **Vecbiskena L.**, Altomre L., Chiesa R., De Nardo L. Calcium phosphate biocomposite coatings on titanium. *I Materiali Biocompatibili Per La Medicina – SIB 2014: Convegno Nazionale della Societa Italiana Biomateriali*, Palermo, Italy, 2–4 Jul 2014, pp. 307–310. (Universitas Studiorum S.r.l., Mantova, Italy, ISBN 978-88-97683-52-0)

Darba rezultāti prezentēti šādās konferencēs

Dalība ar mutisko referātu

1. **Vecbiskena L.** *In vitro* bioactivity and cell response to calcium phosphate biocomposites for bone regeneration. *Abstracts of COINS 2015 – 10th International Conference of Natural and Life Sciences*, Vilnius, Lithuania, 3–7 Mar 2015, pp. 46–46.
2. **Vecbiskena L.**, Altomare L., Chiesa R., De Nardo L. The effect of electrochemical deposited chitozan–nanostructured calcium phosphate coatings on titanium. *Abstracts of the 55th International Scientific Conference of Riga Technical University*, Riga, Latvia, 14–17 Oct 2014, pp. 64–64.
3. **Vecbiskena L.**, Gross K.A., Riekstina U., Yang T.C.K. Nano-sized α -tricalcium phosphate for bone cement. *26th European Conference on Biomaterials*, Liverpool, UK, 31 Aug – 3 Sep 2014, pp. 608–608. (*personally invited by Dr. Nick Rhodes and Prof. John Hunt, University of Liverpool to give an oral presentation in the session: Bone III, 2 Sep 2014, at 9:15 am*)
4. **Vecbiskena L.**, Altomre L., Chiesa R., De Nardo L. Calcium phosphate biocomposite coatings on titanium. *I Materiali Biocompatibili Per La Medicina – SIB 2014: Convegno Nazionale della Societa Italiana Biomateriali*, Universitas Studiorum S.r.l., Palermo, Italy, 2–4 Jul 2014, pp. 307–310.
5. **Vecbiskena L.**, Chiesa R. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications. *Abstract book of BALTMATTRIB 2013 – 22nd International Baltic Conference of Engineering Materials & Tribology*, Riga, Latvia, 14–15 Nov 2013, pp. 33–33.

Dalība ar stenda referātu

1. **Vecbiskena L.** Biodegradable polymer–bioceramic composite coatings. *Proceedings of International Conference of Lithuanian Chemical Society: Chemistry and Chemical Technology 2015*, Vilnius, Lithuania, 23 Jan 2014, pp. 158–161.
2. **Vecbiskena L.**, Gross K.A., Riekstina U., Sung-Wei Y., Yang T.C.K. Formation of calcium-deficient hydroxyapatite via hydrolysis of nano-sized pure α -tricalcium phosphate. *INTER ACADEMIA 2014 – 13th International Conference on Global Research and Education*, Riga, Latvia, 10–12 Sep 2014, pp. 212–213. (*Inter-Academia 2014 Young Researcher Award*)
3. **Vecbiskena L.**, Gross K.A., Riekstina U., Yang T.C.K. Nano-sized α -tricalcium phosphate for bone cement. *26th European Conference on Biomaterials*, Liverpool, UK, 31 Aug – 3 Sep 2014, pp. 608–608.
4. **Vecbiskena L.**, Gross K.A., Berzina-Cimdina L. Influence of the tricalcium phosphate phase on the mechanical strenght and biocompatibility of calcium phosphate bone cements. *GRIBOI 2012 – 22th Interdisciplinary Research Conference on Injectable Biomaterials*, Uppsala, Sweden, 10–12 May 2012, pp. 27–27.

LITERATŪRAS APSKATS

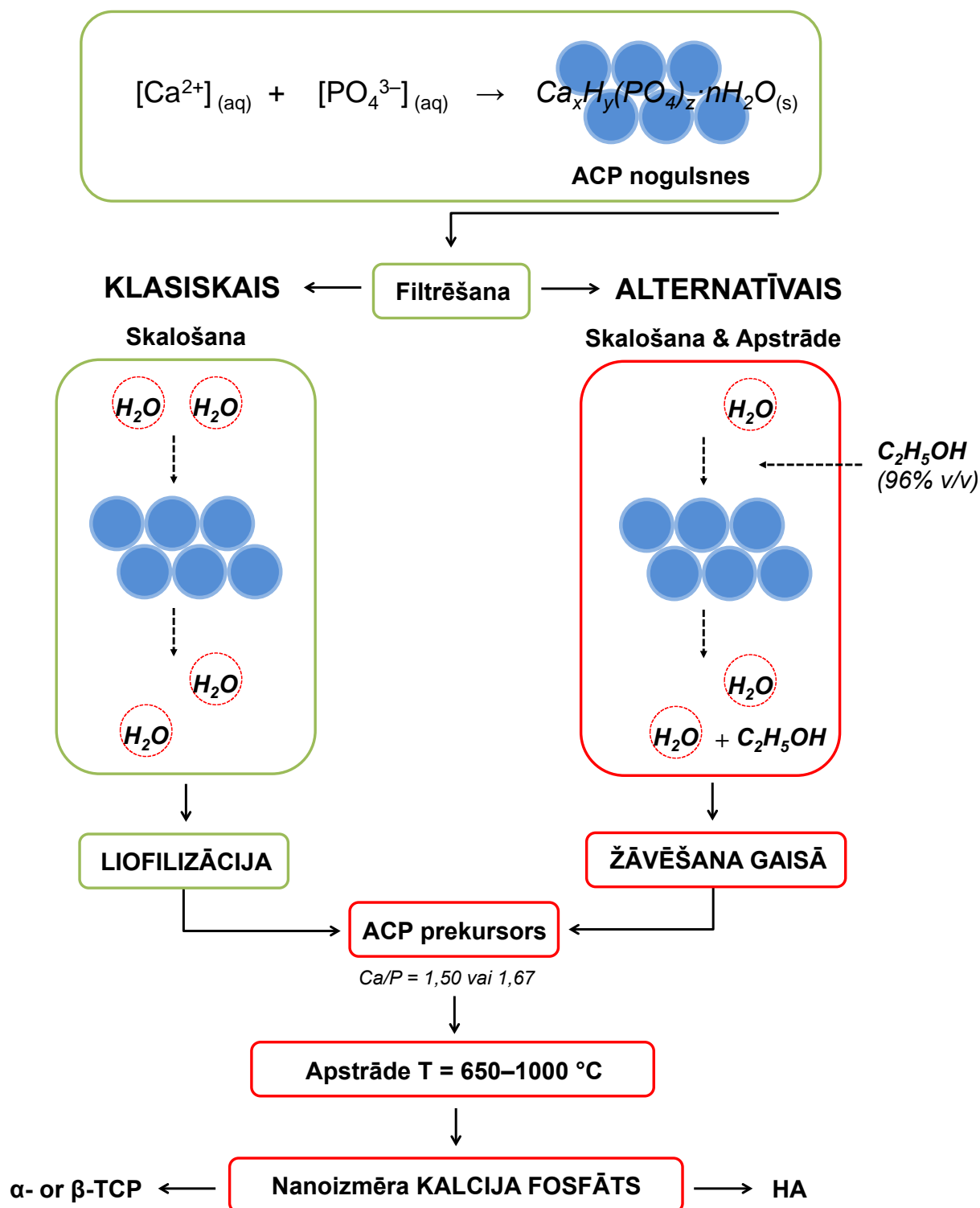
Ļoti daudz pētījumu publicēti par bioaktīvajiem kaulaudu aizvietotājmateriāliem, kalcija fosfātu biokeramiku, kaulu cementiem un pārklājumiem, tomēr joprojām pastāv iespēja tos attīstīt un pilnveidot. Izvērtējot pieaugošo interesi kaulaudu inženierijā, to attīstība un uzlabošana jāpanāk tā, lai biomateriālu struktūra un kompozīcija ir pēc iespējas tuvāka dabīgajam kaulam, kas nodrošinātu labāku kaulaudu reģenerāciju. Klīnisko pētījumu rezultātā noskaidrots, ka nepieciešami jauni biomateriāli bojātu kaulaudu aizvietošanai un atjaunošanai, lai aktīvāk veicinātu to reģenerāciju destruktīvos, ķirurģiskos un traumatiskos nolūkos.

Dažādas sintēzes metodes tiek piedāvātas kalcija fosfātu iegūšanai.^{14–16} Galvenokārt kalcija fosfātu pulveri var tik sintezēti, izmantojot “slapjās” un “sausās” ķīmiskās metodes. Šķīduma ķīmiskās nogulsnešanas metode, izmantojot kalcija un fosfāta jonus saturošus šķīdumus, ir

visbiežāk lietotā, jo pielāgojama kalcija fosfātu iegūšanai lielos apjomos. Tā ir arī relatīvi vienkārša, ekonomiski izdevīga un viegli pielāgojama dažādu kalcija fosfātu produktu sintēzei.

EKSPERIMENTĀLĀ SHĒMA

Nanoizmēra kalcija fosfāti – amorfais kalcija fosfāts, α - un β -trikalcija fosfāti, kā arī hidroksilapatīts – sintezēti, izmantojot šķīduma ķīmisko nogulsnes metodes. Kopējais sintēzes tilpums bija 400 mL, kas deva apmēram 10 g produkta. Nanoizmēra kalcija fosfātu iegūšanas eksperimentālā shēma parādīta 1. att.



1. att. Nanoizmēra kalcija fosfātu iegūšanas eksperimentālā shēma.

Nanoizmēra kalcija fosfātu iegūšanas paņēmieni sastāv no 4 galvenajiem soļiem: (A) ķīmiskā nogulsnešanās, (B) nogulšņu apstrāde, (C) nogulšņu karsēšana temperatūru intervālā no 650 °C līdz 1000 °C, (C) iegūtā gala produkta analīze (galvenokārt noteikts fāžu sastāvs (XRD un FTIR) un morfoloģija (SEM)). Iegūtajiem gala produktiem atrasts potenciālais lietojums: nanoizmēra α -TCP lietots kā kalcija fosfātu kaulu cementa cietā fāze, savukārt nanoizmēra β -TCP and HA – kā bioaktivitātes uzlabotāji biokompozītmateriālu pārklājumā. Turklāt nanoizmēra hidroksilapatīts var tik sintezēts, izmantojot amonija dihidrogēnfosfātu. Amorfā kalcija fosfāta prekursoru sintēzes nosacījumi apkopoti 1. tab.

1. tabula

Amorfā kalcija fosfāta prekursoru sintēzes nosacījumi

	Molārā attiecība (Ca/P)	$c([\text{Ca}^{2+}])^{[a]}$ (M)	$c([\text{HPO}_4^{2-}])^{[b]}$ (M)	$c([\text{H}_2\text{PO}_4^-])^{[c]}$ (M)	$pH([\text{Ca}^{2+}] + [\text{PO}_4^{3-}])^{[e]}$
HA I	tuvu 1,67	0,30	0,22 ^[d]	–	~10,00
HA II		0,30	–	0,25 ^[d]	~10,00
TCP	tuvu 1,50	0,30	0,24	–	~10,00

^[a] $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (*Sigma-Aldrich*, analītiski tīrs); ^[b] $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (*Sigma-Aldrich* vai *abcr GmbH*, analītiski tīrs); ^[c] $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (*Fluka*, analītiski tīrs); ^[d] $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, (*Sigma-Aldrich*, analītiski tīrs); ^[e] 26 % NH_4OH šķīdums (*Sigma-Aldrich*, analītiski tīrs).

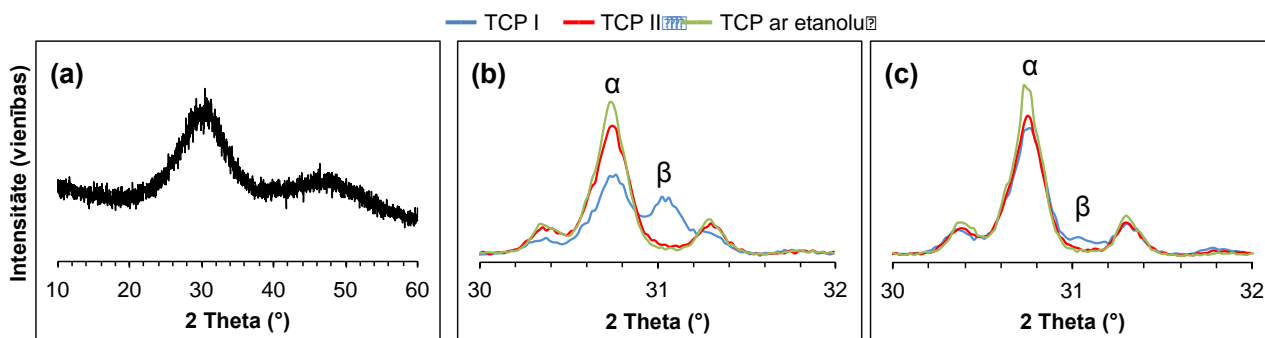
Amorfie HA un TCP prekursori iegūti, izmantojot šķīduma ķīmisko nogulsnešanu, izkrītot nogulsnēm no pārsātināta šķīduma (1. tab.). Kalcija nitrāta šķīdums pagatavots, izšķīdinot kalcija nitrāta tetrahidrātu dejonizētā ūdenī kopā ar 30 mL amonija šķīduma. Amonija fosfāta šķīdums pagatavots, izmantojot diamonija hidrogēnfosfātu vai amonija dihidrogēnfosfātu (HA I un HA II gadījumā pH iestatīts ar amonija karbonātu). Pagatavotie šķīdumi strauji samaisīti, pēc maisīšanas iegūtās nogulsnes filtrētas un skalotas ar dejonizētu ūdeni, kā arī apstrādātas ar etanolu (96 % v/v). Nogulsnes, kas skalotas ar ūdeni, liofilizētas (sintēzes tilpums bija 400 mL: TCP I; sintēzes tilpums bija 800 mL: TCP II), bet nogulsnes, kas apstrādātas ar etanolu, žāvētas gaisā 105 °C temperatūrā (sintēzes tilpums bija 400 mL: TCP ar etanolu; sintēzes tilpums bija 400 mL: HA I, HA II un β -TCP). Izzāvētie pulveri, TCP I, TCP II un TCP ar etanolu karsēti 10 min (uz platīna folijas) vai 20 min (korunda laiviņā) temperatūru intervālā no 675 °C līdz 1000 °C cilindriskajā krāsnī (*Ceramic Engineering*, Austrālija). Pēc karsēšanas pulveri nekavējoties izņemti no krāsns un strauji atdzesēti līdz istabas temperatūrai, izberot uz metāla virsmas vai ļaujot atdzist korunda laiviņā. HA I, HA II un β -TCP karsēti 60 min 850 °C vai 900 °C temperatūrā augsttemperatūras mufelkrāsnī (*Series Z1200, Colaver S.r.l.*, Itālija) un pēc tam atdzesēti līdz istabas temperatūrai.

PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI

1. Nanoizmēra α -trikalcijs fosfāta lietojums kaulu cementā

α -TCP tīrība atkarībā no sintēzes apstākļiem

α -TCP vai β -TCP var iegūt no amorfā kalcija fosfāta, kura Ca/P molārā attiecība ir tuva 1,5.^{17,18} 2. att. (a) redzama liofilizēta amorfā kalcija fosfāta rentgenstaru difraktogramma – plašs difrakcijas maksimums (rentgenamorfs), kas centrēts pie 30° un raksturīgs šķīdumā nogulsnētam ACP,¹⁹ ātri sakusušām kalcija fosfātu nanodaļiņām²⁰ vai mikrodaļiņām^{21,22} un kalcija fosfātu stikliem.²³



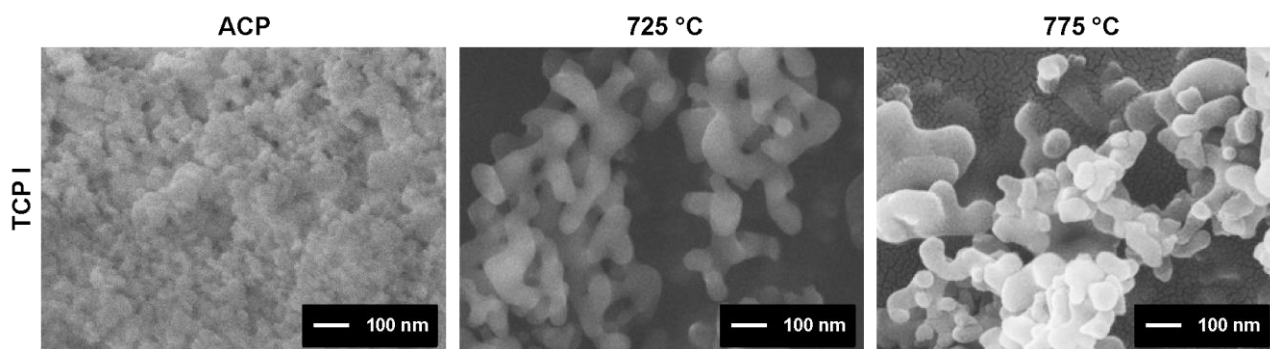
2. att. Amorfa kalcija fosfāta rentgenstaru difraktogramma (ACP rentgenstaru difraktogrammas visu sintēžu gadījumos bija vienādas); ACP rentgenstaru difraktogrammas pēc apstrādes (b) 725 °C un (c) 775 °C temperatūrā (α -TCP ar etanolu difrakcijas maksimuma intensitāte bija (b) 3663 un (c) 4142 vienības). Apzīmējumi: α = α -TCP, β = β -TCP.

Iegūts α -TCP and β -TCP maisījums, kristalizējot liofilizēto amorfo kalcija fosfātu (TCP I un TCP II), savukārt tīrs α -TCP – kristalizējot amorfo kalcija fosfātu, kas žāvēts gaisā (TCP ar etanolu). Alfa-TCP uzrādīja intensīvāko difrakcijas maksimumu pie 30,7°, bet β -TCP – vājākus difrakcijas maksimumus pie 31,0°, 25,8° un 27,7°, citas fāzes nav konstatētas (2. att. (b) un (c)). Iegūtās XRD difraktogrammas tika analizētas un salīdzinātas ar datu bāzē esošajām HA (JCPDS standarts 09-432) un β -TCP (JCPDS standarts 09-169).

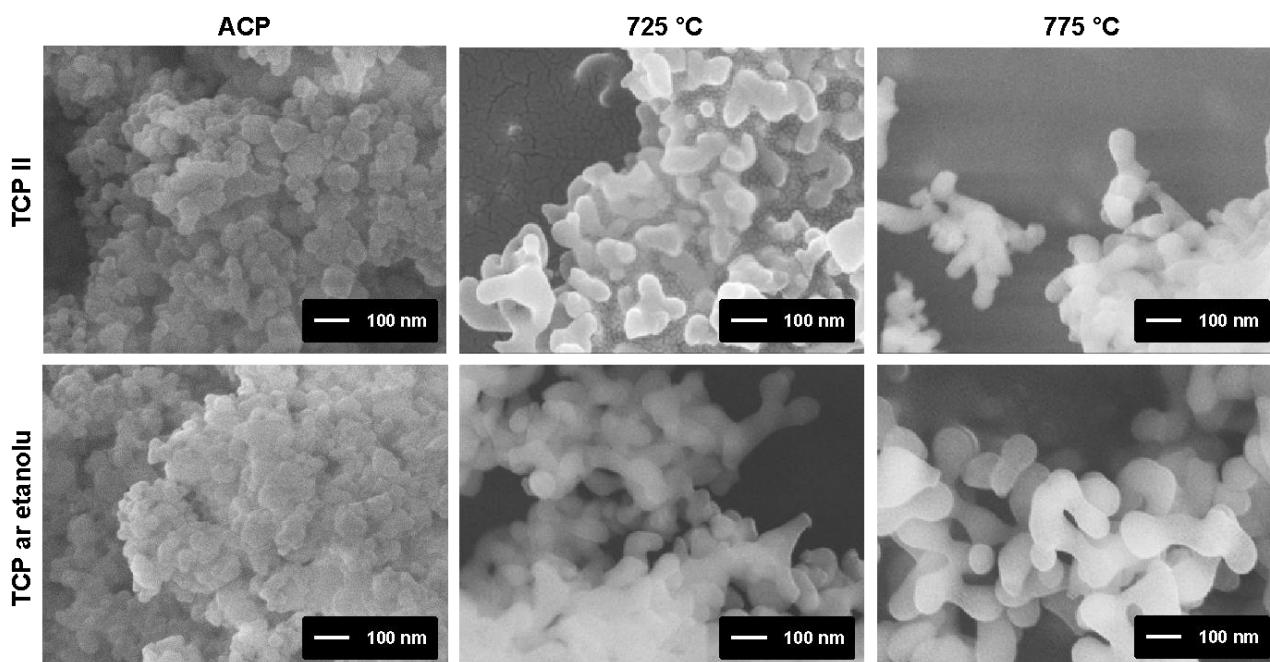
α -TCP tīrība atkarīga no kopējā sintēzes tilpuma, karsēšanas temperatūras un ACP apstrādes (ūdens vai etanols). Lielāks alfa daudzums konstatēts TCP pulveros, kas sintezēti 800 mL tilpumā (TCP II), savukārt, palielinot temperatūru no 700 °C līdz 775 °C, palielinās α -TCP daudzums (TCP I), līdzīgi kā *Somrani u.c.* pētījumā.²⁴ Neatkarīgi no sintēzes tilpuma un karsēšanas temperatūras, tīrs α -TCP iegūts pēc apstrādes ar etanolu un karsēšanas 700 °C līdz 800 °C temperatūrā. Alfa fāze var saglabāties augstākās temperatūrās,¹⁷ bet tas nav pētīts šeit, jo, palielinot temperatūru, palielinās arī graudu izmēri.²⁵

Nanodaļiņu veidošanās

α -TCP, kas iegūts augstās temperatūrās (>1100 °C), jāmaļ, lai panāktu nepieciešamo īpatnējās virsmas laukumu un reaktivitāti, bet šis izvēlētais process nodrošina lielu īpatnējās virsmas laukumu un reaktivitāti pēc karsēšanas 700 °C līdz 800 °C temperatūrā. Platie difrakcijas maksimumi liecina par mazu kristālitu izmēru, un tikai visintensīvāko α -TCP difrakcijas maksimumu pie 2θ , kas ir 30,7°, var izmantot mērījumiem.^{26,27} Kristālitu izmērs, kas aprēķināts, izmantojot *Rietveld* analīzi, palielinājās līdz ar karsēšanas temperatūru no 50 nm līdz 100 nm un bija salīdzināms ar daļiņu izmēru SEM attēlos (3. att.).



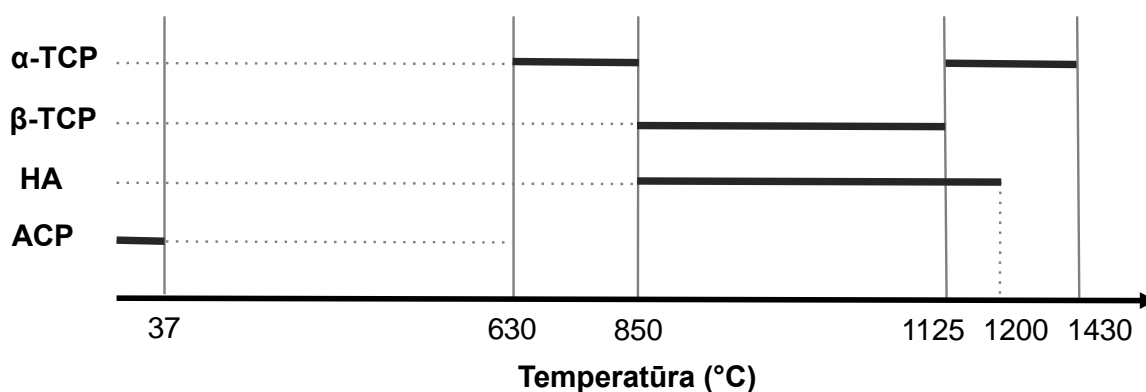
3. att. ACP morfoloģija pirms un pēc apstrādes 725 °C un 775 °C temperatūrā.



3. att. ACP morfoloģija pirms un pēc apstrādes 725 °C un 775 °C temperatūrā (turpinājums).

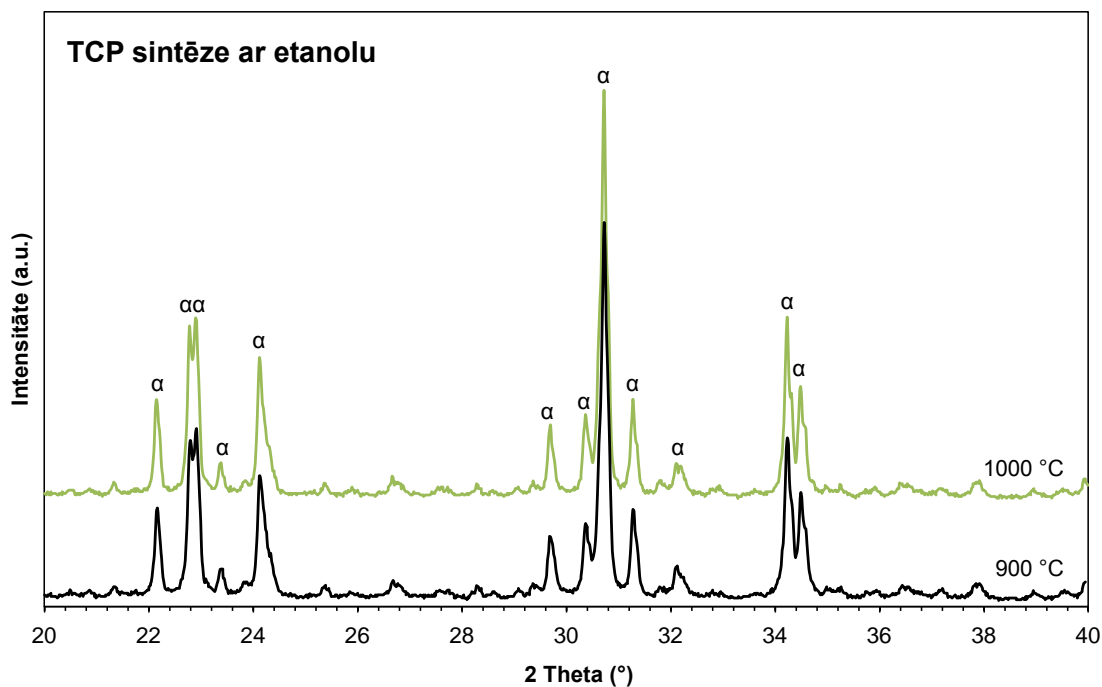
α -TCP stabilitāte etanola ietekmē

α -TCP un β -TCP ir augsttemperatūras kristāliskās modifikācijas, kuras nav iespējams nogulsnēt ūdens šķīdumos. Tās var iegūt, termiski sadalot nestehiometrisku hidroksilapatītu ar kalcija deficītu (Ca/P attiecība ir 1,50) vai augsttemperatūras cietvielu reakcijās (temperatūrās >800 °C). β -TCP tiek raksturots kā stabilā modifikācija istabas temperatūrā, turpeti α -TCP – kā metastabilā (4. att.). α -TCP parasti iegūst, novēršot tā pāreju β -TCP, strauji dzesējot no termiski stabilā temperatūru intervāla. Lai gan *Somrani u.c.* atklāja modifikāciju maiņu no alfa uz beta 900 °C temperatūrā, karsējot amorfo kalcija fosfātu,²⁴ joprojām pastāv iespēja iegūt alfa modifikāciju temperatūru intervālā no 800°C līdz 1100 °C.



4. att. Kalcija fosfātu veidošanās (melnās līnijas) temperatūru intervāli.^{28,29}

Analizējot TCP ar etanolu XRD difraktogrammas, var secināt, ka iegūts tīrs α -TCP, ja karsē ar etanolu apstrādātu ACP temperatūrās, kas augstākas par 800 °C (2. tab. un 5. att.). α -TCP stabilitāti nodrošināja apstrāde ar etanolu. Organiskais šķīdinātājs samazināja brīvo ūdeni uz klastera virsmas, izveidojot ūdeņraža saites starp ūdens molekulām un etanola molekulām; iespējams, ka etanola molekulas daļēji aizvietoja ūdens molekulas uz klastera virsmas (6. att.). Tā rezultātā izmainījās amorfās fāzes saišu stāvoklis. Kopš tīrs α -TCP konstatēts temperatūru intervālā no 800 °C līdz 1100 °C, var apgalvot, ka atlikušās etanola molekulas uz klastera virsmas stabilizēja alfa fāzi.



5. att. ACP rentgenstaru difraktogrammas pēc apstrādes 900 °C un 1000 °C temperatūrā (TCP ar etanolu difrakcijas maksimuma intensitāte bija attiecīgi 4521 un 4873 vienības).
Apzīmējumi: α = α -TCP.

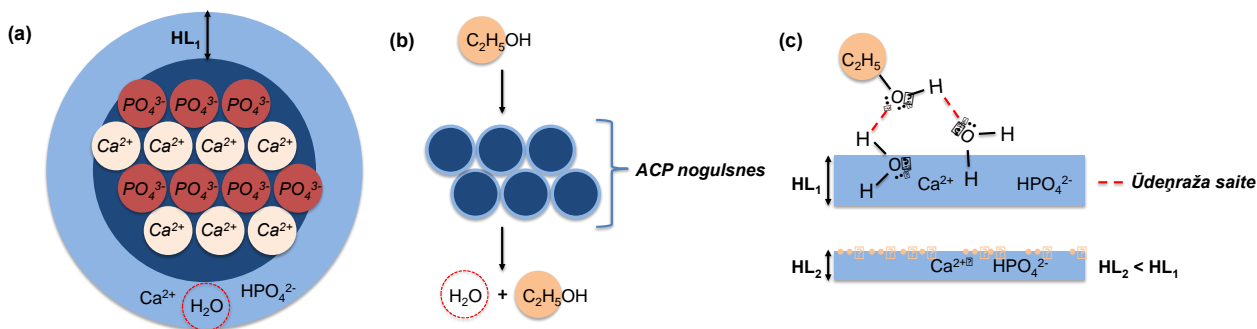
Tīrs α -TCP iegūts, ja ar etanolu apstrādātu ACP karsē 775 °C temperatūrā un ļauj tam atdzist līdz istabas temperatūrai korunda laiviņā. Ūdens mijiedarbība ar kalcija fosfātu var tikt interpretēta kā sasaiste ar hidratācijas apvalku ap amorfo kalcija fosfāta klasteri, kas viegli piesaista dažādas ķīmiskās vielas³⁰ (6. att. (a)). Etanola sasaistīšanās ar ūdens molekulām samazina fosfāta jonu mijiedarbību ar ūdeni (6. att. (b)), kā rezultātā samazinās hidratācijas apvalks un ūdens sasaistīšanās ar kalcija fosfātu (6. att. (c)). Kopš iegūts tīrs α -TCP, karsējot etanolā apstrādātu ACP, nogulšņu apstrāde ar etanolu var tikt uzskatīta par svarīgu soli pirms karsēšanas procesa.

2. tabula

Nanoizmēra α -TCP ar etanolu kristalītu izmērs pēc apstrādes 800 °C līdz 1000 °C

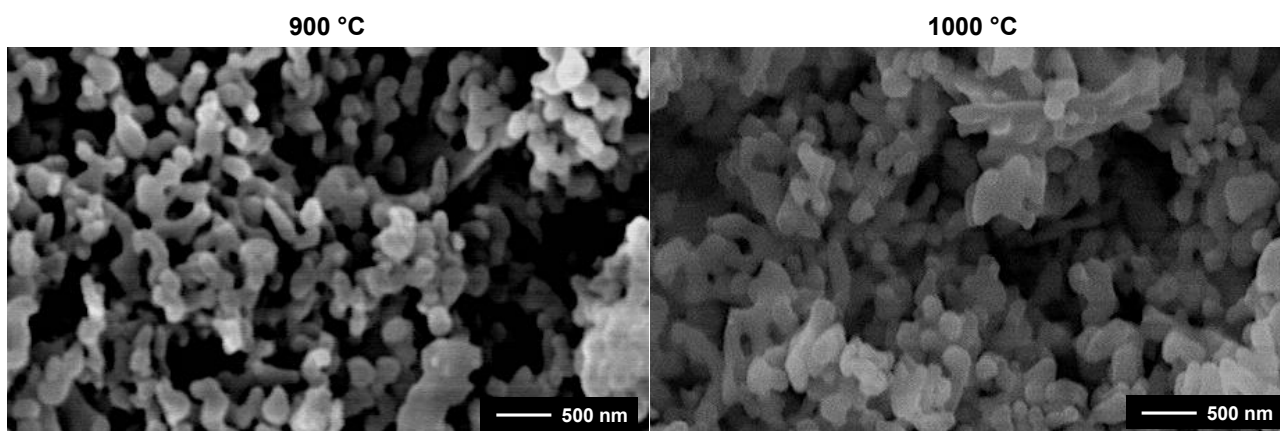
Temperatūra (°C)	α -TCP daudzums (wt %)*	Kristalītu izmērs (nm)*
800	99	113
900	99	123
1000	98	135

*Aprēķināts, izmantojot *Rietveld* analīzi



6. att. Vispārīgā shēma, kas attēlo etanola ietekmi: (a) ACP klasteris pārklāts ar hidratācijas apvalku, kas satur Ca^{2+} un HPO_4^{2-} jonus; (b) ACP klasteris apstrādāts etanolā; (c) hidratācijas apvalka samazināšanās etanola un ūdens molekulu savstarpējā mijiedarbības rezultātā (HL – hidratācijas apvalks).

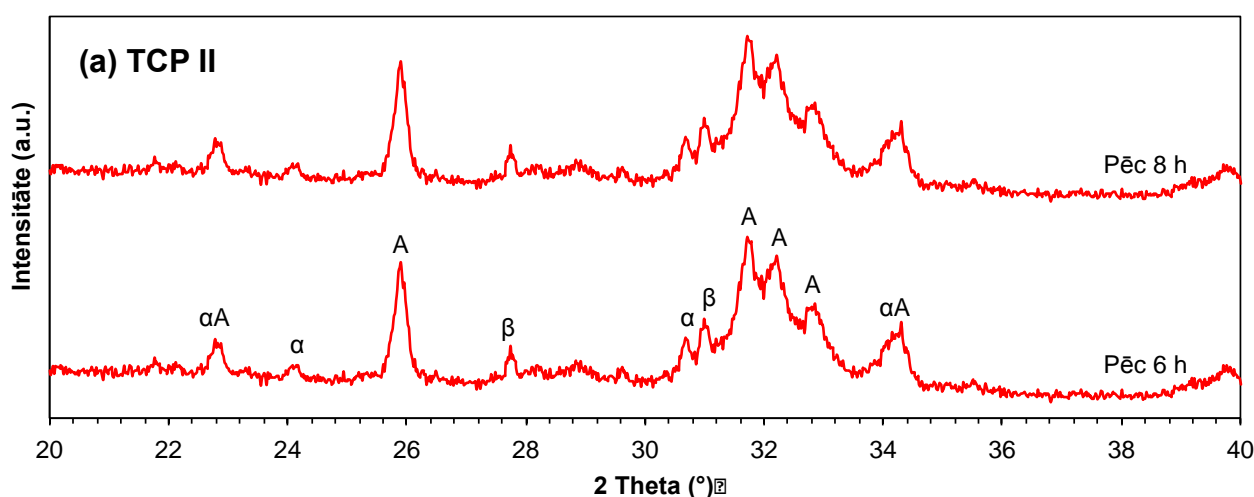
ACP ar etanolu morfoloģija pēc apstrādes 900 °C un 1000 °C temperatūrā parādīta 7. att. Individuālas sfēriskas daļiņas (apmēram 50 nm diametrā, 3. att.) temperatūras ietekmē ir transformējušās garākās daļiņas, un, tām saķepot, izveidojies nanoizmēra α -trikalcijs fosfāts. Kristālītu izmērs, kas aprēķināts, izmantojot *Rietveld* analīzi, palielinājās līdz ar karsēšanas temperatūru (2. tab.) un bija salīdzināms ar daļiņu izmēru SEM attēlos (7. att.).



7. att. ACP ar etanolu morfoloģija pēc apstrādes 900 °C un 1000 °C temperatūrā.

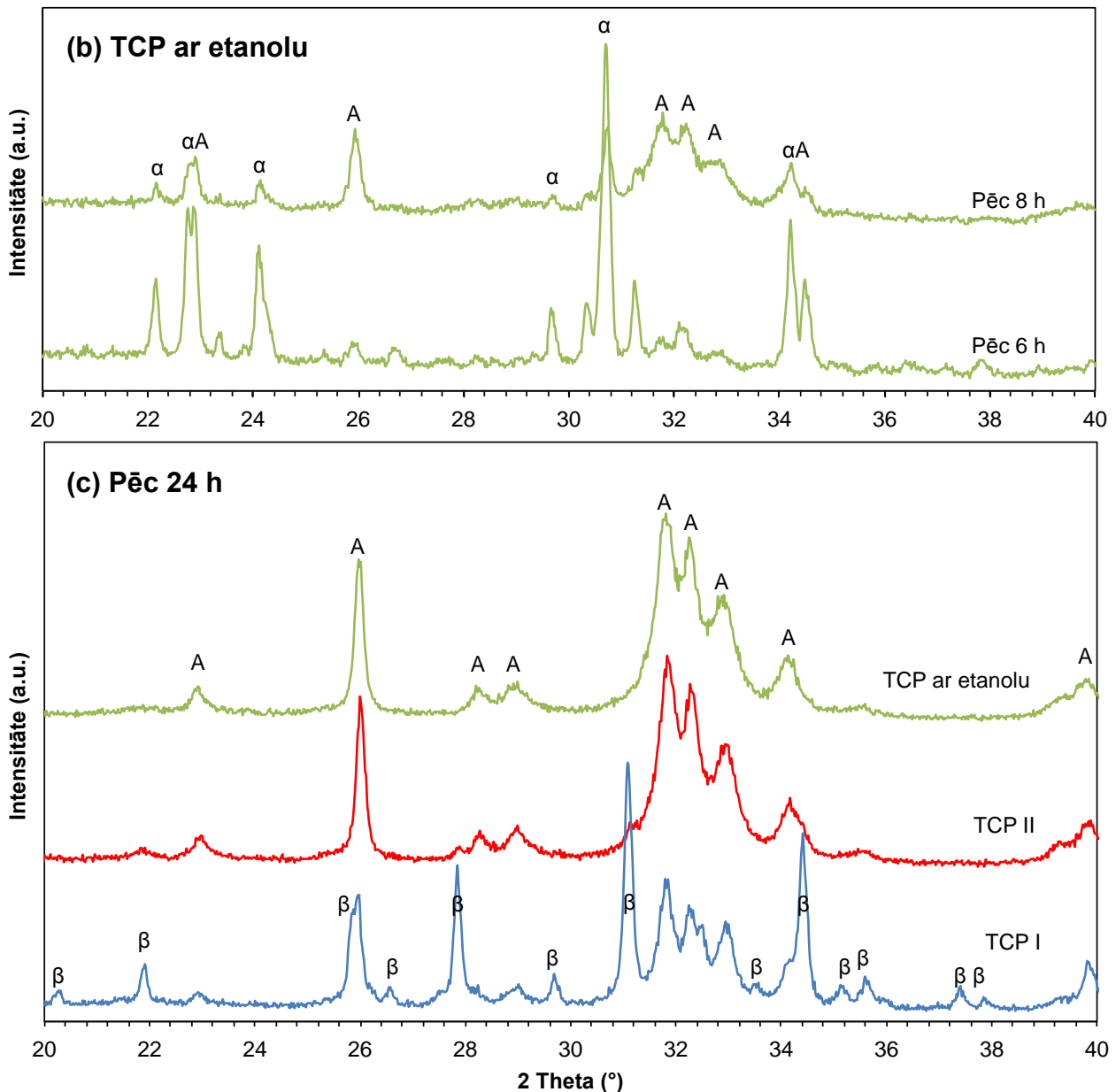
α -TCP hidrolīze nestehiometriskā hidroksilapatītā ar kalcija deficītu

α -TCP, kas iegūts augsttemperatūras (~1300 °C) cietvielu reakcijā, ir ar mazu virsmas laukumu un zemu reakcijas spēju ūdenī vai sāļu šķīdumā. Tāpēc jāizmanto dažādi paņēmieni, lai sasniegtu klīniski vēlamo sacietēšanas laiku,²⁹ kurā α -TCP ūdens vai sāļu šķīduma iedarbībā ātrāk hidrolizējas nestehiometriskā hidroksilapatītā ar kalcija deficītu. Citos pētījumos ir noskaidrots, ka tad, kad cementa cieto fāzi sajauc ar tā šķīdno fāzi, iegūtā pasta sacietē 5 min līdz 15 min laikā, bet α -TCP hidrolīze nestehiometriskā hidroksilapatītā ar kalcija deficītu notiek 15 h līdz dažu dienu laikā.^{31,32} Šajā pētījumā liofilizētā α -TCP (tā sastāvā konstatēts 7 % līdz 15 % β -TCP) hidrolīze nestehiometriskā hidroksilapatītā ar kalcija deficītu konstatēta pēc 6 h (8. att. (a)), bet tīra α -TCP – pēc 8 h (8. att. (b)). Reakcijas laiks ir divas reizes īsāks, salīdzinot ar α -TCP (sastāvā 5 % līdz 15 % β -TCP), kas iegūts 1300 °C temperatūrā un malts planetārajās bumbu dzirnavās.^{31,32}



8. attēls. α -TCP hidrolīze nestehiometriskā hidroksilapatītā ar kalcija deficītu.

Apzīmējumi: A = apatīts, α = α -TCP, β = β -TCP.

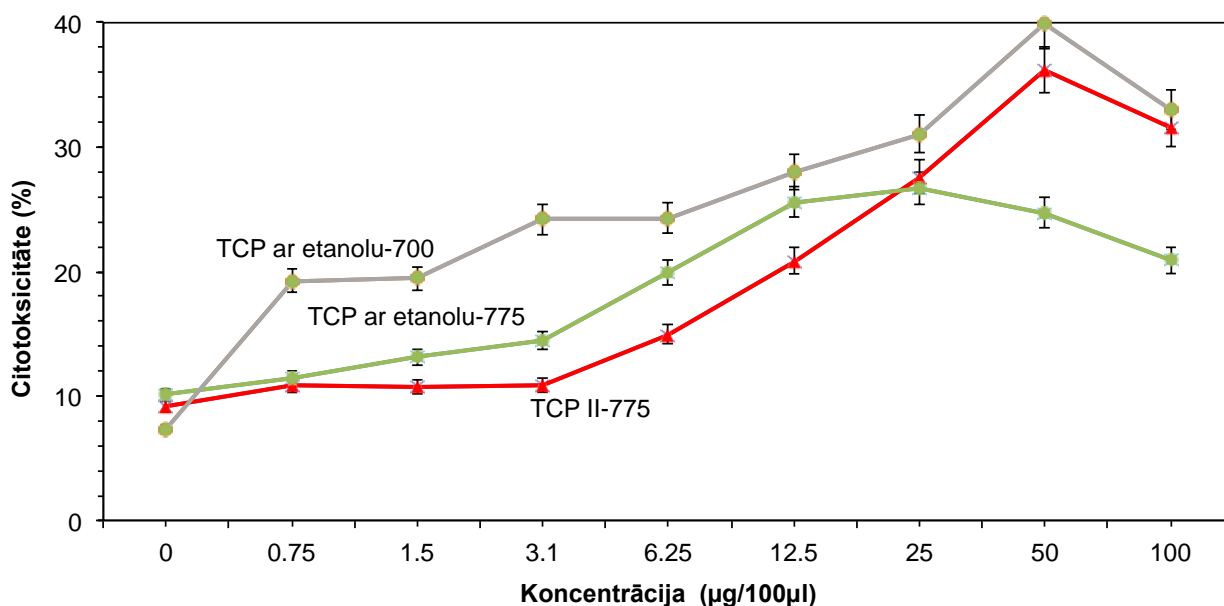


8. att. α -TCP hidrolīze nestehiometriskā hidroksilapatītā ar kalcija deficītu (turpinājums).
Apzīmējumi: A = apatīts, α = α -TCP, β = β -TCP.

α -TCP hidrolīzes laiks ir atkarīgs no pulvera iegūšanas tehnoloģijas. Ātrāka α -TCP pulvera ar β -TCP piemaisījumu hidrolīze varētu tikt izskaidrota ar heterogēno kristalizāciju, kuras rezultātā α -TCP ātrāk hidrolizējas nestehiometriskā hidroksilapatītā ar kalcija deficītu. Tomēr *Ginebra u.c.* apgalvo, ka β -TCP neietekmē šķīšanas–nogulsnešanās reakciju (pētījumā izmantots α -TCP ar 15 % β -TCP piemaisījumu).³² Ir zināms, ka etanols tiek lietots, lai aizkavētu kalcija fosfātu kaulu cementu sacietēšanas laiku,³³ tas varētu izskaidrot, kāpēc α -TCP, kas iegūts no etanolā apstrādāta ACP, nepieciešams ilgāks hidrolīzes laiks nestehiometriskā hidroksilapatītā ar kalcija deficītu.

Šūnu biosaderība

Pulveri ar augstāko α -TCP saturu tika testēti *in vitro* šūnu pārbaudēs ar mezenhimālajām cilmes šūnām, izmantojot laktādehidrogenāzes citotoksicitātes testu (*lactate dehydrogenase cytotoxicity assay*). Šūnas tika sētas 96 aiļu platēs. Pēc 24 h šūnām pievienoti pulvera paraugi (koncentrācija 1 mg/mL) un pēc tam inkubētas 72 h. Nanodaļiņu klātbūtne neietekmēja šūnu piestiprināšanos. Tīrs α -TCP pēc hidrolīzes DMEM/F12 barotnē, uzrādīja visaugstāko šūnu biosaderību (25 % citotoksicitāte koncentrācijā 0,5 mg/mL), kamēr paraugi, kas saturēja 7 % līdz 15 % β -TCP, uzrādīja paaugstinātu citotoksicitāti (līdz 40 % koncentrācijā 0,5 mg/mL, 9. att.). Visaugstāko šūnu biosaderību uzrādīja tīrs α -TCP pulveris, kas pēc ievietošanas DMEM/F12 barotnē, hidrolizējās tīrā, nestehiometriskā hidroksilapatītā ar kalcija deficītu (8. att. (c)).



9. att. *In vitro* citotoksicitāte pēc 72 h. Dati atspoguļo 5 paraugu vidējo standartnovirzi.

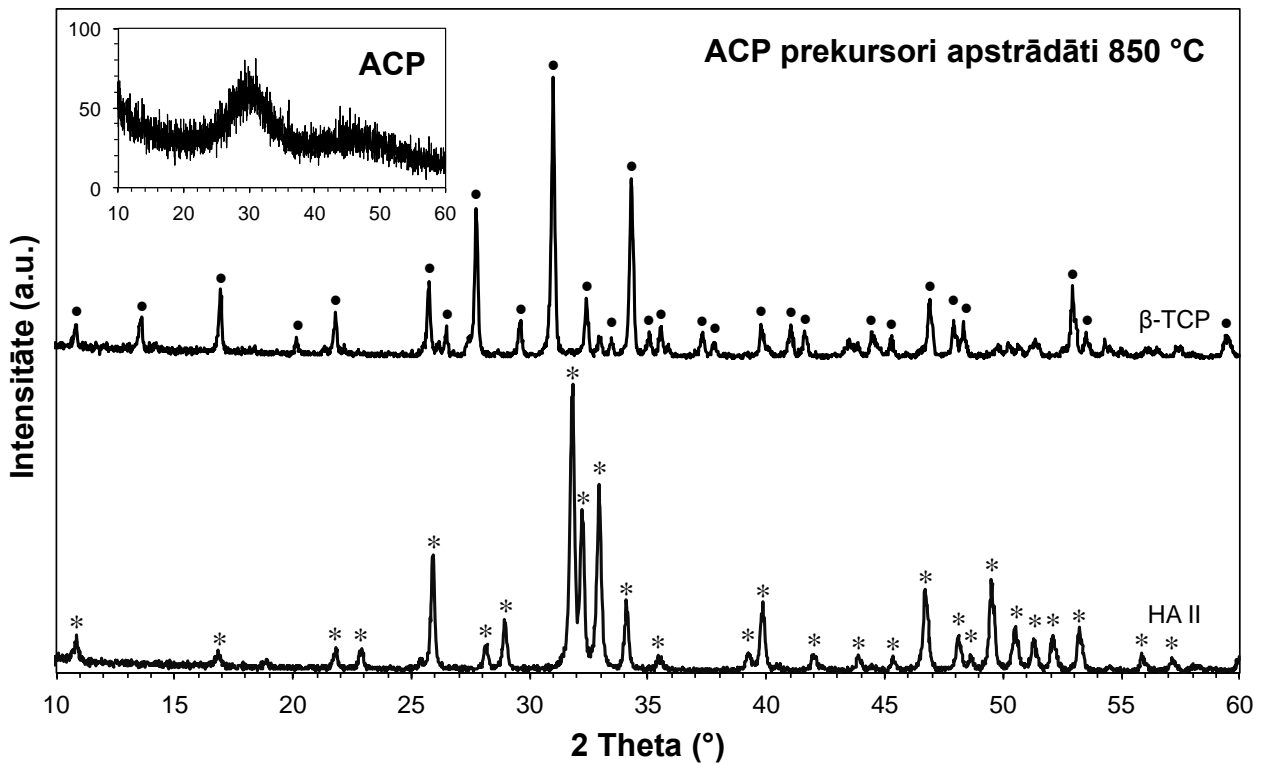
2. Nanoizmēra hidroksilapatīta un β -trikalcija fosfāta pielietojums biokompozītmateriāla pārklājumā

Hidroksilapatīta un β -trikalcija fosfāta izpēte

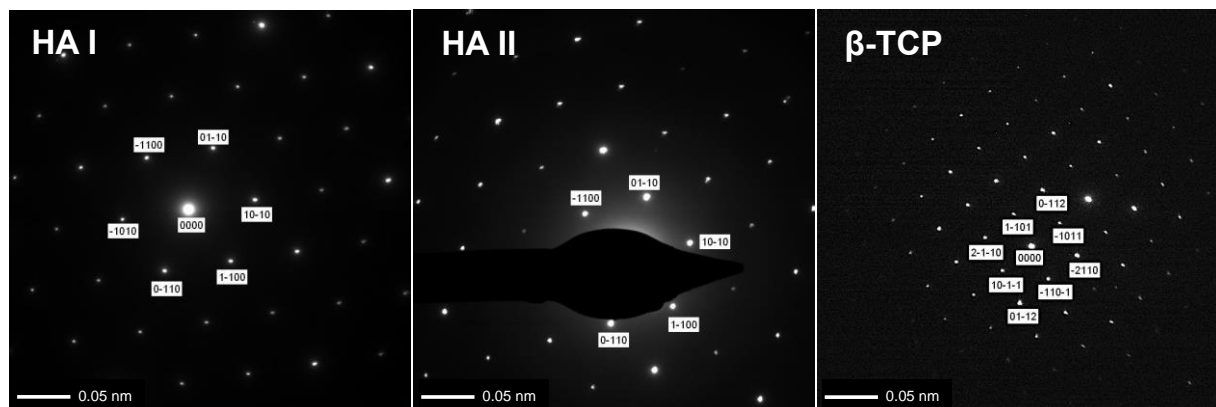
Plašie difrakcijas maksimumi (rentgenamorfis), kas centrēti pie 30° , apstiprināja, ka iegūti amorfi kalcija fosfātu prekursori (10. att. (a)).³⁴ Termiski apstrādājot amorfos kalcija fosfātu prekursorus 850°C temperatūrā, iegūts tīrs hidroksilapatīts un β -TCP. Par to liecina rentgenstaru difraktogrammas, kurās citas fāzes nav konstatētas (10. att. (b)). Iegūtās difraktogrammas tika analizētas un salīdzinātas ar datu bāzē esošajām HA (JCPDS standarts 09-432) un β -TCP (JCPDS standarts 09-169).

Lai apstiprinātu hidroksilapatīta struktūru HA I un HA II gadījumā, uzņemtas elektronu difrakcijas ainās, analizējot individuālus kristālus ar TEM (11. att.). Detektēta heksagonāla ($P6_3/m$) kristāla struktūra, kas atbilst apatītam;^{35,36} atšķirība starp $[0110]$ d -starpplakņu attālumu vērtībām bija 1 Å, respektīvi, HA I $[0110]$ d -starpplakņu attālums bija 4,5 Å, bet HA II – 4,6 Å. Savukārt detektēta trigonāla jeb romboedriskā (R3c) kristāla struktūra β -TCP gadījumā.³⁷

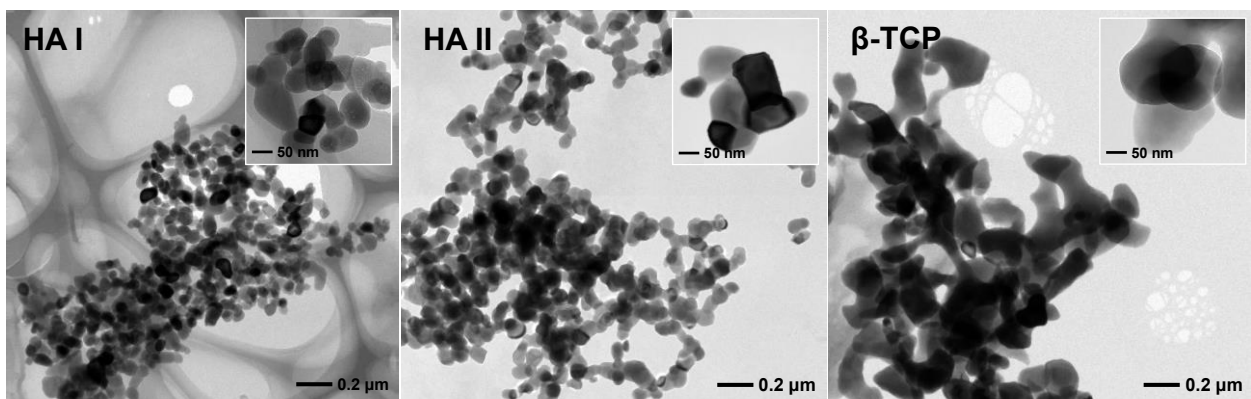
Nanoizmēra HA un β -TCP morfoloģija pēc apstrādes 850°C temperatūrā parādīta 12. att. Individuālas sfēriskas daļiņas 50 nm diametrā, kas raksturīgas amorfajai fāzei,³⁸ temperatūras ietekmē saņemot izveidojušas nanoizmēra HA un β -TCP. Hitozāna matricā iekļautas daļiņas, kuru izmēri ir robežās no 0,1 µm līdz apmēram 2 µm.



10. att. Amorfā kalcija fosfāta rentgenstaru difraktogramma (amorfā HA un β -TCP difraktogrammas uzrādīja vienādu ainu); ACP rentgenstaru difraktogrammas pēc apstrādes 850 °C (HA un β -TCP). Apzīmēti HA (*) un β -TCP (•) difrakciju maksimumi.



11. att. Nanoizmēra HA un β -TCP elektronu difrakcijas ainas pēc apstrādes 850 °C temperatūrā.

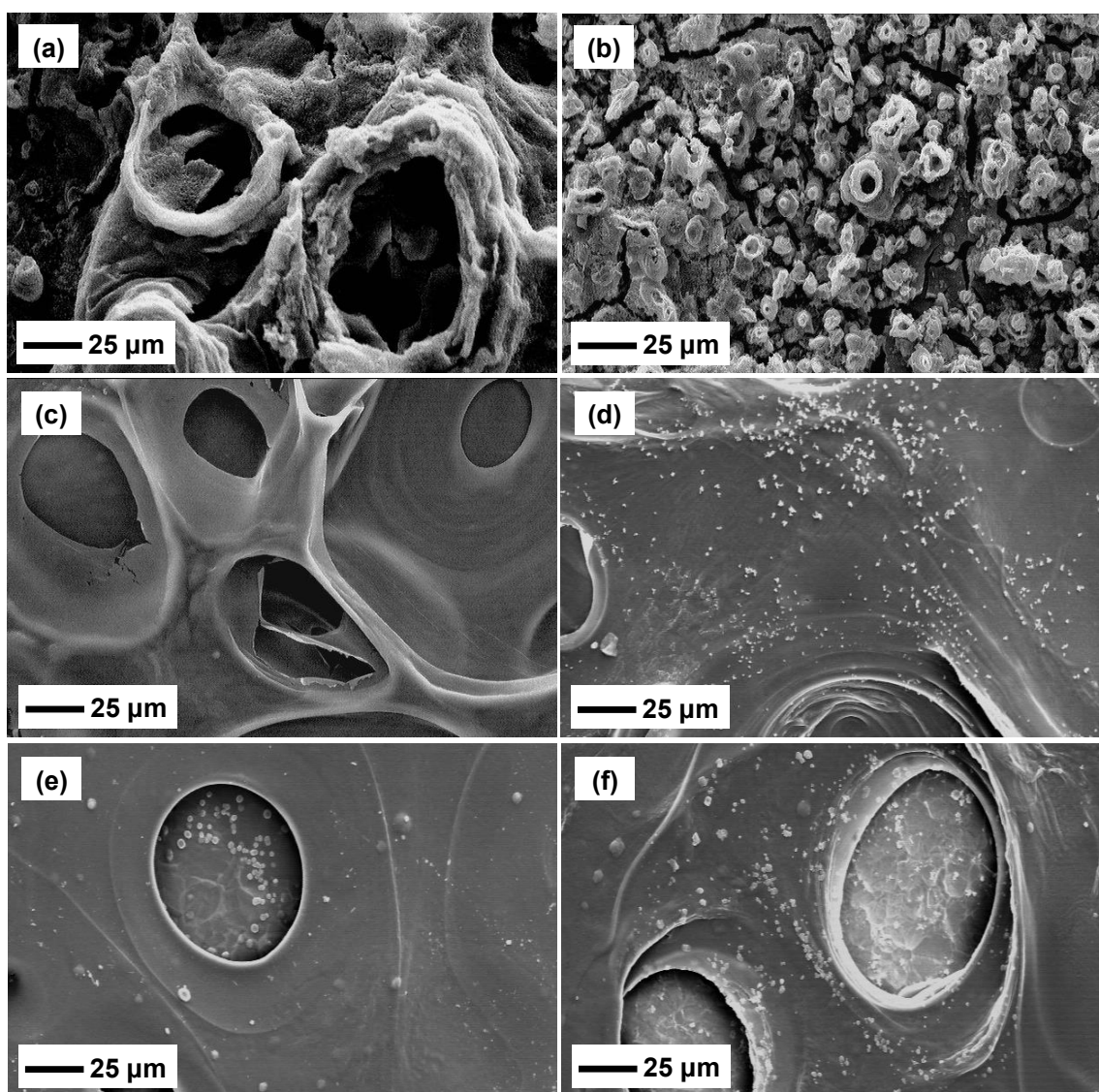


12. att. Nanoizmēra HA un β -TCP morfoloģija pēc apstrādes 850 °C temperatūrā.

Hitozāna-kalcija fosfātu pārklājumu morfoloģija

Iegūti homogēni CH-CaP pārklājumi uz titāna virsmas, izmantojot elektroķīmisko nogulsnešanu (13. att.). Elektroķīmiskā nogulsnešana veikta hitozāna–etiķskābes šķīdumā ($[CH] = 1 \text{ g/L}$, $pH = 3,50$),³⁹ kas satur 15 % vai 25 % [v/v] kalcija fosfātu šķīdumu (CaP: $[Ca^{2+}] = 0,42 \text{ M}$ un $[PO_4^{3-}] = 0,25 \text{ M}$; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ un $NH_4H_2PO_4$ (analītiski tīri)) un dejonizētā ūdenī disperģētas nanoizmēra kalcija fosfātu daļiņas (4 vol. % dejonizēts ūdens saturēja i. $[HA] = 0,05 \text{ g/L}$ līdz $0,40 \text{ g/L}$, ii. $[\beta\text{-TCP}] = 0,30 \text{ g/L}$ un iii. HA/ $\beta\text{-TCP} = 70/30 \text{ wt } \%$). Izmantotie šķīdumi apkopoti 3. tab.

Pārklājumi uzrādīja labu adhēziju pret titāna virsmu, izmantojot strāvu 30 mA cm^{-2} . Iegūto pārklājumu virsmas morfoloģija bija gluda, bet hitozāna matricā novērotas arī $50 \mu\text{m}$ līdz $100 \mu\text{m}$ lielas poras (13. att.). Atsaucoties uz *Altomare u.c.* pētījumu,³⁹ hitozāna pārklājuma biezums bija $50 \mu\text{m}$ (pārklājuma masa uz Ti virsmas – $1,50 \text{ mg uz cm}^{-2}$), izmantojot strāvu 20 mA cm^{-2} . Šajā darbā nav mērīts biokompozītmateriāla pārklājuma biezums, bet tas varētu būt ļoti līdzīgs – apmēram $50 \mu\text{m}$, ņemot vērā, kā pārklājuma masa uz Ti virsmas bija $1,50 \text{ mg uz cm}^{-2}$, izmantojot strāvu 30 mA cm^{-2} .



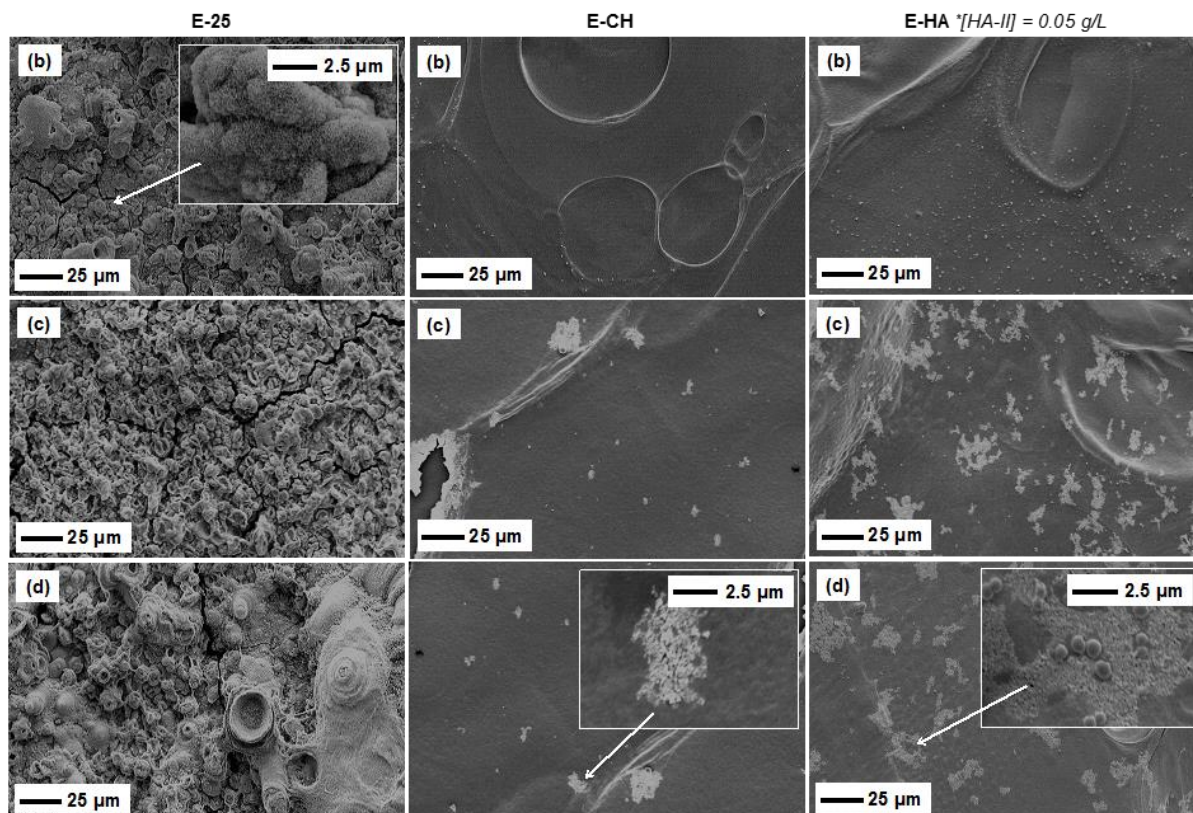
13. att. Pārklājumu virsmas morfoloģijas SEM attēli: pārklājumi nogulsnēti šķīdumos (a) E-15, (b) E-25, (c) E-CH, (d) E-HA ($[HA-II] = 0,40 \text{ g/L}$), (e) E-TCP un (f) E-HA/TCP.

Elektrokīmiskajā nogulsnešanā izmantotie šķīdumu sastāvi

Šķīdums	CH-CaP šķīdums, $V_E^* = 500$ mL	
	$[Ca^{2+}] = 0,42$ M un $[PO_4^{3-}] = 0,25$ M	$[CH] = 1,00$ g/L
E-CH	0 mL	500 mL
E-15	75 mL	425 mL
E-25	125 mL	375 mL
	$[HA] = 0,05-0,40$ g/L	$[CH] = 1,00$ g/L
E-HA-I	20 mL	480 mL
E-HA-II	20 mL	480 mL
	$[\beta-TCP] = 0,30$ g/L	$[CH] = 1,00$ g/L
E-TCP	20 mL	480 mL
	$[HA-II/\beta-TCP] = 70/30$ wt %	$[CH] = 1,00$ g/L
E-70/30	20 mL	480 mL

* V_E – šķīduma kopējais tilpums**In vitro bioaktivitāte simulētā ķermeņa šķīdumā**

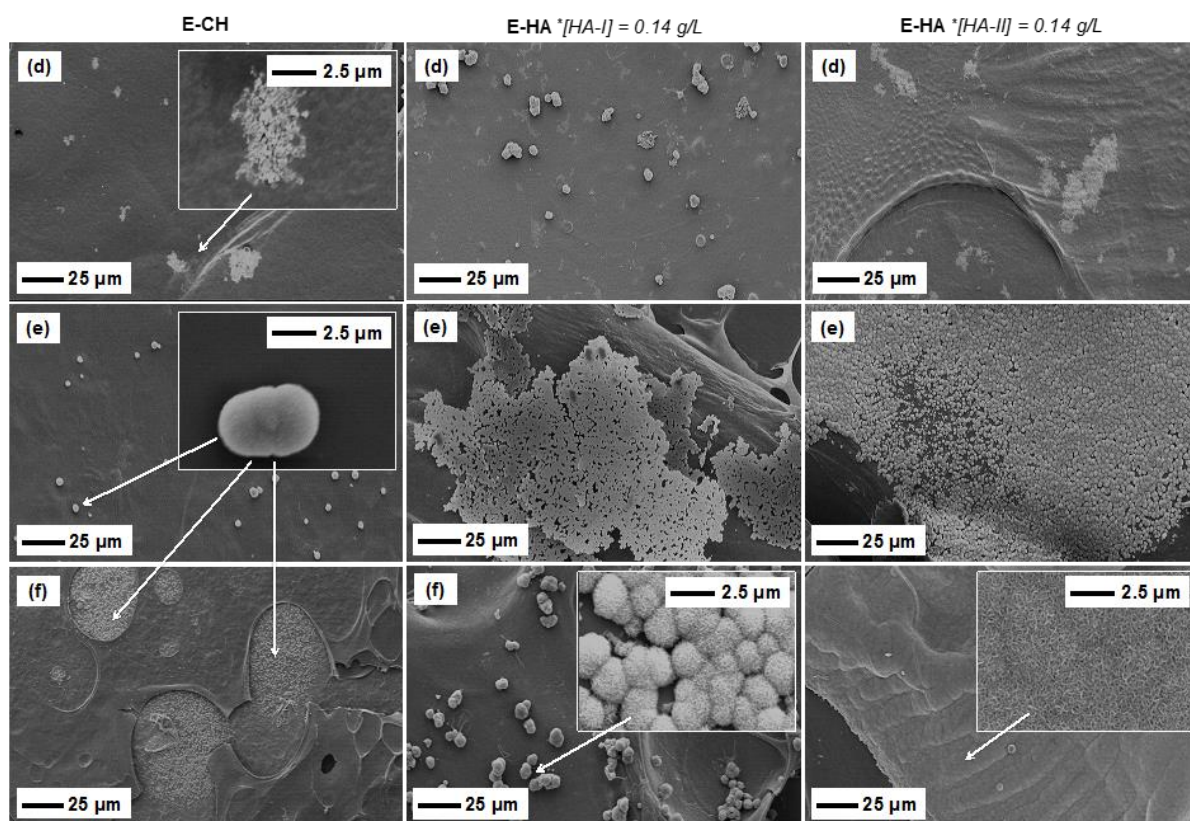
Bioloģiskā apatīta veidošanās uz biokompozītmateriāla virsmas varētu būt nozīmīgs process, lai uzlabotu materiāla saistīšanos ar kaulu.⁴⁰ Galvenokārt šis process atkarīgs no kalcija fosfāta īpašībām (daļiņu lieluma, kristalogrāfiskās sistēmas, blīvuma) un šķīduma (sastāvs, pH un temperatūra).^{41,42} *In vitro* bioaktivitātes pētīšana ir svarīgs posms, lai noskaidrotu, vai implants spēs nodrošināt savas funkcijas ilgtermiņā.⁴³ Lai kontrolētu *in vitro* bioaktivitāti un bioloģiskā apatīta veidošanos uz biokompozītmateriāla pārklājuma virsmas, paraugi tika izņemti no SBF pēc 1 (14. att. (b)), 3 (14. att. (c)), 7 (15. att. (d)), 16. att. (d)), 14 (15. att. (e)), 16. att. (e)) un 28 dienām (15. att. (f)), 16. att. (f)), žāvēti, tad svērti, lai kontrolētu svara izmaiņas, un analizēti ar SEM.



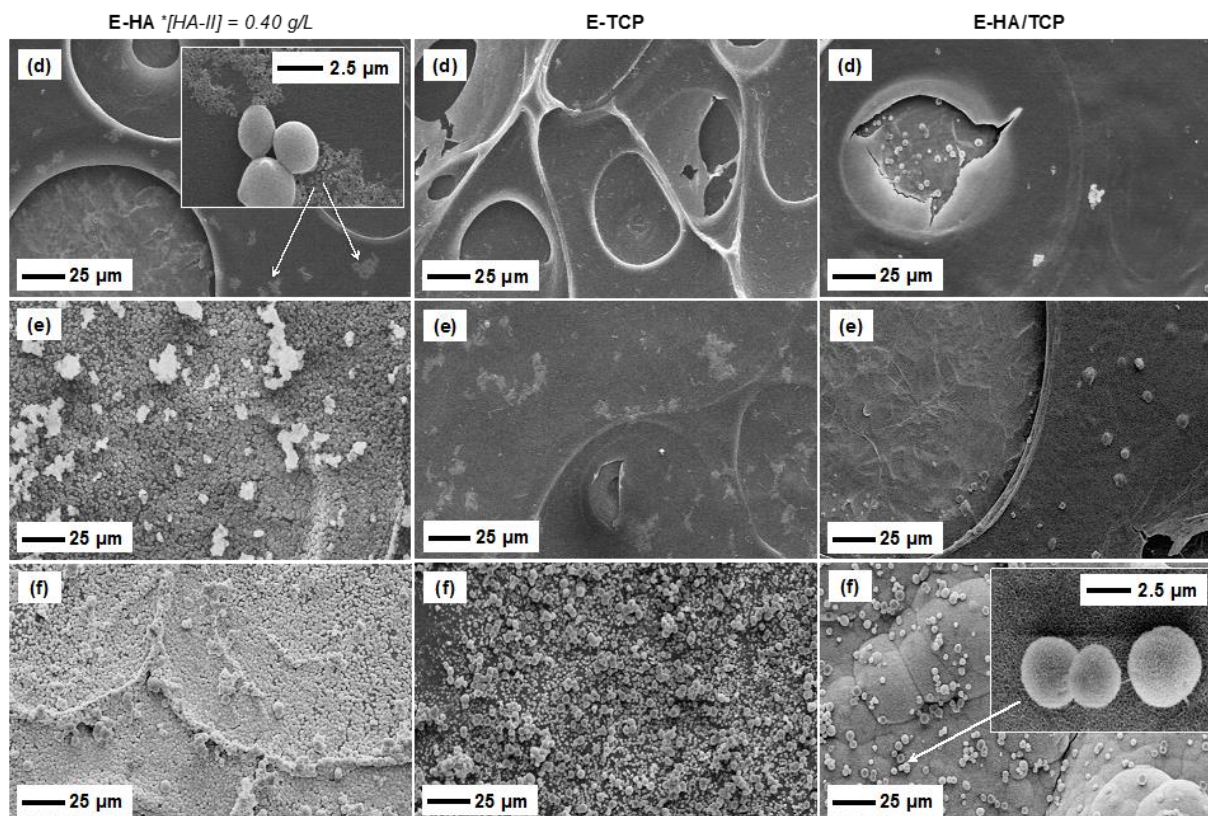
14. att. Virsmas morfoloģijas SEM attēli: pārklājumi nogulsnēti šķīdumos E-25, E-CH un E-HA ($[HA-II] = 0,05$ g/L); pēc (b) 1, (c) 3 un (d) 7 dienu izturēšanas SBF.

Reakcijas uz pārklājuma virsmas notika pirmajās 24 h un turpinājās līdz pat 3 dienām pēc iemērkšanas SBF (14. att.). Atsaucoties uz *Barrère u.c.*, HA bija visstabilākā fāze pie vides $pH = 7$ un $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā, salīdzinot ar TCP un ACP.⁴¹ Visaugstāko *in vitro* bioaktivitāti uzrādīja biokompozītmateriālu pārklājumi, kas nogulsnēti šķīdumā E-25 (līdzīgi E-15), salīdzinot ar tiem, kas nogulsnēti šķīdumos, kuri satur nanoizmēra kalcija fosfātu daļiņas; hitozāna matricā esošā amorfā kalcija fosfāta fāze izšķīda uzreiz pēc pārklājuma E-25 (līdzīgi E-15) iemērkšanas SBF (14. att.).

Kā redzams 14. att., pirmajās 24 h līdz pat 3 dienām novērotas dažas baltas bioloģiskā apatīta daļiņas uz pārklājumu virsmas. Pēc 7 dienām bioloģiskā apatīta veidošanās konstatēta uz pārklājumiem, kas nogulsnēti šķīdumā E-HA, savukārt, palielinot izturēšanas laiku un nanoizmēra kalcija fosfātu koncentrāciju, bioloģiskais apatīts pakāpeniski pārklāja visu biokompozītmateriāla pārklājumu (15. un 16. att.). Salīdzinot ar hitozāna pārklājumu, biokompozītmateriālu pārklājumi, kuros iekļautas nanoizmēra biokeramikas daļiņas, daudz ātrāk veidoja bioloģisko apatītu uz pārklājuma virsmas, kas liecināja par to, ka biokompozītmateriālu pārklājumi uzrādīja labāku mineralizāciju. *In vitro* bioaktivitātes rezultāti apstiprināja to, ka biokompozītmateriālu pārklājumi, kas nogulsnēti 1,0 g/L hitozāna šķīdumā, kura sastāvā bija nanoizmēra kalcija fosfātu daļiņas, var tikt lietoti kā bioaktīvi materiāli (14. att. līdz 16. att.).



15. att. Virsmas morfoloģijas SEM attēli: pārklājumi nogulsnēti šķīdumos E-CH un E-HA ([HA-I vai HA-II] = 0,14 g/L); pēc (d) 7, (e) 14 un (f) 28 dienu izturēšanas SBF.



16. att. Virsmas morfoloģijas SEM attēli: pārklājumi nogulsnēti šķīdumos E-HA ([HA-II] = 0,40 g/L), E-TCP un E-HA/TCP; pēc (d) 7, (e) 14 un (f) 28 dienu izturēšanas SBF.

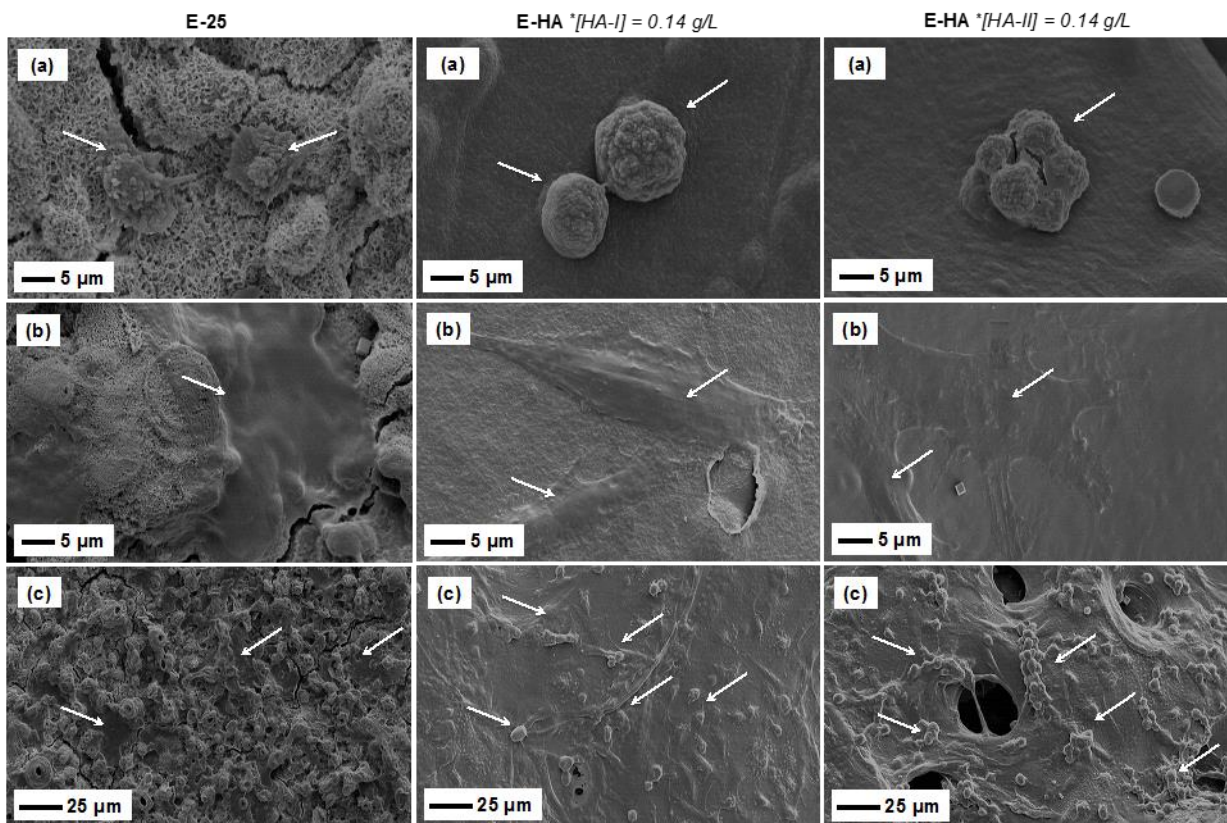
Šūnu biosaderība

Šūnu–biomateriāla mijiedarbība ir atkarīga no parauga virsmas topogrāfijas un fizikālķīmiskajām īpašībām; galvenokārt virsmas īpašības nosaka jonu apmaiņas dinamiku un proteīnu adsorbciju, kā arī ietekmē šūnu aktivitāti (adhēziju, proliferāciju un diferenciāciju).⁴¹ Iegūtie pārklājumi testēti *in vitro* šūnu pārbaudēs, izmantojot osteosarkomas šūnu līniju *Saos-2* (*osteosarcoma cell line Saos-2*), lai noskaidrotu potenciālos pielietojumus biomedicīnā. *Saos-2* šūnu uzvedību uz biokompozītmateriālu pārklājumu virsmas tika aprakstīta ar šūnu metabolisko aktivitāti un morfoloģijas analīzi.

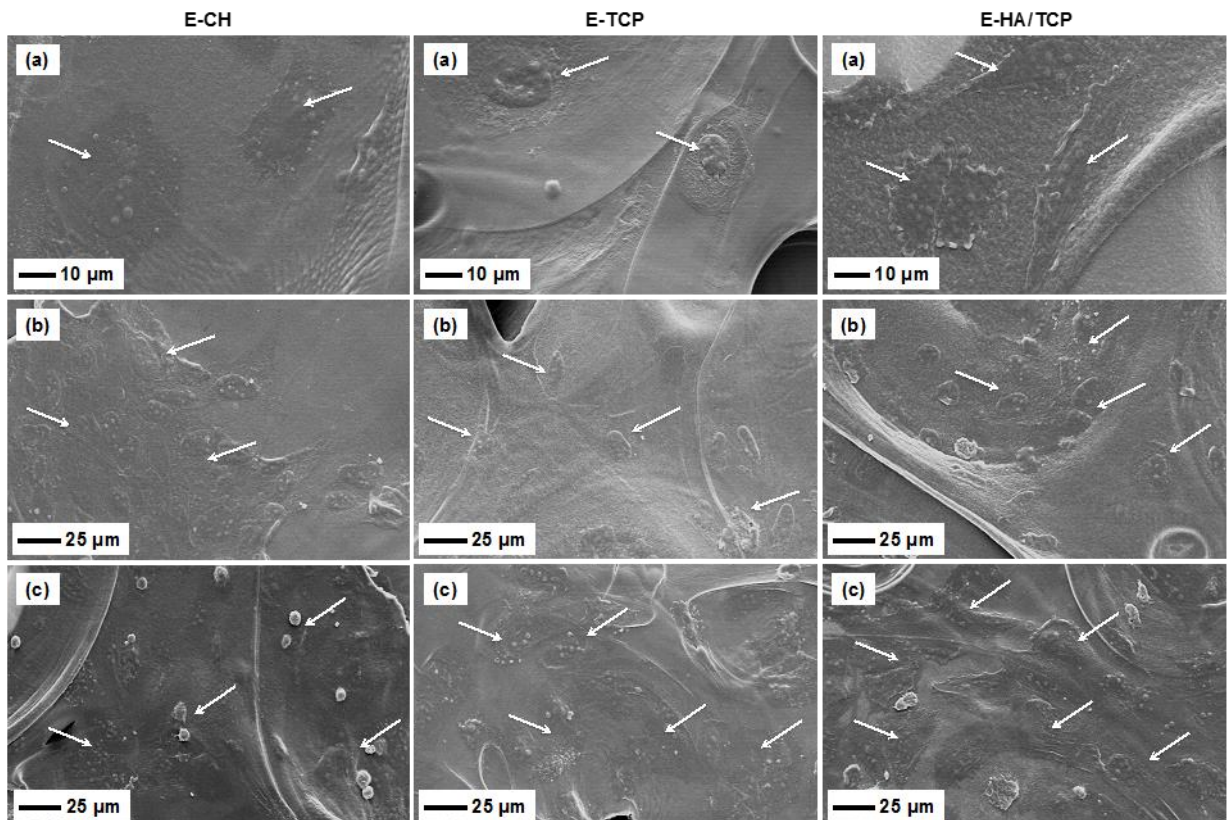
Rezultāti parādīja, ka hitozāna-kalcija fosfātu biokompozītmateriālu pārklājumiem piemīt laba biosaderība un zema citotoksicitāte attiecībā pret osteosarkomas šūnām. *Saos-2* šūnu dzīvotspēja uz CH-HA pārklājumu virsmas palielinājās līdz pat 14 dienām un būtiskas atšķirības, salīdzinot ar kontroli, nav konstatētas (šūnas audzētas uz šūnu kultūras plates, TCPS). Galvenokārt šūnu dzīvotspēju raksturo šāda sakarība: E-HA > TCPS ≈ E-TCP ≈ E-HA/TCP ≈ CH > E-25.

Kā redzams 17. att. un 18. att., šūnas uz biokompozītmateriālu virsmas veidoja vārpstveida formu. Visas biokompozītmateriālu pārklājumu virsmas veicināja šūnu augšanu un vārpstveida formas veidošanos. Tomēr pēc 3 līdz 7 dienu audzēšanas šūnas uzrādīja labāku šūnu augšanu (vārpstveida formas veidošanos) uz biokompozītmateriālu pārklājumiem, kas nogulsnēti šķīdumā E-HA, E-TCP un E-70/30, salīdzinot ar pārklājumiem, kas nogulsnēti šķīdumā E-25 (17. att. un 18. att.).

SEM attēli apliecina, ka hitozāna-nanoizmēra kalcija fosfātu biokeramikas daļiņu pārklājumi nodrošina *Saos-2* šūnu adhēziju un proliferāciju. Ja pēc 3 (18. att. (b)) un 7 (17. att. (b)) dienu audzēšanas šūnas demonstrēja vārpstveida formu kā kontroles lauciņā, tad pēc 7 (18. att. (c)) un 10 (17. att. (c)) dienu audzēšanas, tās veidoja savstarpēji saistītu šūnu slāni uz hitozāna un hitozāna-nanoizmēra kalcija fosfātu biokeramikas daļiņu pārklājuma virsmas.



17. att. *Saos-2* šūnu audzēšana uz pārklājumu virsmas, kas nogulsnēti šķīdumos E-25 un E-HA; SEM attēli pēc šūnu audzēšanas: (a) 1, (b) 7 un (c) 10 dienas. Ar baltajām bultiņām norādītas *Saos-2* šūnas.

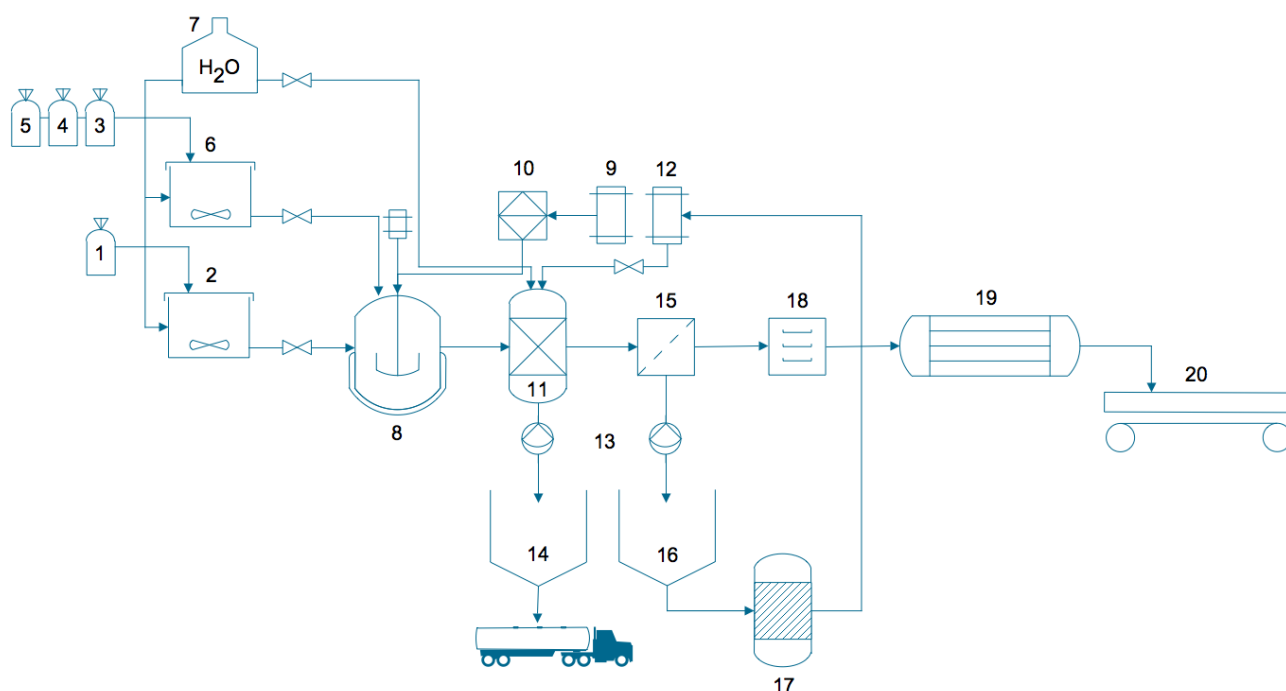


18. att. *Saos-2* šūnu audzēšana uz pārklājumu virsmas, kas nogulsnēti šķīdumos E-CH, E-TCP un E-HA/TCP; SEM attēli pēc šūnu audzēšanas: (a) 1, (b) 3 un (c) 7 dienas. Ar baltajām bultiņām norādītas *Saos-2* šūnas.

Izstrādāti un raksturoti biokompozītmateriālu pārklājumi, izmantojot elektroķīmisko nogulsnešanu, kas ir efektīva, vienkārša un ekonomiski izdevīga metode. Hitozānā, biosadalošā dabas polimērā, iekļaujot nanoizmēra hidroksilapatīta un β -trikalcijs fosfāta biokeramikas daļiņas, var panākt to, ka tiek uzlabota biokompozītmateriālu pārklājumu *in vitro* bioaktivitāte un to spēja veicināt osteosarkomas šūnu *Saos-2* adhēziju un proliferāciju

3. No fundamentālā pētījuma līdz tehnoloģijai

Pamatojoties uz pētījuma rezultātiem, izstrādāta nanoizmēra kalcija fosfātu iegūšanas metodes tehnoloģiskā shēma, kas ilustrēta 19. att. Tehnoloģiskajā shēmā apzīmēts: (1) konteineris kalcija nitrāta tetrahidrāta uzglabāšanai ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), (2) šķīdināšanas trauks ar maisītāju kalcija jonus saturoša šķīduma pagatavošanai, (3) un (4) konteineri fosforu saturošu savienojumu uzglabāšanai ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ un $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), (5) konteiners amonija karbonāta uzglabāšanai ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$), (6) šķīdināšanas trauks ar maisītāju fosfāta jonus saturoša šķīduma pagatavošanai (ja sintezē HA, fosforu saturošo savienojumu izšķīdina kopā ar amonija karbonātu), (7) dejonizēta ūdens uzglabāšanas rezervuārs, (8) termostatējams ķīmiskais reaktors ar mehānisko maisītāju un *pH* sensoru, (9) amonija hidroksīda šķīduma uzglabāšanas tanks (NH_4OH), (10) dozators, (11) skalošanas–apstrādes tvertne ar *pH* sensoru, (12) etanola tanks ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 96 % v/v), (13) sūkņi, (14) atstrādātā ūdens tvertne, (15) suspensijas filtrēšanas iekārta, (16) etanola un ūdens maisījuma uzglabāšanas tvertne, (17) rektifikācijas kolonna, (18) žāvētājs, (19) cilindriskā krāsns un (20) metāla bloks.



19. att. Nanoizmēra kalcija fosfātu iegūšanas metodes tehnoloģiskā shēma. Zīmēta, izmantojot CS Odessa ConceptDraw Office v3: <http://www.conceptdraw.com> ©Linda Vecbiškina 2016.

Kalcija savienojumu (1) un fosfora savienojumu (3) vai (4) traukos ar maisītājiem (2) un (6) izšķīdina dejonizētā ūdenī, kas pievadīts no dejonizētā ūdens uzglabāšanas rezervuāra (7). Amorfā kalcija fosfāta prekursoru sintēzes nosacījumi apkopoti 1. tab. Kalcija nitrāta šķīdumu no šķīdināšanas trauka (2) novada uz ķīmisko reaktoru (8), dozējot (10) pievieno amonija hidroksīda šķīdumu (9). Pēc tam kalcija nitrāta šķīdumam, kas satur amonija hidroksīda šķīdumu (8), pievieno amonija fosfāta šķīdumu no šķīdināšanas trauka (6) (sintēzes vides *pH* ~ 10,00). Iegūtās nogulsnes vispirms skalo ar dejonizētu ūdeni skalošanas–apstrādes tvertē ar *pH* sensoru (11), skalošanā atstrādāto ūdeni novada atstrādātā ūdens tvertnē (14). Pēc skalošanas nogulsnes apstrādā ar etanolu

(96 % v/v) un novada suspensijas filtrēšanas iekārtā (15). Filtrātu, etanola un ūdens maisījumu, novada etanola un ūdens maisījuma uzglabāšanas tvertnē (16), lai pēc rektifikācijas procesa (17) novadītu atpakaļ ciklā. Nogulsnes no filtrēšanas iekārtas (15) nekavējoties transportē uz žāvētāju (18), un pēc tam apstrādā paaugstinātā temperatūrā (650 °C līdz 1000 °C) cilindriskajā krāsnī (19). Pēc apstrādes paaugstinātā temperatūrā pulverus nekavējoties izņem no krāsns un dzesē uz metāla bloka (20). β -TCP tiek raksturots, kā stabilā modifikācija istabas temperatūrā, kamēr α -TCP – kā metastabilā, tāpēc α -TCP iegūst, novēršot tā pāreju β -TCP, strauji dzesējot no termiski stabilā temperatūru intervāla.

Izstrādātā nanoizmēra kalcija fosfātu iegūšanas metodes tehnoloģiskā shēma paver jaunus izaicinājumus biomateriālu nozarē. Iegūtie nanoizmēra kalcija fosfāti var novērst iespējamus trūkumus, kas konstatēti līdz šim: ķīmisko un strukturālo īpašību izmaiņas (attiecināmas uz tehnoloģiju un ķīmiju), salīdzinoši zema izturība stiepē un bīdē, mainīga šķīdība u.c.⁴⁴ Pamatojoties uz fundamentālajiem pētījumiem un tehnoloģisko koncepciju, var tikt uzsākti tehnoloģiskie pētījumi un pētījumu rezultātu izvērtējums.

SECINĀJUMI

1. Izstrādāta un aprobēta efektīva sintēzes tehnoloģija nanoizmēra trikalcija fosfāta un hidroksilapatīta iegūšanai. Sintezēti nanoizmēra kalcija fosfāti, TCP un HA, izmantojot etanolā apstrādātus amorfos kalcija fosfātu prekursorus, kas karsēti 650 °C līdz 1000 °C temperatūrā.
2. HA iegūts arī no amorfā kalcija fosfāta, kas sintezēts, izmantojot alternatīvu fosfora avotu, amonija dihidrogēnfosfātu (NH₄H₂PO₄).

Nanoizmēra α -trikalcija fosfāta lietojums kaulu cementā

3. Izpētīts nanoizmēra tīra α -TCP potenciālais lietojums kalcija fosfātu kaulu cementu cietās fāzes sastāvā un noskaidrots, ka iegūtās tīra α -TCP nanodaļiņas nav nepieciešams papildus malt, lai sasniegtu nepieciešamo reaktivitāti kaulu cementa sacietēšanas procesā. Tīra α -TCP nanodaļiņas, kurām ir lielāks kristalītu izmērs un kas iegūtas pēc apstrādes ar etanolu, uzrādīja labu šūnu biosaderību.
4. ACP apstrāde ar etanolu pēc karsēšanas 650 °C līdz 800 °C nodrošināja tīra α -TCP veidošanos (α -TCP var dzesēt arī korunda laiiviņā). Savukārt ACP, kas apstrādāts ar ūdeni, pēc karsēšanas 650 °C līdz 800 °C un straujas atdzesēšanas saglabāja neprognozējamu gala produkta sastāvu – α -TCP sastāvā konstatēts 7 % līdz 15 % β -TCP.

Nanoizmēra hidroksilapatīta un β -trikalcija fosfāta lietojums biokompozītmateriāla pārklājumā

5. Izstrādāti biokompozītmateriālu pārklājumi, kas iegūti, izmantojot elektroķīmisko nogulsnešanu, un raksturotas to fizikālķīmiskās un bioloģiskās īpašības. Nanoizmēra kalcija fosfātu biokeramikas daļiņu iekļaušana hitozāna matricā uzlaboja biokompozītmateriālu īpašības, tādas kā pārklājumu *in vitro* bioaktivitāte un to spēja veicināt osteosarkoma šūnu Saos-2 adhēziju un proliferāciju.
6. Pārklājumu *in vitro* bioaktivitāte ir augstāka, ja pārklājumus nogulsnē šķīdumā ar augstāku nanoizmēra HA daļiņu koncentrāciju (no 0,05 g/L līdz 0,40 g/L). Šūnu dzīvotspēja uz hitozāna-nanoizmēra HA biokeramikas daļiņu pārklājumiem palielinājās līdz pat 7 līdz 10 dienām un būtiskas atšķirības nav konstatētas, salīdzinot ar kontroli.
7. Hitozāna matricā vienlaicīgi var iekļaut gan nanoizmēra HA, gan nanoizmēra β -TCP (HA/ β -TCP = 70/30 wt %) biokeramikas daļiņas. Abu fāžu iekļaušana hitozāna matricā uzrādīja visaugstāko *in vitro* bioaktivitāti pēc 3 līdz 28 dienu izturēšanas SBF (šūnu biosaderība ir par 10 % līdz 20 % zemāka), salīdzinot hitozāna un pārējiem biokompozītmateriālu pārklājumiem.

JAUNINĀJUMI

1. Apstrāde ar etanolu nodrošina, ka tīrs α -TCP ir stabils temperatūru intervālā no 800 līdz 1000 °C.
2. Pirmo reizi iegūts nanoizmēra tīrs α -TCP, kas uzrāda lielisku potenciālu divreiz ātrākai hidrolizācijai nestehiometriskā hidroksilapatītā ar kalcija deficītu nekā augsttemperatūras cietvielu reakcijā sintezētais α -TCP.
3. Pirmo reizi nanoizmēra HA (sintezēts no ACP, aizstājot diamonija dihidrogēnfosfātu ar amonija dihidrogēnfosfātu) un β -TCP (HA/ β -TCP = 70/30 wt %) iekļaušana hitozāna matricā, izmantojot elektroķīmiskās nogulsnešanas metodi, veido biokompozītmateriālu pārklājumu, kas uzrāda visaugstāko *in vitro* bioaktivitāti un piemērotu šūnu atbildes reakciju, salīdzinot ar hitozāna pārklājumu.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. S.V. Dorozhkin. Calcium orthophosphate-based bioceramics. *Materials* **2013**, 6(9), 3840–3942.
2. S.V. Dorozhkin. Nanodimensional and nanocrystalline apatites and other calcium orthophosphates in biomedical engineering, biology and medicine. *Materials* **2009**, 2, 1975–2045.
3. MarketsandMarkets: Biomaterials Market worth 130.57 Billion USD by 2020. <http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/global-biomaterials.asp> [seen 08/03/2016].
4. C. Sikalidis. *Advances in Ceramics – Electric and Magnetic Ceramics, Bioceramics, Ceramics and Environment*. Rijeka: InTech, 2011. – 550 p.
5. C. P. Bergmann, A. Stumpf. *Dental Ceramics – Microstructure, Properties and Degradation*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. – 84 p.
6. T. Albrektsson, C. Johansson. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur. Spine J.* **2001**, 10, S96–S101.
7. K.L. Low, S.H. Tan, S.H.S. Zein, J.A. Roether, V. Mourino, A.R. Boccaccini. Calcium phosphate-based composites as injectable bone substitute materials. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2010**, 94(1), 273–286.
8. S. Tagaki, L.C. Chow, K. Ishikawa. Formation of hydroxyapatite in new calcium phosphate cements. *Biomaterials* **1998**, 19, 1593–1599.
9. M. Komath, H.K. Varma. Development of a fully injectable calcium phosphate cement for orthopedic and dental applications. *Bull. Mater. Sci.* **2003**, 26(4), 415–422.
10. P.H. Long. Medical devices in orthopedic applications. *Toxicol. Pathol.* **2008**, 36(1), 85–91.
11. W. Watters, E. Abd, M.P. Rethman, H.C. Futrell, R.P. Evans, S.O. Glenn, C. Moucha, J. Hellstein, D. Kolessar, R.J. O'Donnell, J.E. O'Toole, P.A. Anderson, M.J. Steinberg, K.C. Carroll, D.S. Cummins, K. Garvin, S. Song, P. Sluka, K. Boyer, A. Woznica, D.R. Osmon, A. Rinella, H. Ristic, N.B. Hanson, A. Hewlett, M.J. Goldberg, W.R. Martin. Prevention of orthopaedic implant infection in patients undergoing dental procedures (Evidence-based guideline and evidence report). Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2012. – 325 p.
12. W.W. Thein-Han, R.D.K. Misra. Biomimetic chitozan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* **2009**, 5, 1182–1197.
13. L. Pighinelli, M. Kucharska. Chitozan–hydroxyapatite composites. *Carbohydr. Polym.* **2013**, 93, 256–262.
14. C. Rey, C. Combes, C. Drouet, S. Somrani. *Tricalcium phosphate-based ceramics, Bioceramics and their clinical applications*, 1st Edition. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2008, 326–358.
15. T.J. Brunner, R.N. Grass, M. Bohner, W.J. Stark. Effect of particle size, crystal phase and crystallinity on the reactivity of tricalcium phosphate cements for bone reconstruction. *J. Mater. Chem.* **2007**, 17, 4072–4078.
16. M. Sadat-Shojai, M. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomater.* **2013**, 9(8), 7591–7621.
17. E.D. Eanes. Thermochemical studies on amorphous calcium phosphate. *Calc. Tiss. Res.* **1970**, 5(1), 133–145.
18. R.G. Carrodeguas, S. De Aza. α -Tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomater.* **2011**, 7, 3536–3546.
19. D. Alves Cardoso, J.A. Jansen, S.C.G. Leeuwenburgh. Synthesis and application of nanostructured calcium phosphate ceramics for bone regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **2012**, 100B(8), 2316–2326.
20. N. Dobelin, T.J. Brunner, W.J. Stark, M. Eggmann, M. Fisch, M. Bohner. Phase evolution of thermally treated amorphous tricalcium phosphate nanoparticles. *Key Engin. Mater.* **2009**, 396–398, 595–598.

21. C. Combes, C. Rey. Amorphous calcium phosphates: synthesis, properties and uses in biomaterials. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 3362–3378.
22. K.A. Gross, H. Herman, C.C. Berndt. Amorphous phase formation in plasma-sprayed hydroxyapatite coatings. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *39*, 407–414.
23. R.C. Lucacel, M. Maier, V. Simon. Structural and *in vitro* characterization of TiO₂–CaO–P₂O₅ bioglasses *J. Non. Cryst. Solids* **2010**, *356*, 2869–2874.
24. S. Somrani, C. Rey, M. Jemal. Thermal evolution of amorphous tricalcium phosphate. *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 888–892.
25. L. Vecbiskena, L. De Nardo, R. Chiesa. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications. *Key Eng. Mater.* **2014**, *604*, 212–215.
26. C.L. Camiré, U. Gbureck, W. Hirsiger, M. Bohner. Correlating crystallinity and reactivity in an alpha-tricalcium phosphate. *Biomaterials* **2005**, *26*, 2787–2794.
27. A. Bienenstock, A.S. Posner. Calculation of the x-ray intensities from arrays of small crystallites of hydroxyapatite. *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *124*, 604–615.
28. C.J. Liao, F.H. Lin, K.S. Chen, J.S. Sun. Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere. *Biomaterials* **1999**, *20*(19), 1807–1813.
29. M. Bohner. Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitution. *Eur. Cell. Mater.* **2010**, *20*, 1–12.
30. Z. Zyman, D. Rokhmistrov, V. Glushko. Structural changes in precipitates and cell model for the conversion of amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite during the initial stage of precipitation. *J. Cryst. Growth* **2012**, *353*, 5–11.
31. M. Bohner, R. Luginbuhl, C. Reber, N. Dobelin, G. Baroud, E. Conforto. A physical approach to modify the hydraulic reactivity of alpha-tricalcium phosphate powder. *Acta Biomater.* **2009**, *5*(9), 3524–3535.
32. M.P. Ginebra, E. Fernandez, E.A.P. De Maeyer, R.M.H. Verbeeck, M.G. Boltong, J. Ginebra, F.C.M. Driessens, J.A. Planell. Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement. *J. Dent. Res.* **1997**, *76*, 905–912.
33. S.V. Dorozhkin. Self-Setting calcium orthophosphate formulations. *J. Funct. Biomater.* **2013**, *4*(4), 209–311.
34. L. Sun, L.C. Chow, S.A. Frukhtbeyn, J.E. Bonevich. Preparation and properties of nanoparticles of calcium phosphates with various Ca/P ratios. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* **2010**, *115*(4), 243–255.
35. M. Espanol, J. Portillo, J.M. Manero, M.P. Ginebra. Investigation of the hydroxyapatite obtained as hydrolysis product of α -tricalcium phosphate by transmission electron microscopy. *Cryst. Eng. Comm.* **2010**, *12*, 3318–3326.
36. Y. Leng, J. Chen, S. Qu. TEM study of calcium phosphate precipitation on HA/TCP ceramics. *Biomaterials* **2003**, *24*, 2125–2131.
37. X.L. Deng, X.P. Yang. Fabrication and cell culturing on carbon nanofibers/ nanoparticles reinforced membranes for bone-tissue regeneration. *Carbon. Lett.* **2012**, *13*(3), 139–150.
38. S.V. Dorozhkin. Amorphous calcium (ortho)phosphates. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 4457–4475.
39. L. Altomare, L. Draghi, R. Chiesa, L. De Nardo. Morphology tuning of chitozan films *via* electrochemical deposition. *Mater. Lett.* **2012**, *78*, 18–21.
40. C. Wu, Z. Wen, C. Dai, Y. Lu, F. Yang. Fabrication of calcium phosphate/chitozan coatings on AZ91D magnesium alloy with a novel method. *Surf. Coat. Technol.* **2010**, *204*(20), 3336–3347.
41. F. Barrere, C.A. Van Blitterswijk, K. De Groot. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int. J. Nanomedicine* **2006**, *1*(3), 317–332.
42. D.C. Greenspan. Bioactive glass: mechanisms of bone bonding. *Tandläkartidningen Årg* **1999**, *91*(8), 1–5.
43. J.H. Park, D.Y. Lee, K.T. Oh, Y.K. Lee, K.M. Kim, K.N. Kim. Bioactivity of calcium phosphate coatings prepared by electrodeposition in a modified simulated body fluid. *Mater. Lett.* **2006**, *60*, 2573–2577.

44. J.E. Lemon, F. Misch-Dietsh, M.S. McCracken. Biomaterials for Dental Implants, Dental Implant Prosthetics. Missouri: Elsevier Inc., 2008, 66–94.

Nākotne ir gaiša...



©Linda Vecbiškēna 2013