RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE
MATERIĀLZINĀTNES UN LIETIŠĶĀS ĶĪMIJAS FAKULTĀTE
NEORGANISKĀS ĶĪMIJAS INSTITŪTS

Liene Plūduma
Doktora studiju programmas "Materiālzinātne" doktorante

HIDROKSILJONU DAUDZUMA NOTEIKŠANA HIDROKSILAPATĪTĀ UN TO IETEKME UZ ŠŪNU ATBILDES REAKCIJU

Promocijas darba kopsavilkums

Zinātniskais vadītājs
Asoc. profesors *Dr. sc. ing.*
Kārlis Agris Gross

RTU Izdevniecība
Rīga 2017

Plūduma L. Hidroksiljonu daudzuma noteikšana hidroksilapatītā un to ietekme uz šūnu atbildes reakciju. – Rīga: RTU Izdevniecība, 2017. – 34 lpp.

Iespiests saskaņā ar promocijas padomes "RTU P-18" 2017. gada 31. maija sēdes lēmumu Nr. 5.

Šis darbs ir izstrādāts ar daļēju Eiropas Sociālā fonda atbalstu projektā "Atbalsts RTU doktora studiju īstenošanai".

EIROPAS SOCIĀLAIS FONDS

EIROPAS SAVIENĪBA

ISBN 978-9934-10-976-8

PROMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS INŽENIERZINĀTŅU DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ

Promocijas darbs inženierzinātņu doktora grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2017. gada 29. septembrī plkst. 15:00 Rīgas Tehniskās universitātes Materiālzinību un lietišķās ķīmijas fakultātē, Paula Valdena ielā 3, 272. auditorijā.

OFICIĀLIE RECENZENTI

Dr. sc. ing. Dagnija Loča
Rīgas Tehniskā universitāte, Latvija

Dr. biol. Inese Čakstiņa
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Profesors *Dr. habil. Aivaras Kareiva*
Viļņas Universitāte, Lietuva

APSTIPRINĀJUMS

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

Liene Plūduma …….

Datums: ……

Promocijas darbs ir uzrakstīts angļu valodā, tajā ir ievads, trīs nodaļas, secinājumi, literatūras saraksts, 46 attēli, 16 tabulas, astoņi pielikumi, kopā 134 lappuses. Literatūras sarakstā ir 193 nosaukumi.

PATEICĪBAS

Es vēlos izteikt visdziļāko pateicību prof. *Christian Rey* no Tulūzas Politehniskā institūta par padomiem un stimulējošajām diskusijām. Pētījuma veikšana Jūsu laboratorijā man ne tikai deva piekļuvi aparatūrai, bet arī dziļāku sapratni par izmantotajām tehnoloģijām. Paldies Jums par silto uzņemšanu un palīdzību darba gaitā. Tulūzas Politehniskajā institūtā tika veikta hidroksilapatīta sintēze, daļa termogravimetrisko analīžu, oksihidroksilapatīta rehidroksilācija, daļa Furjē transformāciju infrasarkanās spektroskopijas mērījumu un kalcija un fosfora kvantitatīva noteikšana.

Esmu ļoti pateicīga prof. *David Haynes* no Adelaides Universitātes Medicīnas skolas par iespēju strādāt Jūsu izpētes grupā un apgūt daudz jaunas prasmes šūnu un molekulārajā bioloģijā. Papildus vēlos pateikties visai Kaulu un locītavu laboratorijai par draudzību un atbalstu. Paldies, ka radījāt tik lielisku darba vidi. Īpašu paldies vēlos teikt *Kent Algate* par detalizētajiem skaidrojumiem un atbildēm uz maniem dažkārt muļķīgajiem jautājumiem.

Vēlos pateikties prof. *Petri Vuoristo* no Tamperes Tehnoloģiju universitātes par laipno uzņemšanu laboratorijā un pilnvērtīgu tehnisko nodrošinājumu pārklājumu izgatavošanai. Milzīgs paldies *Dr. Heli Koivuluoto* un *Mikko Kylmälahti* par izturību un sapratni, strādājot sevišķi intensīvas un garas darba stundas manu vizīšu laikā.

Šis darbs nebūtu tapis bez milzīgā Latvijas Universitātes atbalsta. Īpaši vēlos pateikties prof. Arturam Vīksnam par neierobežotu piekļuvi Furjē transformāciju infrasarkanajam spektrometram, kā arī par induktīvi saistītās plazmas masspektrometrijas rezultātiem, prof. Andrim Actiņam un viņa pētniecības grupai par piekļuvi rentgenstaru difraktometram un tehnisko atbalstu, prof. Arnoldam Ūbelim par apmācībām un konsultācijām darbā ar vakuumkrāsni un Aleksandram Kapralovam par stikla pūšanu.

Vēlos arī pateikties prof. *Remigijus Juškėnas* no Viļņas Universitātes par mikro rentgenstaru difrakcijas rezultātiem un *Dr.* Gundaram Lācim no stacionāra "Gaiļezers" par pārklājumu sterilizēšanu.

Liels paldies draudzīgajiem Rīgas Tehniskās universitātes kolēģiem, kas mani atbalstījuši dažādos darba izstrādes etapos. Īpaši vēlos pateikties Astrīdai Bērziņai par visiem vēlajiem vakariem un agrajiem rītiem pie *Raman* spektrometra, Edijam Freimanim par polarizācijas krāsns izveidi un *Kelvin Probe* mērījumiem, Aijai Krūmiņai par dažiem rentgenstaru difrakcijas rezultātiem, Jānim Lungevičam par profilometrijas mērījumiem, Agnesei Brangulei par dekonvulūcijas nozīmīguma uzsvēršanu un Laurai Komarovskai un Elīnai Rozītei par šūnu skaitīšanu.

Esmu pateicīga savam darba vadītājam asoc. prof. Kārlim Agrim Grosam par iespējām, ko viņš man devis šo piecu gadu laikā, un par plašajiem kontaktiem zinātnieku pasaulē.

Vēlos norādīt, ka šis darbs ir daļējs mana maģistra darba turpinājums, kas tika izstrādāts RTU Rūdolfa Cimdiņa Rīgas Biomateriālu inovāciju un attīstības centrā. Darbs ir izstrādāts ar daļēju Eiropas Sociālā fonda, Eiropas Savienības studentu apmaiņas programmas un Marijas Kirī pētniecības programmas atbalstu.

Esmu neizsakāmi pateicīga visiem, kas mani motivēja pabeigt šo garo ceļojumu, īpašs paldies manai ģimenei, Šīreriem un Nikam.

SATURS

PATEICĪBAS 4
SAĪSINĀJUMI 6
1. DARBA VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS 7
1.1. Ievads 7
1.2. Mērķis 8
1.3. Uzdevumi 8
1.4. Aizstāvāmās tēzes 8
1.5. Zinātniskā novitāte 9
1.6. Praktiskā nozīme 9
2. LITERATŪRAS APSKATA KOPSAVILKUMS 9
3. MATERIĀLI UN METODES 10
4. GALVENIE REZULTĀTI 11
4.1. 1. DAĻA Hidroksiljonu daudzuma mērīšana hidroksilapatītā 11
Standarta hidroksilapatīts 11
Termogravimetrijas analīze 13
Furjē transformāciju infrasarkanā spektroskopija 16
Raman spektroskopija 22
Vadlīnijas hidroksiljonu daudzuma noteikšanai hidroksilapatītā 23
4.2. 2. DAĻA Hidroksiljonu daudzuma ietekme uz hidroksilapatīta pārklājumu šūnu atbildes reakciju 25
Hidroksilapatīta pārklājumu izgatavošana un raksturošana 25
Hidroksilapatīta pārklājumu bioloģisko īpašību novērtēšana 27
SECINĀJUMI 31
IZMANTOTĀS LITERATŪRAS SARAKSTS 32
DARBA APROBĀCIJA 33

SAĪSINĀJUMI

AFM	atomspēku mikroskops
CaF_2	kalcija fluorīds
cHA	tradicionālais hidroksilapatīta pārklājums
Col1a1	1. tipa kolagēns
CPP	kalcija pirofosfāts
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindols
ES	Eiropas Savienība
FA	fluorapatīts
FTIR	Furjē transformāciju infrasarkanā spektroskopija
GAPDH	gliceraldehīda-3-fosfāta dehidrogenāze
h	stundas
HA	hidroksilapatīts
HA_v6	standarta hidroksilapatīts, karsēts vakuumā pie 1000 °C 20 h
HA_v8	standarta hidroksilapatīts, karsēts vakuumā pie 1000 °C 48 h
ht-cHA	hidrotermiski pārstrādāts hidroksilapatīta pārklājums
ICDD	Starptautiskais difrakcijas datu centrs
ICP-MS	induktīvi saistītās plazmas masspektrometrija
KBr	kālija bromīds
n. v.	nosacītā vienība
OAp	oksiapatīts
OCN	osteokalcīns
OH^-	hidroksiljoni
OHA	oksihidroksilapatīts
OPN	osteopontīns
PO_4^{3-}	fosfāta joni
PCR	polimerāzes ķēdes reakcija
P-vērtība	varbūtības vērtība
RSD	relatīvā standartnovirze
RUNx2	transkripcijas faktors 2
SEM	skenējošais elektronmikroskops
STDEV	standartnovirze
TCP	trikalcija fosfāts
TGA	termiskās gravimetrijas analīze
TTCP	tetrakalcija fosfāts
XRD	rentgenstaru difrakcija
α-TCP	α-trikalcija fosfāts
β-TCP	β-trikalcija fosfāts

1. DARBA VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS

1.1. Ievads

Saskaņā ar jaunāko Ekonomiskās sadarbības un attīstības organizācijas ziņojumu par veselības problēmām Eiropā nepieciešams veikt aktivitātes, lai uzlabotu iedzīvotāju veselību Eiropas Savienības (ES) valstīs, attiecīgi uzlabojot dzīves līmeni visām vecuma grupām. Osteoartrīts ir muskoloskeletālā pataloģija, un attīstītajās valstīs tas ir visbiežāk sastopamais iemesls cilvēku kustību nespējai. Aptuveni 10 % vīriešu un 18 % sieviešu vecumā virs 60 gadiem novērots osteoartrīts [1]. Cilvēkiem, kuri cieš no šīs slimības smagā formā, nepieciešama ķirurģiska iejaukšanās, galvenokārt gurnu un ceļu endoprotezēšana. Locītavu protezēšana aizvien biežāk ir nepieciešama arī gados jauniem cilvēkiem, galvenokārt fiziskās neaktivitātes, smēķēšanas, pārmērīgas alkohola lietošanas un pārgalvīga dzīvesveida dēļ. Statistikas dati par laika periodu no 2008. līdz 2014. gadam rāda 6 % pieaugumu gūžu un 15 % pieaugumu ceļu endoprotezēšanas skaitam Latvijā [2]. Bagātākās valstīs ortopēdisko procedūru skaits pieaug vēl ātrāk (piemēram, 30 % palielinājums Austrijā). Gūžu endoprotezēšana ir ļoti pieprasīta ES, Austrijā uz 100 000 iedzīvotāju 2014. gadā šī procedūra tika veikta 279 reizes, Latvijā – 112 reizes [1, 2]. Taču locītavu implanti nekalpo mūžīgi, aptuveni 5 % gadījumos 10 gadu laikā nepieciešama atkārtota ķirurģiska iejaukšanās, kā arī 10 % gadījumos novērota problemātiska vai novēlota implanta ieaugšana un dzīšana [3]. Šiem faktoriem ir būtiska ietekme uz cilvēku dzīves kvalitāti un ekonomiskajiem aspektiem.

Apatīts ir gandrīz visu cieto audu sastāvā, kas ir galvenais iemesls šī materiāla plašajai pētniecībai un izmantošanai dažādos medicīnas laukos – ortopēdijā, zobārstniecībā, pataloģijā [4]. Hidroksilapatīts ir visplašāk izmantotais biomateriāls kaulaudu rekonstrukcijai. Biosaderība un bioaktivitāte ir galvenās īpašības, kas nosaka tā izmantošanu kaula pildvielas vai pārklājuma veidā.

Lūzumu dzīšana ir sarežģīts process, kurā iesaistīti dažādi faktori, tajā skaitā šūnas un gēni. Šo faktoru nepietiekamas vai pārtrauktas darbības rezultātā tiek ietekmēts dzīšanas un kaula ieaugšanas process [5]. Implanta ilgmūžība ir atkarīga no bioloģiskajiem procesiem, kas notiek kaula – implanta saskares vietā, tāpēc, lai nodrošinātu labu kaula integrāciju, liela nozīme ir implanta virsmas fizikāli ķīmiskajai optimizēšanai. Aizvien lielāka uzmanība tiek pievērsta multifunkcionālu materiālu izgatavošanai. Pētnieki ir pierādījuši, ka kaula mineralizācijas laikā hidroksilapatīta nanokristāli tiek orientēti noteiktā virzienā [6]. Tas ļauj secināt, ka hidroksilapatīta implantam jābūt ne tikai ar vēlamo sastāvu, bet arī ar specifiski pielāgotām virsmas īpašībām.

Tiek plaši pētītas un pat izmantotas dažādas hidroksilapatīta pārklājumu virsmas modifikācijas, taču reti kad virsma ir specifiski izveidota ķīmiskā sastāva, topogrāfijas un struktūras sakārtotības ziņā, gandrīz vienmēr novērojams nejaušības princips. Plazmas izsmidzināšana ir galvenais komerciāli izmantotais hidroksilapatīta pārklājumu izgatavošanas process. Augstās temperatūras rezultātā notiek materiāla dehidroksilācija (hidroksiljonu zaudēšana), kas maina materiāla īpašības. Pastāv uzskats, ka hidroksiljoni ir svarīgi ne tikai hidroksilapatīta stehiometrijas un termiskās stabilitātes nodrošināšanai, bet arī ir iesaistīti

virsmas lādiņa veidošanā [7]. Precīza to ietekme uz materiāla īpašībām un šūnu atbildes reakciju vēl nav noteikta galvenokārt tādēļ, ka trūkst piemērotas metodes hidroksiljonu daudzuma mērīšanai.

Hidroksilapatīta struktūras sakārtošana ir saistīta ne tikai ar hidroksiljonu daudzuma kontroli materiālā, bet arī ar to sakārtošanu noteiktā virzienā, tādējādi radot virsmas lādiņu. Pētījumi, polarizējot ķepinātu keramiku, ir parādījuši, ka lādētas virsmas veicina šūnu piesaisti [7], taču šūnu atbildes reakcija līdz šim nav skaitliskā veidā sasaistīta ar hidroksiljonu koncentrāciju. Hidroksilapatīta implants ar specifiski izstrādātu, detalizētu dizainu varētu sniegt jaunas iespējas šūnu uzvedības kontrolēšanai un pastiprinātai mineralizēto audu veidošanai. Paātrinātam dzīšanas procesam un uzlabotai implanta ilgtermiņa stabilitātei sagaidāms ievērojams pozitīvs sociālais un ekonomiskais efekts.

1.2. Mērķis

Attīstīt ērti pieejamu un lietojamu metodi hidroksiljonu kvantitatīvai mērīšanai hidroksilapatītā un raksturot hidroksiljonu ietekmi uz hidroksilapatīta pārklājumu šūnu atbildes reakciju.

1.3. Uzdevumi

1. Izpētīt termiskās gravimetrijas analīzes lietojumu hidroksiljonu daudzuma mērīšanai hidroksilapatītā.
2. Izveidot metodi hidroksiljonu daudzuma noteikšanai ar Furjē transformāciju infrasarkano spektroskopiju.
3. Salīdzināt Furjē transformāciju infrasarkanās spektroskopijas un *Raman* spektroskopijas iespējas hidroksiljonu detektēšanā un daudzuma mērīšanā oksihidroksilapatīta paraugos.
4. Izgatavot hidroksilapatīta pārklājumus ar sakārtotu struktūru un dažādu hidroksiljonu daudzumu.
5. Izpētīt osteoblastu atbildes reakciju (šūnu adhēzija un diferencēšanās) uz hidroksilapatīta pārklājumiem ar dažādu hidroksiljonu koncentrāciju.

1.4. Aizstāvāmās tēzes

1. Hidroksiljonu daudzuma noteikšana, izmantojot spektroskopijas metodes, sniedz uzskatāmākus un ticamākus kvantitatīvos rezultātus nekā termiskā analīze.
2. Hidroksiljonu absorbcijas josla infrasarkanajā spektrā pie 632 cm^{-1} ir jutīgāka un sniedz precīzākus rezultātus par hidroksiljonu daudzumu oksihidroksilapatīta paraugos, salīdzinot ar absorbcijas joslu pie 3570 cm^{-1}.
3. Hidroksiljonu koncentrācijas palielināšana hidroksilapatīta pārklājumā ievērojami palielina osteoblastu adhēziju un diferencēšanos.

1.5. Zinātniskā novitāte

1. Izstrādāta ērti lietojama metode hidroksiljonu daudzuma noteikšanai hidroksilapatītā. Izveidotas vadlīnijas hidroksiljonu daudzuma mērīšanai ar Furjē transformāciju infrasarkano spektroskopiju un termogravimetrisko analīzi.
2. Mainot hidroksiljonu daudzumu hidroksilapatīta pārklājumos, iespējams mainīt materiāla virsmas elektrisko potenciālu un šūnu atbildes reakciju.

1.6. Praktiskā nozīme

1. Uzlabota hidroksilapatīta implantmateriālu kvalitātes kontroles metode.
2. Pierādīts, ka Furjē transformāciju infrasarkanā spektroskopija ir ērtāka un precīzāka metode hidroksiljonu kvantitatīvai mērīšanai, salīdzinot ar *Raman* spektroskopiju un termogravimetrisko analīzi.
3. Identificēta spektrālā josla, kas sniedz precīzāku informāciju par hidroksiljonu daudzumu hidroksilapatītā.
4. Pierādīts, ka nelielas izmaiņas hidroksiljonu daudzumā ietekmē *in vitro* osteoblastu šūnu atbildes reakciju.

2. LITERATŪRAS APSKATA KOPSAVILKUMS

Apskatot kaulu tā molekulārajā līmenī, ir atklāts, ka kaula galvenā minerālā komponente ir hidroksilapatīts (HA, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$). Hidroksilapatīts kā kaula aizvietotājmateriāls tiek pētīts jau vairākus gadu desmitus, bet, ņemot vērā tā sarežģīto struktūru, kas pieļauj dažādas modifikācijas, tā pilnais potenciāls vēl nav atklāts.

Hidroksilapatīta struktūra atbalsta dažāda veida jonu aizvietošanas, ieslēgumus, defektus u. c., un tā rezultātā HA īpašības var mainīties plašā diapazonā. Hidroksiljoni HA struktūrā ir izvietoti 0,30–0,35 nm platos kanālos gar c-asi un izkārtoti …O-H O-H O-H… kolonnās. Tie nodrošina stehiometriska HA termisko stabilitāti līdz pat 1400 °C, uzlabo HA pārklājumu strukturālās un virsmas īpašības un iespējams pat labvēlīgi ietekmē HA biomateriālu šūnu atbildes reakciju. OH^- daudzums hidroksilapatītā nav konstants: stehiometrisks HA satur 100 % hidroksiljonus struktūrā, taču oksiapatītā hidroksiljonu nav. Galvenie iemesli, kas ietekmē OH^- daudzumu hidroksilapatītā, ir jonu aizvietošana vai papildu jonu iekļaušana struktūrā, kristalītu izmērs un termiskā apstrāde.

Pilnai apatītu raksturošanai nepieciešams mērīt divas attiecības: Ca/P un OH/P, taču lielākoties tiek norādīta tikai Ca/P attiecība, jo nav pieejama ērti izmantojama metode OH^- daudzuma mērīšanai. Ir bijuši mēģinājumi noteikt OH^- daudzumu apatītā, izmantojot dažādas metodes, taču tās netiek plašāk izmantotas galvenokārt tādēļ, ka trūkst izsmeļoši paskaidrojumi metodes izmantošanai, tiek izmantotas garas un sarežģītas procedūras vai iekārta nav viegli pieejama. Ķīmiskās metodes OH^- daudzuma noteikšanai ir laikietilpīgas un sarežģītas, kā arī nesniedz precīzus rezultātus, tādēļ tiek piemeklētas fizikālās metodes. Kodolmagnētiskā rezonanse ir izmantota hidroksiljonu daudzuma noteikšanai bioloģiskajos apatītos, taču šī metode tiek aprakstīta kā laikietilpīga, kā arī var rasties problēmas atšķirt signālus, kas rodas

no ūdens vai hidroksiljoniem struktūrā. Ir apskatītas arī vairākas mazāk tradicionālas metodes, piemēram, rentgenstaru fotoelektronspektroskopija, jonu masspektrometrija u. c., taču, lai attīstītu viegli pieejamu mērīšanas metodi, šajā darbā tika apskatītas termogravimetriskā analīze, Furjē transformāciju infrasarkanā un *Raman* spektroskopija.

Termogravimetriskā analīze ļauj aprēķināt OH^- daudzumu, karsējot hidroksilapatītu un reģistrējot svara zudumu, kas rodas ūdens izdalīšanās rezultātā. Spektroskopija ļauj tiešā veidā identificēt hidroksiljonus, reģistrējot tiem raksturīgās absorbcijas vai vibrācijas joslas. Kvantitatīvai analīzei nepieciešams izstrādāt kalibrēšanas taisni, izmantojot paraugus ar zināmu hidroksiljonu daudzumu.

Hidroksilapatīta zemo mehānisko īpašību dēļ tas nevar tikt izmantots slodzi nesošos implantos, taču tas tiek plaši lietots kā pārklājums uz metāla implantiem. Termiski smidzinātie HA pārklājumi komerciāli tiek ļoti plaši izmantoti, taču augstās procesa temperatūras dēļ tiek zaudēti hidroksiljoni, var veidoties amorfā fāze vai paraugs pat var sadalīties. Tā rezultātā palielinās materiāla šķīdība un samazinās mikrostruktūras homogenitāte un mehāniskās īpašības. Lai uzlabotu materiāla bioaktivitāti, ir apskatīti dažādi pēcapstrādes veidi. Hidrotermiskā apstrāde ne tikai atjauno hidroksiljonus, bet arī uzlabo kristāliskumu, samazina nestabilo sadalīšanās fāžu daudzumu un uzlabo pārklājuma mikrostruktūru. Pētījumi rāda, ka materiālam ar īpaši izveidotu virsmas lādiņu raksturīga palielināta šūnu aktivitāte un uzlabota fiksācija *in vivo*.

Šajā pētījumā raksturota hidroksiljonu koncentrācijas ietekme uz osteoblastu adhēziju, proliferāciju un šūnu aktivitāti raksturojošo marķieru izpausmi. Lai nodrošinātu maksimālu hidroksiljonu ietekmi, pārklājumi tika izgatavoti ar pēc iespējas lielāku strukturālo kārtību: sarindoti kristāli un polarizācijas rezultātā orientēti hidroksiljoni.

3. MATERIĀLI UN METODES

Hidroksilapatīta pulveris tika sintezēts, izmantojot ķīmiskās nogulsnēšanas metodi, neitralizējot kalcija nitrāta šķīdumu ar amonija hidrogenfosfāta un amonija hidroksīda šķīdumiem. Sintezētais apatīta pulveris tika karsēts 1000 °C 15 h ūdens tvaika vidē, tādējādi iegūstot paraugu ar augstu hidroksiljonu koncentrāciju. Turpmāk karsētais hidroksilapatīta pulveris tiek apzīmēts kā standarta hidroksilapatīts.

Mehāniskie maisījumi kalibrēšanas taisnei tika iegūti, izmantojot standarta hidroksilapatītu un komerciālo fluorapatītu (*Sulzer Metco*). Paraugi svērti ar ± 0,0001 g precizitāti un aptuveni 15–20 min maisīti piestā, lai iegūtu homogēnu maisījumu.

Lai pagatavotu hidroksilapatīta paraugu ar pēc iespējas maz hidroksilgrupām, standarta hidroksilapatīts tika karsēts vakuumā ($1{,}3 \times 10^{-4}$ Pa) pie 1000 °C 20 vai 43 stundas. Lai pagatavotu paraugus ar dažādu hidroksiljonu daudzumu, vakuumā karsētais paraugs (1000 °C, 43 h) tika rehidroksilēts termogravimetrijas iekārtā ar 90 % gaisa mitrumu un 10 ml/min gāzes plūsmu. Paraugs tika karsēts līdz 350, 400 vai 700 °C ar karsēšanas ātrumu 5 °/min un izturēšanas laiku 30 minūtes (350, 400 un 700 °C) vai 1 h (400 °C).

Piemaisījumi standarta hidroksilapatītā tika analizēti ar induktīvi saistītās plazmas masspektrometriju (*ICPMS*), kalcija un fosfora daudzums tika noteikts, izmantojot

atomabsorbcijas spektroskopiju un spektrofotometriju. Kristāliskās fāzes tika analizētas, izmantojot rentgenstaru difraktometriju (*XRD*), funkcionālās grupas noteiktas ar Furjē transformāciju infrasarkano spektroskopiju (*FTIR*). Hidroksiljonu daudzuma noteikšanai izmantota termogravimetriskā analīze (TGA), *FTIR* un *Raman* spektroskopija.

Hidroksilapatīta pārklājumi izgatavoti ar liesmas izsmidzināšanas metodi, izmantojot komerciālo hidroksilapatītu (daļiņu izmērs 20–40 μm). Izsmidzināšana veikta uz komerciāli tīra (1. pakāpe) titāna pamatnēm (12 mm diametrs, apstrādātas ar Al_2O_3 strūklu), kas novietotas 12 cm attālumā no liesmas un uzkarsētas līdz 250 °C. Puse no izgatavotajiem pārklājumiem tika hidrotermiski apstrādāti, noturot tos ūdens tvaikā pie 200 °C 20 h. Lai nodrošinātu hidroksiljonu sarindošanu, visi pārklājumi tika polarizēti elektriskajā laukā (5 kV/cm) pie 400 °C 3 h. HA pārklājumi tika raksturoti, izmantojot *XRD*, *FTIR*, *AFM Kelvin Probe*, SEM un profilometrijas metodes.

In vitro pētījumos izmantoti normāli cilvēka kaula osteoblasti (4. pasāža), kas kultivēti uz HA pārklājumiem vienu, septiņas un 14 dienas. Šūnu morfoloģija, sasaiste, augšana un izplatīšanās uz materiāla tika novērtēta, izmantojot SEM attēlus pēc 1 un 14 dienu kultūras. Šūnu kodols un struktūra tika vizualizēti pēc 1 un 14 dienām, izmantojot iekrāsošanu ar *4',6-diamidino-2-phenylindole* (*DAPI*) un *phalloidin*. Šūnu skaita aprēķinam uz viena veida parauga tika izmantoti 15 attēli (trīs donori, pieci attēli no katra). Lai novērtētu specifisku osteoblastu gēnu aktivitāti uz HA pārklājumiem pēc septiņām un 14 dienām, tika veikta kvantitatīva polimerāzes ķēdes reakcija (*PCR*). Tika izvērtēti specifiski gēni, kas iesaistīti dažādās osteoblastu attīstības stadijās: 1. tipa kolagēns (*Col1a1*), transkripcijas faktors 2 (*RUNx2*), ostekalcīns (*OCN*) un osteopontīns (*OPN*).

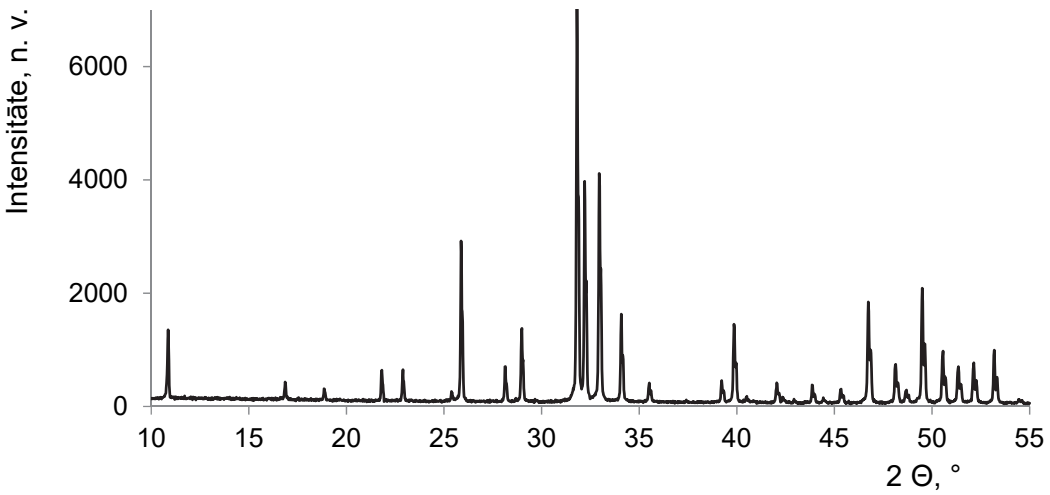
4. GALVENIE REZULTĀTI

4.1. 1. DAĻA Hidroksiljonu daudzuma mērīšana hidroksilapatītā

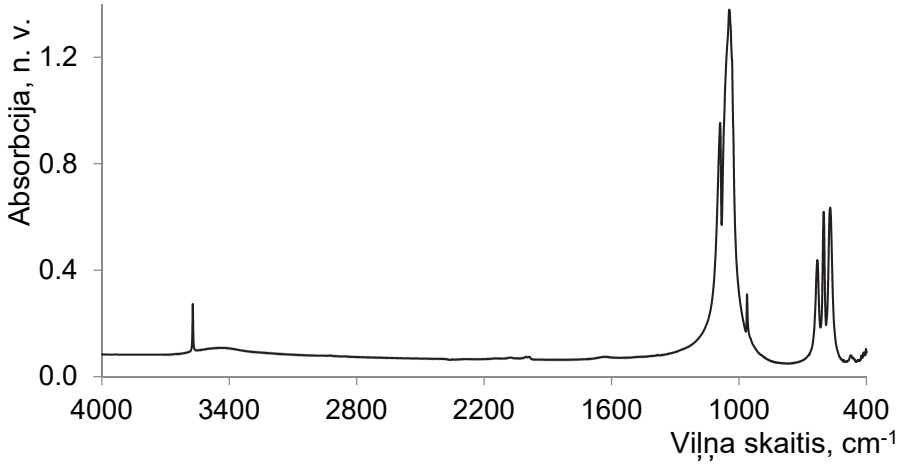
Standarta hidroksilapatīts

Standarta hidroksilapatīts sintezēts, izmantojot ķīmisko nogulsnēšanas metodi. Lai izvairītos no piemaisījumiem, tika izmantoti analītiski tīri reaģenti, kalcija un fosfora attiecības nodrošināšanai reaģenti tika izmantoti stehiometriskā daudzumā, kā arī reakcija tika veikta paaugstinātā temperatūrā, tādējādi izvairoties no karbonātu iekļaušanas struktūrā un palielinot kristālu izmēru un strukturālo kārtību. Lai nodrošinātu, ka sintezētais hidroksilapatīts ir kristālisks un satur maksimāli daudz hidroksiljonus, tas tika karsēts ūdens tvaika atmosfērā. Turpmāk šis termiski apstrādātais hidroksilapatīts ir apzīmēts kā standarta hidroksilapatīts.

Fāžu sastāva analīze, izmantojot *ICDD* datubāzi, uzrādīja, ka visi difrakcijas maksimumi atbilst hidroksilapatīta fāzei (4.1. attēls). Arī *FTIR* spektrā visas absorbcijas joslas atbilst hidroksilapatītam (4.2. attēls), spektrā skaidri identificējamas hidroksiljoniem raksturīgās abosrbcijas joslas pie 632 un 3570 cm^{-1}.



4.1. attēls. Standarta hidroksilapatīta rentgendifraktogramma.



4.2. attēls. Standarta hidroksilapatīta *FTIR* spektrs.

Izmērītā Ca/P molārā attiecība standarta hidroksilapatītam bija 1,66. *ICP-MS* rezultāti apkopoti 4.1. tabulā un rāda piemaisīju koncentrāciju paraugā. Visu noteikto piemaisījumu koncentrācijas ir zemākas par ISO13779-1:2008(E) standartā [8] noteikto, maksimāli atļauto limitu.

4.1. tabula

ICP-MS rezultāti standarta hidroksilapatītam (µg/g)

Cr^{52}	Mn^{55}	Co^{59}	Ni^{60}	Cu^{63}	Zn^{67}	As^{75}	Sr^{88}	Cd^{111}	Pb^{207}
0,07 ± 0,004	0,13 ± 0,01	0,22 ± 0,08	3,80 ± 0,01	0,15 ± 0,04	0,42 ± 0,12	0,077 ± 0,008	26,6 ± 0,9	0,06 ± 0,004	0,49 ± 0,06

Noteiktās koncentrācijas Rb, Ba, Ce un Hg ir zemākas par 0,01 µg/g.

Iegūtais standarta hidroksilapatīts tika izmantots visos turpmākajos eksperimentos, lai attīstītu metodi hidroksiljonu daudzuma mērīšanai hidroksilapatītā. Iepriekš minētie rezultāti pierāda, ka izmantotais materiāls ir tīrs, stehiometrisks hidroksilapatīts.

Termogravimetrijas analīze

Karsēšanas laikā hidroksiljoni no hidroksilapatīta struktūra izdalās ūdens veidā. Zinot svara zudumu, kas rodas ūdens izdalīšanās rezultātā, iespējams izrēķināt hidroksiljonu daudzumu materiālā. Lai attīstītu metodi hidroksiljonu daudzuma noteikšanai ar termogravimetrijas analīzi, tika apskatītas trīs termiskās reakcijas, kuru rezultātā no apatīta struktūras izdalās ūdens:

1) standarta hidroksilapatīts karsēts, līdz tas sadalās par *TTCP* un *TCP*

$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 \rightarrow 2Ca_3(PO_4)_2 + Ca_4(PO_4)_2O + H_2O$;

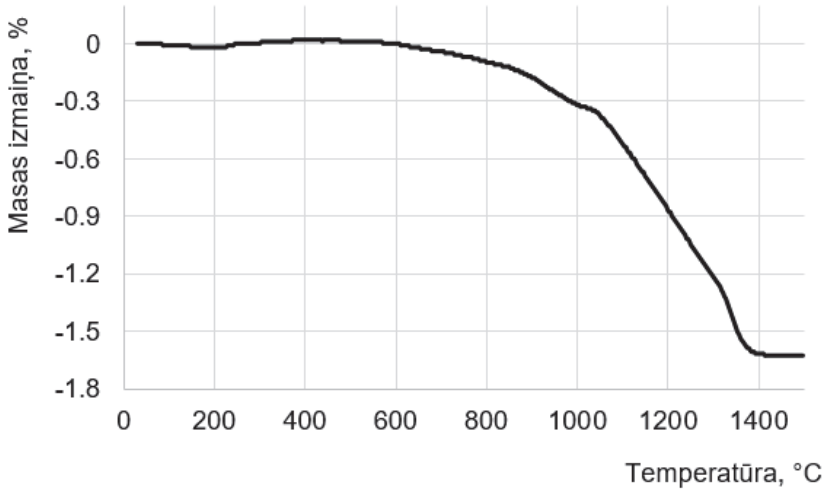
2) standarta hidroksilapatīta un kalcija pirofosfāta maisījuma karsēšana

$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + Ca_2P_2O_7 \rightarrow 4Ca_3(PO_4)_2 + H_2O$;

3) standarta hidroksilapatīta un kalcija fluorīda maisījuma karsēšana

$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + CaF_2 \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6F_2 + CaO + H_2O$.

Termiskās analīzes rezultāti uzrādīja svara zudumu visās reakcijās, taču reakciju kinētika atšķīrās, par ko var spriest, salīdzinot reakciju sākuma temperatūras un ūdens izdalīšanās ātrumu. Pirmajā reakcijā hidroksilapatīts tika karsēts bez papildu reaģentiem, attiecīgā termogravimetrijas līkne uzrādīta 4.3. attēlā. Šai reakcijai raksturīga augsta termiskā stabilitāte, par ko liecina plašais temperatūras diapazons, kurā notiek parauga svara izmaiņas. Ūdens izdalīšanās reakcija sākās pie 600 °C un turpinājās līdz pat hidroksilapatīta sadalīšanās temperatūrai 1350–1450 °C.

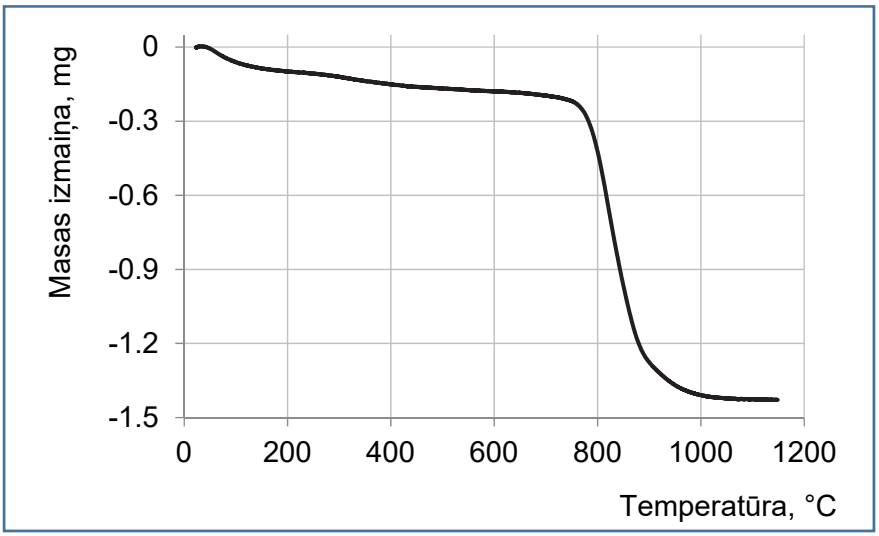


4.3. attēls. Standarta hidroksilapatīta termogravimetrijas līkne.

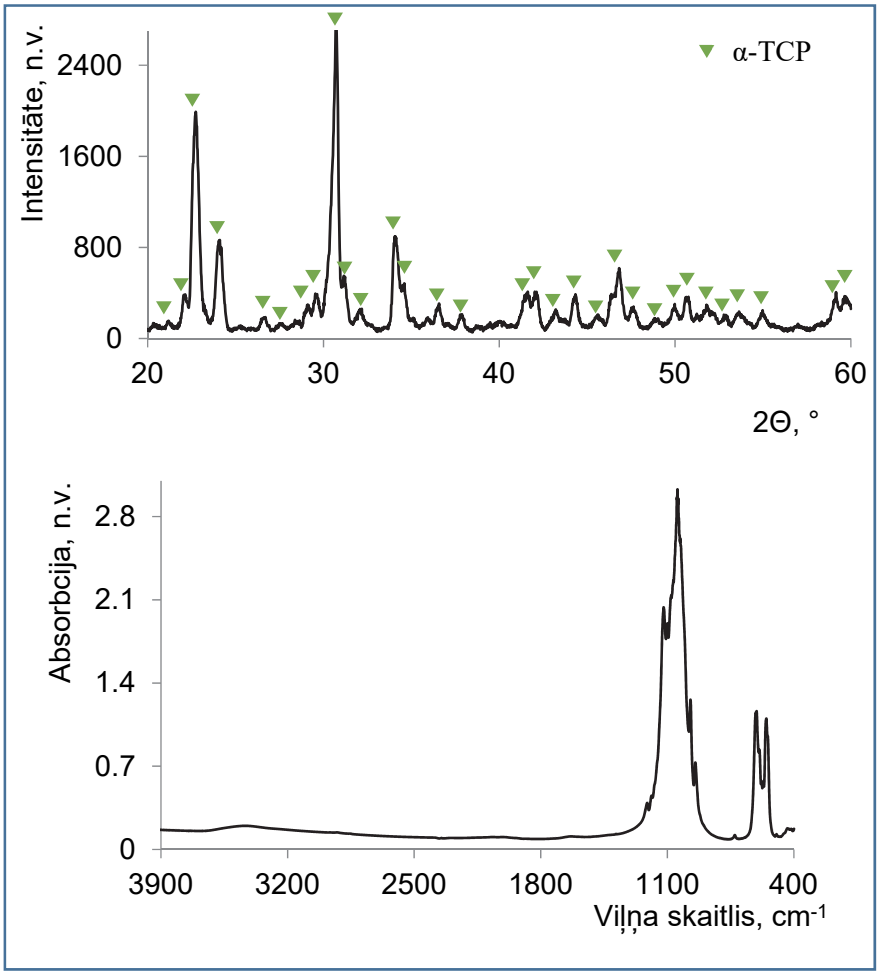
Termiskā reakcija starp hidroksilapatītu un kalcija pirofosfātu sākās pie 600 °C, taču, salīdzinot ar pirmo reakciju, tā notika daudz ātrāk, un reakcijas beigas iezīmējas pie 1050 °C (4.4. attēls). To, ka reakcija notikusi līdz galam (visi hidroksiljoni ir izdalījušies ūdens veidā), rāda *XRD* un *FTIR* rezultāti paraugam pēc termiskās analīzes. Tika detektēta tikai α-TCP fāze, kas arī tika sagaidīts atbilstoši reakcijas vienādojumam (4.4. attēls). Reakcija starp HA un kalcija fluorīdu sākās vēl zemākā temperatūrā (450 °C) un bija pabeigta 900 °C.

Termiskā reakcija

$$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + Ca_2P_2O_7 \rightarrow 4Ca_3(PO_4)_2 + H_2O$$



Reakcijas produkta raksturošana



4.4. attēls. TGA līkne HA un *CPP* maisījumam un termiskās reakcijas produkta raksturošana ar *XRD* un *FTIR*.

Izteiktais masas zudums TGA līknē ļauj aprēķināt hidroksiljonu daudzumu hidroksilapatītā, izmantojot šādu formulu:

$$OH^{-}(\%) = \frac{OH^{-} masas\ zudums \times M_{HA}}{M_{OH}},$$

kur OH^{-} – masas zudums tika noteikts no TGA līknes;

M_{HA} – hidroksilapatīta molārmasa;

M_{OH} – hidroksiljonu molārmasa.

Eksperimentālie rezultāti apkopoti 4.2. tabulā. Masas zudums līdz 400 °C ir saistīts ar adsorbētā ūdens izdalīšanos, un tas aprēķinos netiek ņemts vērā. Rezultātus būtiski ietekmē paraugu sagatavošana (galvenokārt maisījuma homogenitāte), tāpēc katrai reakcijai tika pagatavoti un analizēti vismaz trīs paraugi un rezultātos iekļauta aprēķinātā standartnovirze.

4.2. tabula

Hidroksiljonu daudzums standarta hidroksilapatītā, izmantojot termisko analīzi

Termiskā reakcija	Reakcijas temperatūra, °C	Masas izmaiņa no OH^{-} izdalīšanās, %	* OH^{-} daudzums, %	vidējais OH^{-} daudzums ± *stdev*, %
HA	600–1450	1,53	85,45	84,47 ± 6,83
		1,63	90,75	
		1,38	77,20	
HA + CPP	600–1050	1,74	96,96	102,12 ± 5,11
		1,77	98,83	
		1,94	107,94	
		1,88	104,77	
HA + CaF_2	450–850	1,90	105,98	99,83 ± 5,66
		1,77	98,71	
		1,70	94,82	

* salīdzinot ar teorētisko OH^{-} daudzumu stehiometriskā HA: 1,79 %.

No iegūtajiem rezultātiem secināms, ka pirmā reakcija (HA karsēšana līdz sadalīšanās temperatūrai), nedod skaidrus un precīzus rezultātus par hidroksiljonu daudzumu. Tas galvenokārt saistīts ar HA augsto termisko stabilitāti. Piemērotākas reakcijas ar precīzākiem rezultātiem ir, gan izmantojot kalcija fluorīdu, gan kalcija pirofosfātu, jo šajā gadījumā ūdens izdalīšanās reakcija notiek ātrāk un zemākā temperatūrā: 450–900 °C HA reakcijai ar CaF_2 un 600–1050 °C HA reakcijai ar *CPP*. Taču zemā reakcijas sākuma temperatūra, izmantojot CaF_2, var radīt grūtības precīzai reakcijas sākuma temperatūras noteikšanai gadījumā, ja absorbētais ūdens HA struktūrā ir stabilizēts ar kapilārajiem efektiem. Šādā gadījumā hidroksiljonu izdalīšanās sākuma temperatūra varētu pārklāties ar adsorbētā ūdens aizvadīšanas temperatūru.

Cieta stāvokļa reakcijas būtiski ietekmē daļiņu izmērs, tāpēc gadījumā, ja HA daļiņas ir pārāk lielas, reakcija varētu nenotikt līdz galam. Kā arī, sagatavojot mehānisko maisījumu, vienmēr pastāv risks, ka tas nav pilnīgi homogēns. Liela nozīme ir arī tam, cik labi paraugs ir

iepriekš izžāvēts, un vienmēr pastāv pieņēmums, ka paraugs nesatur nevienu citu gaistošu vielu, kas var izdalīties tajā pašā temperatūras diapazonā kā ūdens un ietekmēt kopējo rezultātu. Līdz ar to, lai gan no teorētiskā viedokļa termiskā analīze ir vienkārša un sniedz tūlītējus skaitliskus rezultātus, praktiski precīzu rezultātu iegūšana saistīta ar vairākiem pieņēmumiem.

Termiskā analīze pierādīja, ka standarta hidroksilapatīts satur 100 % hidroksiljonus – praktiski aprēķinātais OH^- daudzums kļūdas robežās sakrīt ar teorētisko OH^- koncentrāciju stehiometriskā hidroksilapatītā.

Furjē transformāciju infrasarkanā spektroskopija

Hidroksiljonu absorbcijas joslas Furjē transformāciju infrasarkanajā spektrā var tikt izmantotas ne tikai kvalitatīvai, bet arī kvantitatīvai analīzei. Dažādus paraugus var salīdzināt, mērot absorbcijas joslu intensitāti vai laukumu. Hidroksiljonu absorbcijas joslu spektrā neietekmē citi piemaisījumi, tāpēc šī metode sniedz ticamākus rezultātus nekā TGA.

Kvantitatīvu rezultātu iegūšanai nepieciešams izstrādāt kalibrēšanas taisni, izmantojot paraugus ar zināmu hidroksiljonu daudzumu. Šim nolūkam nepieciešams HA ar maksimāli daudz hidroksiljoniem un HA bez hidroksiljoniem (oksiapatīts). Šajā pētījumā izmantotas divas metodes, lai izgatavotu HA paraugus ar dažādu hidroksiljonu koncentrāciju:

1. standarta hidroksilapatīta un fluorapatīta (FA nesatur OH^-, taču tā struktūra ir līdzīga HA) mehāniskie maisījumi dažādās attiecībās;
2. dažādi oksihidroksilapatīta (OHA) cietie šķīdumi.

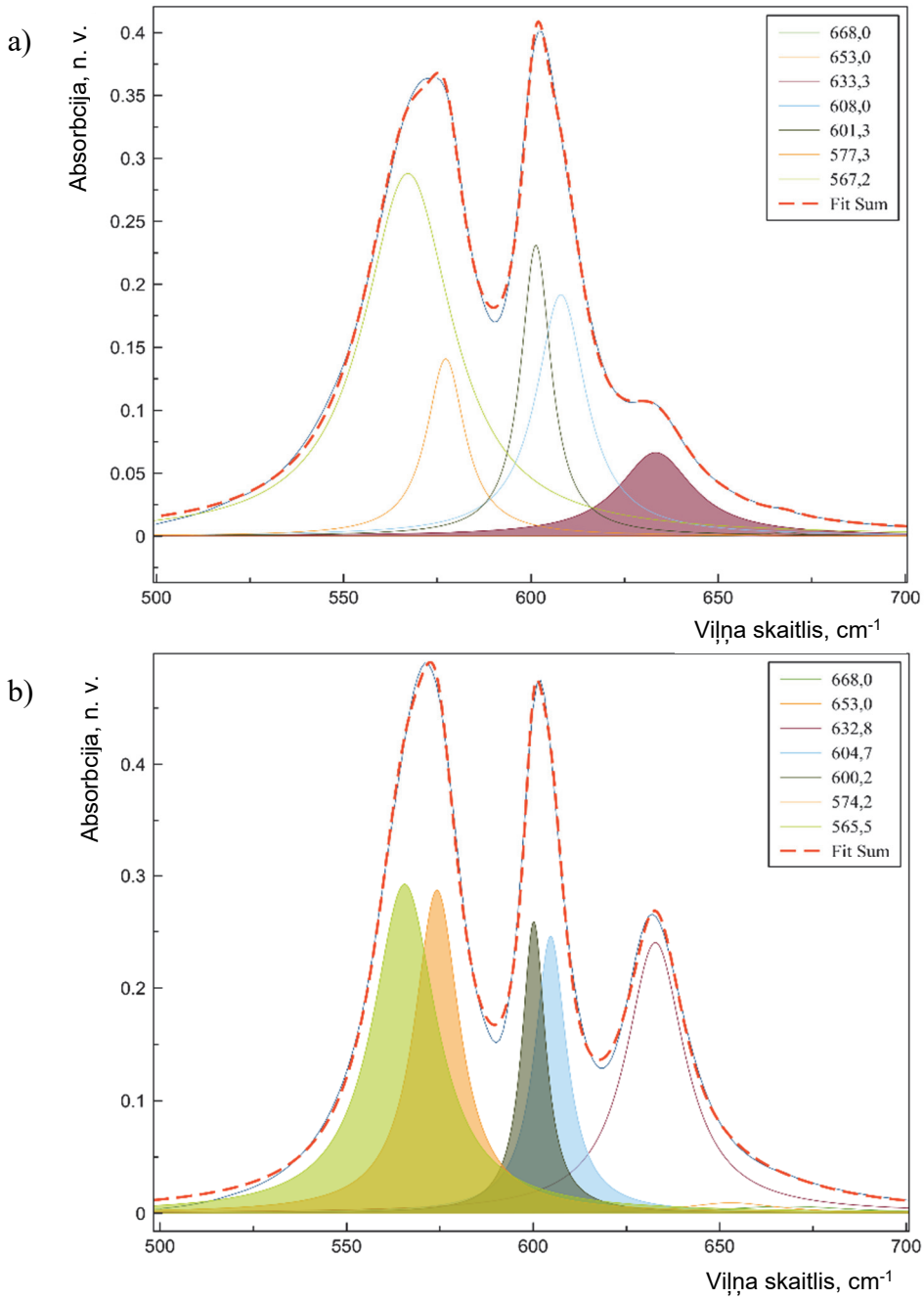
<u>Hidroksilapatīta/fluorapatīta mehāniskie maisījumi</u>

Kalibrēšanas taisne tika izveidota, izmantojot standarta HA un komerciāla FA mehāniskos maisījumus dažādās attiecībās (HA koncentrācija svara procentos 0, 25, 50, 75 un 100). Katram maisījumam tika reģistrēti un analizēti trīs spektri (izmantojot KBr paraugu sagatavošanas metodi) un aprēķināta standartnovirze. Hidroksiljonu daudzuma mērīšanai tika izvēlēta absorbcijas josla pie 632 cm^{-1}, jo atbilstoši literatūrā minētajam tā ir jutīgāka nekā josla pie 3571 cm^{-1} [9]. Lai atdalītu OH^- absorbcijas joslu no fosfāta absorbcijas joslām, tika veikta spektra dekonvulēšana (pīķu matemātiska atdalīšana) 500–700 cm^{-1} apgabalā, un OH^- un PO_4^{3-} pīķu laukumu mērīšana, izmantojot studentu brīvpiekļuves programmu *MagicPlot*.

Labākā matemātiskā sakarība pīķu aprakstīšanai pēc spektra bāzes līnijas korekcijas, izmantojot lorenciālo funkciju parādīta 4.5. attēlā. Visiem analizējamajiem paraugiem tika izmantots tas pats dekonvulēšanas modelis, ko veido septiņi atdalīti pīķi. Lai precīzāk raksturotu analizējamos spektrus un iegūtu labāku matemātisko sakarību (tādu, kas pēc iespējas tuvāk apraksta patieso spektru), trīs apatīta fāzei raksturīgie ν_4 fosfātu pīķi (567, 574 un 601 cm^{-1}) tika uzrādīti kā četras smailes 600 līdz 565 cm^{-1} apgabalā. Dekonvulūcijas modelim tika pievienoti vēl divi nelieli pīķi pie 653 un 668 cm^{-1}. Absorbcijas josla pie 668 cm^{-1} jau iepriekš minēta literatūrā un ir raksturīga fluorapatīta paraugiem [10]. Josla pie 653 cm^{-1} varētu būt saistīta ar adsorbēto ūdeni, kas tiek iekļauts paraugā KBr tabletes gatavošanas laikā. Abu šo pīķu laukumi (653 un 668 cm^{-1}) netiek izmantoti hidroksiljonu daudzuma aprēķinos.

Tika izrēķināta OH^- absorbcijas pīķa pie 632 cm^{-1} laukuma attiecība pret ν_4 PO_4^{3-} absorbcijas pīķu pie 565–600 cm^{-1} un attiecināta pret hidroksiljonu daudzumu paraugā

(atbilstoši HA fāzes saturam svara procentos). Šāda iekšējās atskaites izmantošana mazināja parauga iesvara ietekmi uz rezultātiem.



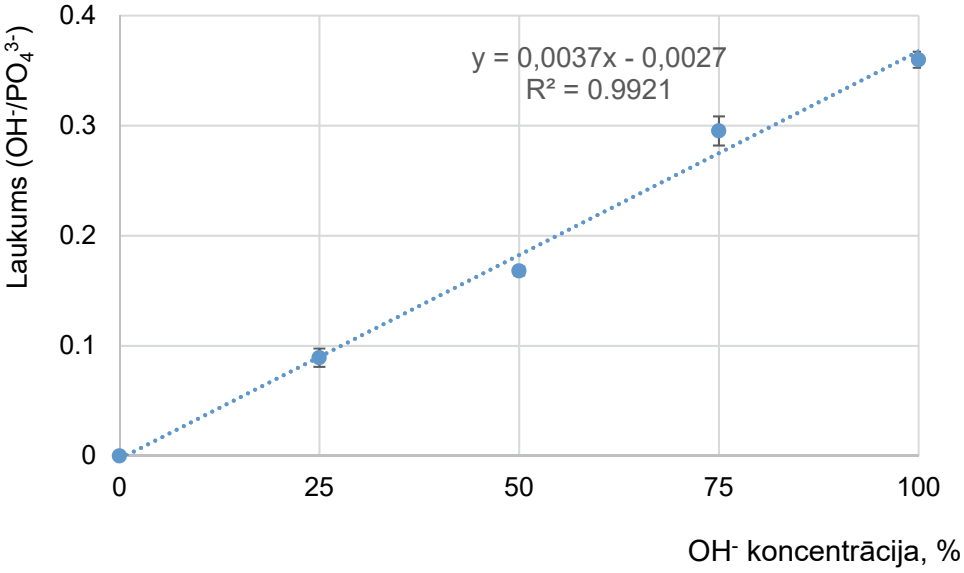
4.5. attēls. Dekonvulēts FTIR spektrs: (a) HA/FA mehāniskais maisījums ar 25 % HA, (b) HA/FA mehāniskais maisījums ar 75 % HA. Uzskatāmības pēc aprēķinos izmantotais OH^- pīķa laukums ir iekrāsots a attēlā, un kopējais PO_4^{3-} pīķu laukums ir iekrāsots b attēlā.

No iegūtajiem rezultātiem tika izveidota kalibrācijas taisne, uz abscisas atliekot HA fāzes saturu paraugā, uz ordinātas – OH^-/PO_4^{3-} pīķu laukumu attiecību (4.6. attēls). Kalibrēšanas taisnes aproksimācijas labuma koeficients (R^2), kas ļauj novērtēt, cik labi modelis atbilst

eksperimentālajiem datiem, ir 0,9921. OH^- koncentrācija nezināmam paraugam var tikt aprēķināta, izmantojot vienādojumu:

$$x = \frac{y + 0{,}0027}{0{,}0037},$$

kur x ir OH^- koncentrācija un y ir OH^-/PO_4^{3-} attiecība.



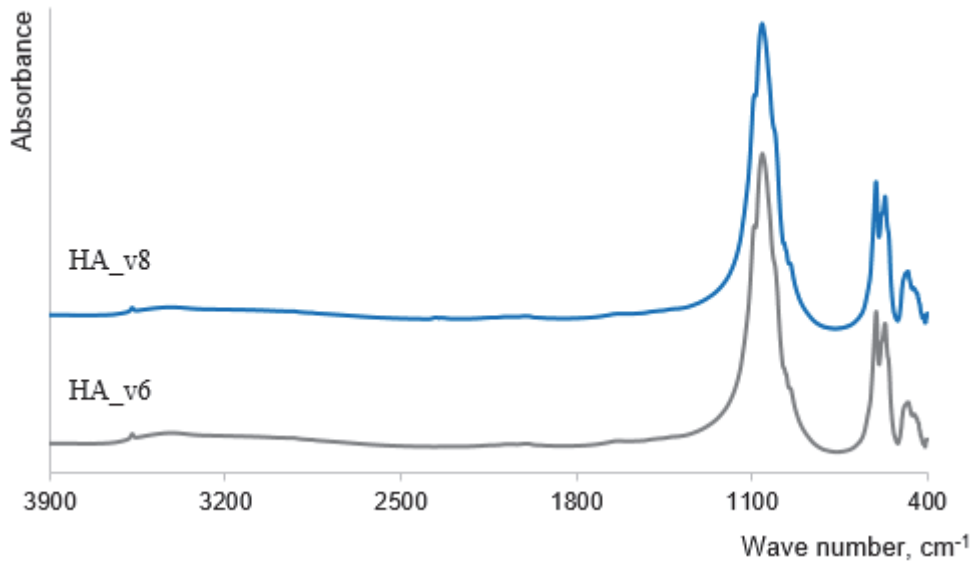
4.6. attēls. Kalibrēšanas taisne hidroksiljonu daudzuma noteikšanai hidroksilapatītā, izmantojot OH^- pie 632 cm^{-1} un PO_4^{3-} pie 565–600 cm^{-1} pīķu laukumus *FTIR* spektrā.

Metodes linearitāte ir pierādīta atbilstoši izveidotajai kalibrēšanas taisnei un tās vienādojumam. Lai novērtētu metodes precizitāti un pareizību, tika sagatavoti papildu paraugi (mehāniskie maisījumi citās attiecībās nekā kalibrēšanas taisnes izstrādei). Tika iegūts, ka metodes vidējā precizitāte (cik ļoti vērtības atšķiras vienam un tam pašam paraugam) ir ± 2 % (līdz 3 %, apskatot individuālas vērtības), savukārt metodes vidējā pareizība (cik tuvu mērījums atbilst tā patiesajai vērtībai) ir ±6 % (līdz 14 %, apskatot individuālas vērtības). Ņemot vērā lielo atšķirību, kas novērota starp individuālām vērtībām, tiek secināts, ka precīzu rezultātu iegūšanai, nepieciešams analizēt vismaz trīs paralēlos paraugus un izmantot vidējo vērtību.

Oksihidroksilapatīti

Oksihidroksilapatīts ar vismazāko daudzumu OH^- tika iegūts, karsējot standarta hidroksilapatītu 1000 °C vakuumā ar izturēšanas laiku 20 vai 43 stundas. *XRD* rezultāti apstiprināja, ka iegūtajos OHA paraugos nav sadalīšanās produktu, visi difrakcijas maksimumi atbilst hidroksilapatīta fāzei. Arī *FTIR* spektri uzrādīja tikai apatīta fāzei raksturīgās absorbcijas joslas (4.7. attēls). Vājās OH^- absorbcijas joslas pie 3570 un 632 cm^{-1} un PO_4^{3-} josla pie 961 cm^{-1} raksturīgas hidroksilapatīta fāzei, savukārt PO_4^{3-} absorbcijas joslas pie 433, 475 un 945 cm^{-1} ir raksturīgas OAp [4].

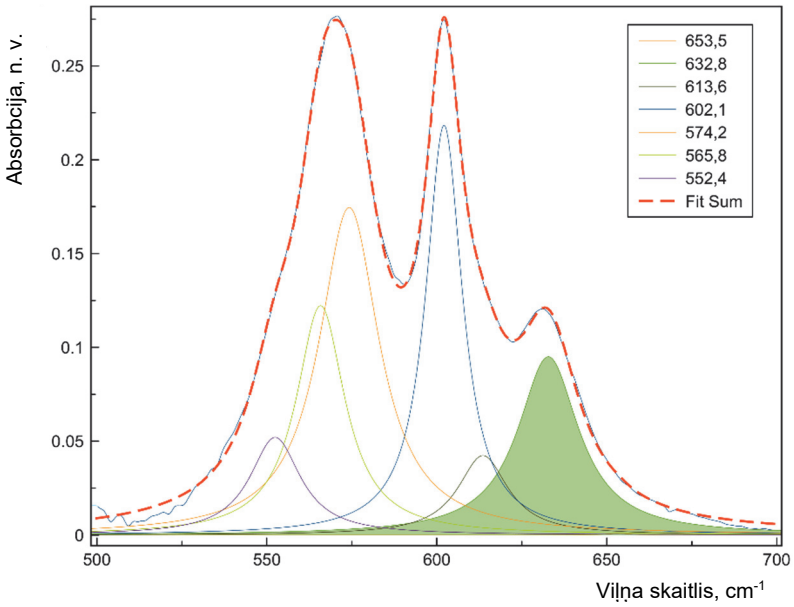
Lai izgatavotu vairāk paraugu ar dažādu OH^- koncentrāciju, HA_v8 paraugs tika rehidroksilēts. Hidroksiljoni tika iesaistīti parauga struktūrā, to karsējot dažādās temperatūrās ar dažādu noturēšanas laiku atmosfērā, kuras relatīvais mitrums bija 90 %.



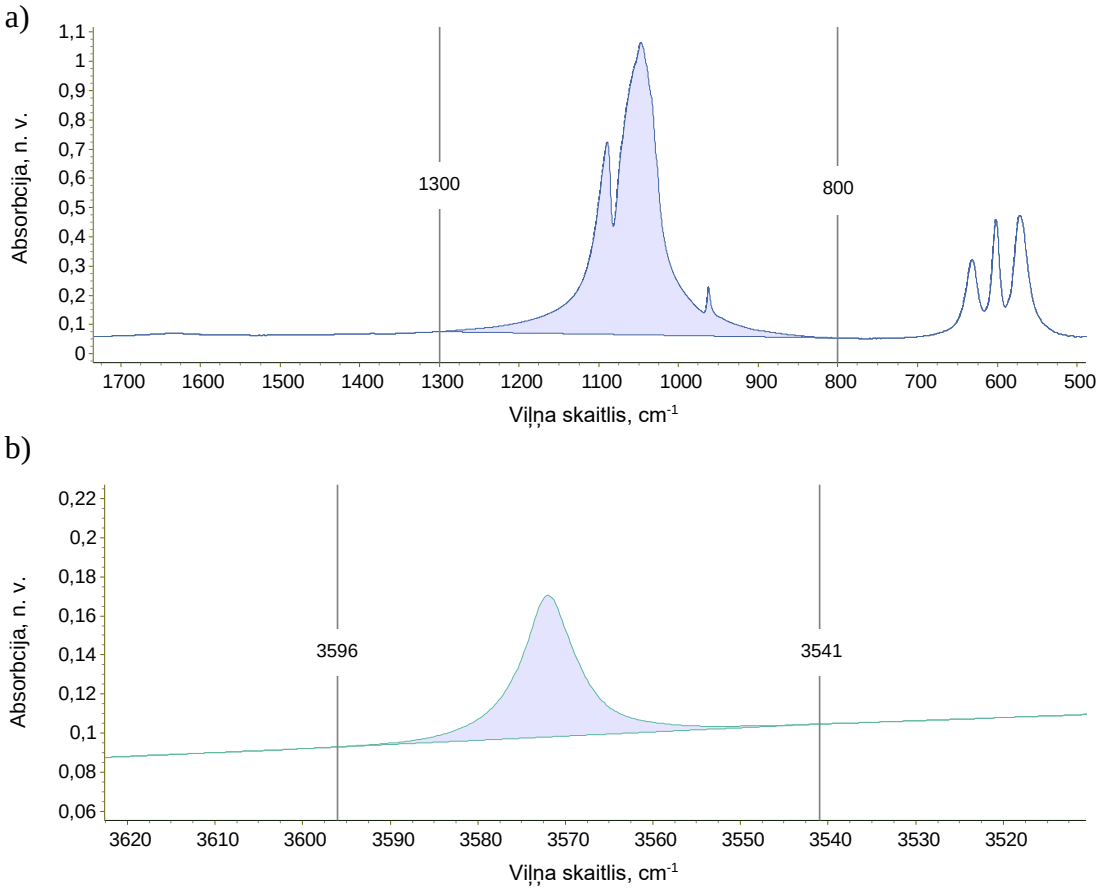
4.7. attēls. Vakuumā karsētu hidroksilapatītu *FTIR* spektri.

Visiem pagatavotajiem OHA paraugiem tika aprēķināts OH^- daudzums. No katra parauga tika sapresētas vismaz trīs KBr tabletes un reģistrēts *FTIR* spektrs. OH^- daudzuma aprēķināšanai tika izmantotas divi paņēmieni:

1. aprēķināta OH^- absorbcijas joslas pie 632 cm^{-1} un ν_4 PO_4^{3-} absorbcijas joslu laukumu attiecība; pīķu atdalīšanai tika veikta spektra dekonvulēšana 500 līdz 750 cm^{-1} diapazonā; dekonvulēšanas rezultātā precīzākais matemātiskais modelis OHA paraugos izšķīra piecas fosfātu absorbcijas joslas (4.8. attēls);
2. aprēķināta OH^- absorbcijas joslas pie 3570 cm^{-1} (spektra diapazons: 3596–3541 cm^{-1}) un PO_4^{3-} absorbcijas joslu spektra diapazonā starp 800 un 1300 cm^{-1} laukumu attiecība (4.9. attēls); šajā gadījumā dekonvulēšana netika veikta.



4.8. attēls. Dekonvulēts HA_v8_reh400-1h parauga *FTIR* spektrs. Uzskatāmības pēc OH^- pīķa laukums, kas tiek izmantots turpmākiem aprēķiniem, ir iekrāsots.



4.9. attēls. *FTIR* spektri ar iekrāsotiem (a) PO_4^{3-} un (b) OH^- absorbcijas joslu laukumiem OH^- daudzuma aprēķināšanai (paraugs: HA_v8_reh400-1h).

Aprēķinātie hidroksiljonu daudzumi ir apkopoti 4.3. tabulā. Aprēķins balstīts uz divām pieejām: 1) tiek pieņemts, ka standarta HA ir 100 % OH^-, līdz ar to, zinot OH/PO_4 attiecību standarta HA, tiek aprēķināts hidroksiljonu daudzums pārējos paraugos; 2) hidroksiljonu daudzums paraugos aprēķināts, izmantojot kalibrēšanas taisnes vienādojumu. Rezultāti, kas iegūti, izmantojot kalibrēšanas taisni, ir par 1–3 % lielāki, kas varētu būt izskaidrojams ar to, ka šo rezultātu iegūšanai tika izmantota cita *FTIR* iekārta, taču jāņem vērā, ka mērījumu standartnovirzes ir līdz 3 %.

Hidroksiljonu daudzuma aprēķini, izmantojot absorbcijas joslu pie 3570 cm^{-1} sakrīt ar rezultātiem, kas iegūti, izmantojot absorbcijas joslu pie 632 cm^{-1} tikai daļai no paraugu, kur hidroksiljonu daudzums ir lielāks par 50 %. Paraugos ar mazāku hidroksiljonu daudzumu absorbcijas joslas pie 3570 cm^{-1} izmantošana rada 15–55 % kļūdu, tiek uzrādīti vairāk hidroksiljoni nekā patiesībā jābūt. Tas skaitliski pierāda literatūrā izskanējušo apgalvojumu, ka absorbcijas josla pie 3570 cm^{-1} *FTIR* spektrā ir mazāk jutīga OH^- identificēšanai [9].

Tika veikti papildu eksperimenti, lai novērtētu iekārtas ietekmi uz rezultātiem, un tika atklāta aptuveni 3 % nobīde, taču jāuzsver, ka mērījumu standartnovirze arī bija līdz 3 % (relatīvā standartnovirze līdz pat 8 %).

4.3. tabula

Hidroksiljonu daudzums OHA paraugos, aprēķināts no *FTIR* spektriem

Parauga nosaukums	OH^- (632 cm^{-1}) / ν_4 PO_4^{3-}			OH^- (3596–3541 cm^{-1}) / PO_4^{3-} (1300–800 cm^{-1})	
	Vidējais (OH/ PO_4)	**OH^- daudzums, ± *stdev* % (RSD, %)** *Pieņemot, ka standarta HA ir 100 %*	**OH^- daudzums ± *stdev*, % (RSD, %)** *No HA/FA kalibrēšanas taisnes*	**Vidējais (OH/ PO_4)**	**OH^- daudzums, ± *stdev* % (RSD, %)** *Pieņemot, ka standarta HA ir 100 %*
Standarta HA	0,38	100	102,93 ± 3,22 (3,13)	0,0082	100
HA_v8_reh700	0,37	98,57 ± 0,89 (0,91)	101,47 ± 0,91 (0,90)	0,0085	104,54 ± 1,20 (1,15)
HA_v8_reh400-1h	0,26	67,47 ± 2,62 (3,88)	69,69 ± 2,67 (3,84)	0,0057	69,71 ± 5,64 (8,18)
HA_v8_reh400	0,22	58,50 ± 2,21 (3,78)	60,52 ± 2,26 (3,74)	0,0048	59,07 ± 4,59 (7,78)
HA_v8_reh350	0,14	37,34 ± 2,26 (6,04)	38,89 ± 2,31 (5,93)	0,0036	43,69 ± 2,29 (5,24)
HA_v6	0,05	12,22 ± 1,01 (8,24)	13,22 ± 1,03 (7,78)	0,0018	21,72 ± 0,51 (2,36)
HA_v8	0,03	8,30 ± 0,27 (3,22)	9,21 ± 0,27 (2,96)	0,0015	18,67 ± 1,19 (6,36)

***Raman* spektroskopija**

Hidroksiljonu daudzuma noteikšanai var tikt izmantota arī *Raman* spektroskopija. Salīdzinot ar *FTIR* metodi, *Raman* spektroskopijas gadījumā nav nepieciešama ilga paraugu sagatavošana, kā arī netiek izmantoti papildu reaģenti (kā higroskopiskais KBr *FTIR* gadījumā). OH^- daudzuma aprēķināšanai tika izmantota tāda pati metode, kā aprakstīts iepriekš: aprēķināta OH^- vibrācijas joslas pie 3570 cm^{-1} (spektra rajons: 3560–3590 cm^{-1}) un ν_1 PO_4^{3-} vibrācijas joslas spektra rajonā no 920 līdz 990 cm^{-1} laukumu attiecība.

Izmantojot *Raman* spektrus, aprēķinātā OH^- koncentrācija tika salīdzināta ar *FTIR* rezultātiem (4.4. tabula). *Raman* rezultāti uzrādīja par 20–30 % mazāk hidroksiljonus, salīdzinot ar *FTIR* metodi. Šāda rezultātu starpība tika novērota visiem OHA paraugiem. Jāpiemin arī, ka relatīvā standartnovirze paraugiem ar mazu OH^- saturu ir ļoti liela (līdz pat 38 %). Šie rezultāti atbilst teorijai, ka polārām saitēm novērojams vājš *Raman* signāls [11], taču skaitliskā veidā tas ir parādīts pirmo reizi. Šis novērojums ir ļoti būtisks, ņemot vērā, ka daudzi apatītu pētnieki izmanto *Raman* spektroskopiju, lai raksturotu hidroksiljonus materiālā [12, 13].

4.4. tabula

Hidroksiljonu daudzums OHA paraugos, aprēķināts no *Raman* un *FTIR* spektriem

Parauga nosaukums	**no *Raman***	**no *FTIR***	**OH^- (*Raman*)/ OH^- (*FTIR*)**
	OH^- daudzums ± *stdev*, % (RSD, %) *Pieņemot, ka standarta HA ir 100 %*		
Standarta HA	100	100	
HA_v8_reh700	96,02 ± 0,77 (0,80)	98,57 ± 0,89 (0,91)	0,97
HA_v8_reh400-1h	49,68 ± 0,75 (1,51)	67,47 ± 2,62 (3,88)	0,74
HA_v8_reh400	42,40 ± 1,29 (3,05)	58,50 ± 2,21 (3,78)	0,72
HA_v8_reh350	28,56 ± 3,07 (10,76)	37,34 ± 2,26 (6,04)	0,76
HA_v6	9,47 ± 3,63 (38,35)	12,22 ± 1,01 (8,24)	0,77
HA_v8	6,25 ± 1,62 (25,97)	8,30 ± 0,27 (3,22)	0,75

Literatūrā ir minēts, ka oksiapatīts ir ļoti nestabils [14], un ir izskanējušas bažas, ka ilgstošas lāzerapstarošanas rezultātā varētu notikt paraugu degradācija vai pat sadalīšanās. Lai novērtētu to, vai *Raman* spektroskopijas laikā, apstarojot paraugu ar lāzeri, OHA paraugi zaudē hidroksiljonus, tika veikts eksperiments, apstarojot HA_v8 un HA_v8_reh350 paraugus 100 min ar 514,5 nm lāzeru (100 % enerģija), *Raman* spektrs tika uzņemts ik pēc 20 min. Rezultāti neuzrādīja nekādu būtisku atšķirību hidroksiljonu koncentrācijas maiņā, tāpēc tas ļauj secināt,

ka *Raman* spektroskopijas lāzera radītais siltums nav pietiekams, lai ietekmētu hidroksiljonu daudzumu OHA paraugos.

Vadlīnijas hidroksiljonu daudzuma noteikšanai hidroksilapatītā

Termogravimetrijas analīze ļauj noteikt OH^- koncentrāciju, izmantojot svara zudumu, kas rodas ūdens izdalīšanās rezultātā. Termiskā reakcija starp hidroksilapatītu un kalcija pirofosfātu vai kalcija fluorīdu nodrošina ūdens izdalīšanos zemākā temperatūrā nekā vienkārši karsējot hidroksilapatītu. Izmantojot termisko analīzi OH^- daudzuma noteikšanai, paraugs nedrīkst saturēt citas viegli gaistošas fāzes, piemēram karbonātu. Precīzai hidroksiljonu koncentrācijas noteikšanai vēlams ņemt vērā šādus faktus:

- paraugu pirms termiskās analīzes nepieciešams analizēt ar citām metodēm (vismaz *XRD* un *FTIR*), lai pārliecinātos, ka tas nesatur citas fāzes vai elementus, kas varētu reaģēt ar vielām, kas tiek izmantotas termiskās reakcijas veikšanai, un/vai radītu papildu svara zudumu tajā pašā temperatūras diapazonā, kur notiek hidroksiljonu izdalīšanās;
- pirms maisījuma pagatavošanas rūpīgi jāizžāvē analizējamais paraugs un reaģenti (*CPP* vai CaF_2), lai mazinātu adsorbētā ūdens daudzumu;
- reaģenti jāizmanto pārākumā, lai nodrošinātu hidroksilapatīta pilnīgu reakciju un visu hidroksiljonu izdalīšanos;
- lai nodrošinātu labāku homogenizāciju malšanas laikā, ieteicams pagatavot lielāku maisījuma apjomu nekā nepieciešams vienai TGA analīzei;
- maisījumam jābūt homogēnam, tādēļ malšanas un maisīšanas process jāveic ļoti rūpīgi, atvēlot tam pietiekami daudz laika;
- termogravimetrijas analīze jāveic atmosfērā, kas nesatur mitrumu, lai izvairītos no parauga rehidroksilācijas;
- no TGA rezultātiem jāatdala divi masas zudumi: masas zudums līdz 400 °C ir saistīts ar adsorbētā ūdens izdalīšanos, masas zudums virs 400 °C saistīts ar hidroksiljonu izdalīšanos;
- hidroksilapatīta sauso masu maisījumā var aprēķināt, izmantojot HA/reaģenta attiecību un no TGA nolasīto masas zudumu adsorbētā ūdens izdalīšanās rezultātā:

$$HA\ sausā\ masa = \frac{maisījuma\ sausā\ masa\ \times HA\ masa\ maisījumā}{maisījuma\ masa}$$

$$maisījuma\ sausā\ masa = maisījuma\ masa - adsorb.\ ūdens\ masas\ zudums;$$

- masas zudumu, kas saistīts ar hidroksiljonu izdalīšanos, var aprēķināt, izmantojot masas zudumu termiskās reakcijas rezultātā (adsorbētā ūdens masas zudums šeit netiek izmantots):

$$OH^- masas\ zudums = \frac{reakcijas\ masas\ zudums}{HA\ sausā\ masa};$$

- hidroksiljonu daudzums (%) paraugā tiek aprēķināts, izmantojot hidroksilapatīta molmasu (M_{HA}) un hidroksiljonu molmasu (M_{OH}):

$$OH^-(\%) = \frac{OH^- masas\ zudums\ \times\ M_{HA}}{M_{OH}};$$

- pēc TGA reakcijas paraugu nepieciešams pārbaudīt ar citām analīzes metodēm (vismaz *XRD* un *FTIR*), lai pārliecinātos, ka reakcija notikusi līdz galam (netiek detektēta HA fāze).

Furjē transformāciju infrasarkanā spektroskopija ļauj tiešā veidā identificēt hidroksiljonus, salīdzinot ar TGA, šī ir ātrāka un ērtāk lietojama metode OH^- koncentrācijas noteikšanai. Hidroksiljoniem ir atsevišķa abosrbcijas josla, tāpēc šo metodi neietekmē citu fāžu klātbūtne. Precīzai hidroksiljonu noteikšanai vēlams ievērot:

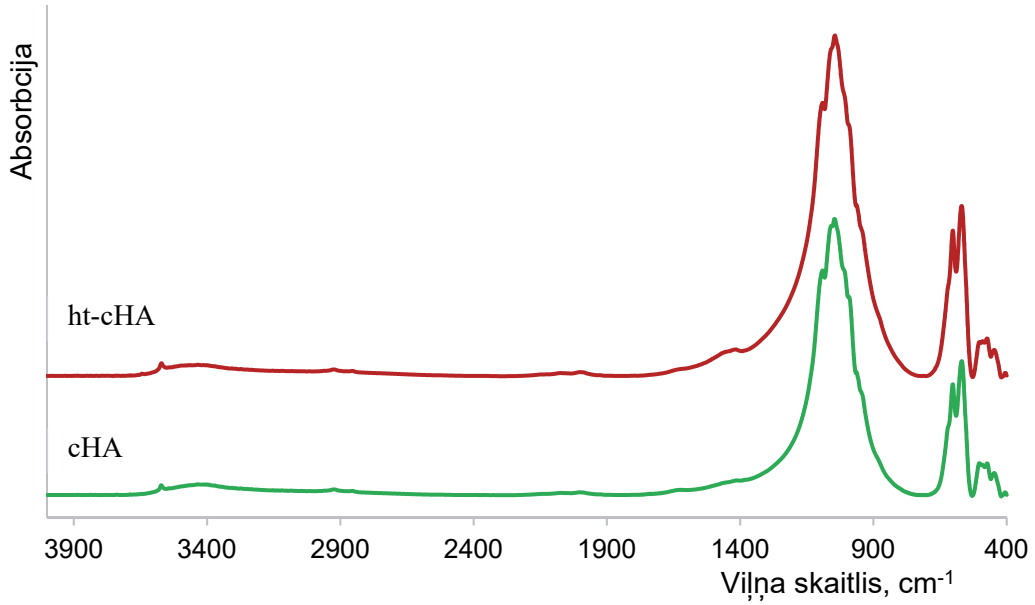
- analizējamajam paraugam un KBr jābūt labi izžāvētiem, lai mazinātu adsorbētā ūdens ietekmi;
  paraugam jābūt labi samaltam piestā vēl pirms KBr pievienošanas;
- neliels samaltā parauga daudzums viegli jāsamaisa ar KBr (šajā pētījumā izmantoti 200 mg KBr), izveidojot homogēnu maisījumu, kas tālāk tiek sapresēts tabletē. Nav ieteicams paraugu mehāniski maisīt ar KBr, jo tas var ietekmēt parauga kristālisko režģi vai pat mainīt hidroksiljonu koncentrāciju;
- parauga daudzumam KBr tabletē vajadzētu būt līdzīgam visos mērījumos. Ņemot vērā, ka tiek izmantoti tikai pāris miligrami parauga un homogenizēšanas laikā daļa no tā paliks pie piestas sieniņām, parauga svēršana nav nepieciešama. Kā arī kristāliskam paraugam spektrs ir intensīvāks un būs nepieciešams mazāks parauga daudzums. Par to, vai izmantots optimāls parauga daudzums, var pārliecināties, sekojot līdz absorbcijas intensitātēm uzņemtajā FTIR spektrā. Maksimālajai spektra intensitātei (fosfātu josla) vajadzētu vienmēr būt robežās no 0,8 līdz 1,2 n. v.;
- no viena parauga nepieciešams uzņemt vismaz trīs spektrus (atsevišķas KBr/parauga tabletes) un aprēķinos izmantot vidējo rezultātu;
- visiem mērījumiem jāizmanto vieni un tie paši iekārtas parametri (šajā pētījumā mērījumi uzņemti ar 4 cm^{-1} izšķiršanas spēju un 64 attēliem);
- ja mērījumi tiek veikti ar dažādām iekārtām, jāveic papildu eksperimenti, lai novērtētu, vai tiek iegūti vienādi rezultāti;
- aprēķiniem jāizmanto hidroksiljonu absorbcijas josla pie 632 cm^{-1}, jo tā ir jutīgāka nekā absorbcijas josla pie 3570 cm^{-1};
- lai atdalītu OH^- un PO_4^{3-} absorbcijas joslas, jāveic spektra dekonvulēšana (atdalīšana) 500–700 cm^{-1}diapazonā. Visiem paraugiem jāizmanto tas pats dekonvulēšanas modelis;
- Jāizmēra OH^- absorbcijas joslas pie 632 cm^{-1} un ν_4 fosfātu absorbcijas joslu laukumi un jāaprēķina OH^-/PO_4^{3-} attiecība;
- lai aprēķinātu hidroksiljonu daudzumu paraugā, jāizmanto kalibrēšanas taisne vai jāsalīdzina aprēķinātā vērtība ar OH^-/PO_4^{3-} attiecību standarta hidroksilapatītā (tādā, kas satur 100 % OH^-). Šajā pētījumā iegūts:
  - kalibrēšanas taisnes vienādojums: $x = \frac{y + 0{,}0027}{0{,}0037}$, kur x ir OH^- koncentrācija paraugā (%) un y ir OH^-/PO_4^{3-} attiecība;
  - OH^-/PO_4^{3-} attiecība HA, kas satur 100 % OH^- ir 0,38 ± 0,012
  - aprēķinātā vidējā metodes pareizība ir 6 % un vidējā precizitāte ir 2 %.

4.2. 2. DAĻA Hidroksiljonu daudzuma ietekme uz hidroksilapatīta pārklājumu šūnu atbildes reakciju

Hidroksilapatīta pārklājumu izgatavošana un raksturošana

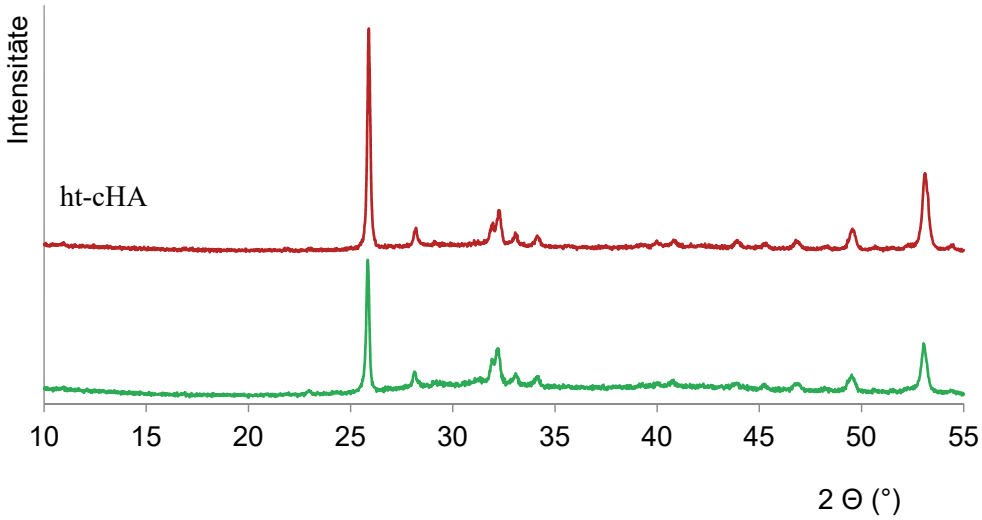
HA pārklājumu izgatavošanai tika izmantots komerciāls hidroksilapatīta pulveris, kas atbilstoši *XRD* un *FTIR* analīzēm satur nelielu daudzumu tetrakalcija fosfātu. Hidroksiljonu koncentrācija komerciālajam pulverim, izmantojot iepriekš aprakstīto *FTIR* metodi, bija 22 ± 2 %. Komerciālā HA analīzes parādīja, ka komerciālajiem produktiem trūkst labas kvalitātes kontroles tehnikas un detalizētas analīzes. Lai gan šis produkts tika pārdots kā hidroksilapatīts termiskajai smidzināšanai, veiktās analīzes parādīja, ka tas ir oksihidroksilapatīts ar nelielu daudzumu sadalīšanās fāzes.

Lai atjaunotu termiskās smidzināšanas laikā zaudētos hidroksiljonus, puse pārklājumu tika hidrotermiski apstrādāti. 4.10. attēlā uzrādīti smidzināto un hidrotermiski apstrādāto HA pārklājumu *FTIR* spektri, kuros identificētas HA, OAp un *TTCP* fāzēm raksturīgās absorbcijas joslas. Aprēķinātā hidroksiljonu koncentrācija bija 11 ± 2 % smidzinātiem pārklājumiem (cHA) un 41 ± 4 % hidrotermiski apstrādātiem pārklājumiem (ht-cHA). Abu veidu pārklājumiem raksturīga <001> kristālu orientācija, ko parāda intensīvās (002) un (004) smailes *XRD* difraktogrammās (4.11. attēls).

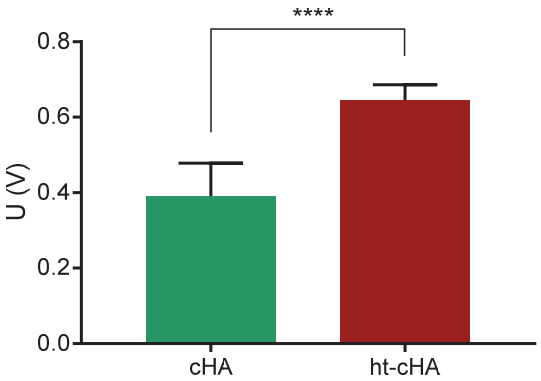


4.10. attēls. cHA un ht-cHA pārklājumu FTIR spektri.

Tiek uzskatīts, ka hidroksiljoni ir iesaistīti HA vadītspējas nodrošināšanā [15], un daži pētījumi ir parādījuši, ka HA keramikas pēcapstrāde ūdens tvaikā palielina materiāla virsmas lādiņu (skaitliski dati par hidroksiljonu koncentrāciju nav pieejami) [16, 17], tāpēc, lai pilnīgāk raksturotu HA pārklājumus, tika nomērīts to virsmas potenciāls. Pārklājumi tika polarizēti paaugstinātā temperatūrā elektriskajā laukā. Rezultātā hidroksiljoni HA struktūrā tika orientēti vienā virzienā. *AFM Kelvin Probe* mērījumi rādīja, ka hidroksilapatīta pārklājumam ar lielāku hidroksiljonu koncentrāciju raksturīgs lielāks virsmas elektriskais potenciāls (4.12. attēls).



4.11. attēls. *XRD* difraktogrammas cHA un ht-cHA pārklājumiem.



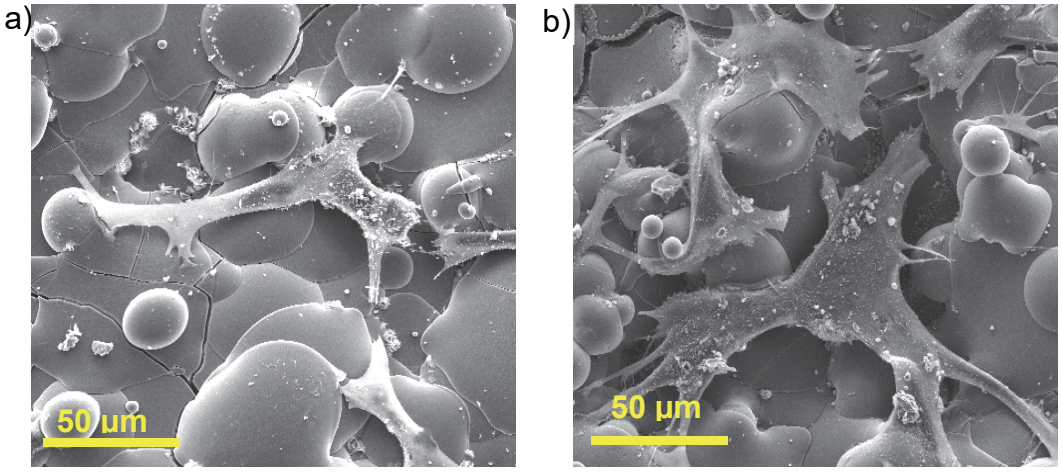
4.12. attēls. cHA un ht-cHA pārklājumu virsmas elektriskais potenciāls (**** P < 0,0001).

HA pārklājumus veido labi izkusušas, apaļas HA daļiņas, kas radušās, pulveri smidzinot uz iepriekš uzkarsētas pamatnes [18]. SEM mikrofotogrāfijas uzrādīja mikroplaisu veidošanos, kas ir raksturīgi termiski smidzinātiem pārklājumiem. No profilometrijas datiem aprēķinātais virsmas vidējais raupjums S_a bija 9,56 µm. Pārklājumu vidējais biezums bija 55 µm, tas galvenokārt mainās 35 un 70 µm diapazonā. Izotropijas mērījums S_{tr}, kas rāda, cik vienmērīgi biezums mainās pa visu pārklājumu, bija 0,78.

Šajā pētījumā hidroksilapatīta pārklājumu dizains veidots tāds, lai iegūtu pēc iespējas sakārtotu struktūru. Tas tika panākts trīs pakāpēs. Pirmkārt, pārklājumu smidzināšana uz iepriekš uzkarsētas pamatnes ļāva iegūt orientētus HA kristālus. Otrkārt, pārklājuma smidzināšanas laikā zaudētie hidroksiljoni tika atgriezti struktūrā, pārklājumu apstrādājot ūdens tvaika atmosfērā. Treškārt, hidroksiljoni tika orientēti, HA pārklājumu pakļaujot elektriskā lauka ietekmei. Šāda veida materiāla dizains no struktūras dziļākā slāņa ortopēdijas biomateriālos ir reti sastopams.

Hidroksilapatīta pārklājumu bioloģisko īpašību novērtēšana

Uz izgatavotajiem hidroksilapatīta pārklājumiem tika audzētas kaulu veidojošās šūnas – osteoblasti. Veikto pārbaužu rezultātā tika secināts, ka abi pārklājumu veidi ir piemēroti osteoblastu augšanai un diferencēšanai. 4.13. attēlā uzrādītas reprezentatīvas osteoblastu SEM mikrofotogrāfijas uz tradicionāla un hidrotermiski apstrādāta HA pārklājuma. Izstieptā šūnu struktūra uz ht-cHA pārklājumiem norāda, ka šūnas uz šī materiāla ir veselīgākas un aktīvākas, salīdzinot ar šūnām uz cHA pārklājuma. Rezultāti rāda, ka jau pēc vienas dienas šūnu kultūras osteoblasti ir izstiepušies un sasaistās viens ar otru. Lielākā diapazonā tas ir redzams 4.14. attēlā, kur arī uzskatāmi redzama paaugstināta šūnu adhēzija uz ht-cHA pārklājuma pēc vienas dienas šūnu kultūras, salīdzinot ar cHA pārklājumu. Pēc 14 dienu šūnu kultūras uz abiem pārklājuma veidiem novērojams būtisks šūnu skaita pieaugums.



4.13. attēls. Osteoblastu SEM mikrofotogrāfijas uz tradicionāla (a) un hidrotermiski apstrādāta (b) HA pārklājuma pēc vienas dienas šūnu kultūras.

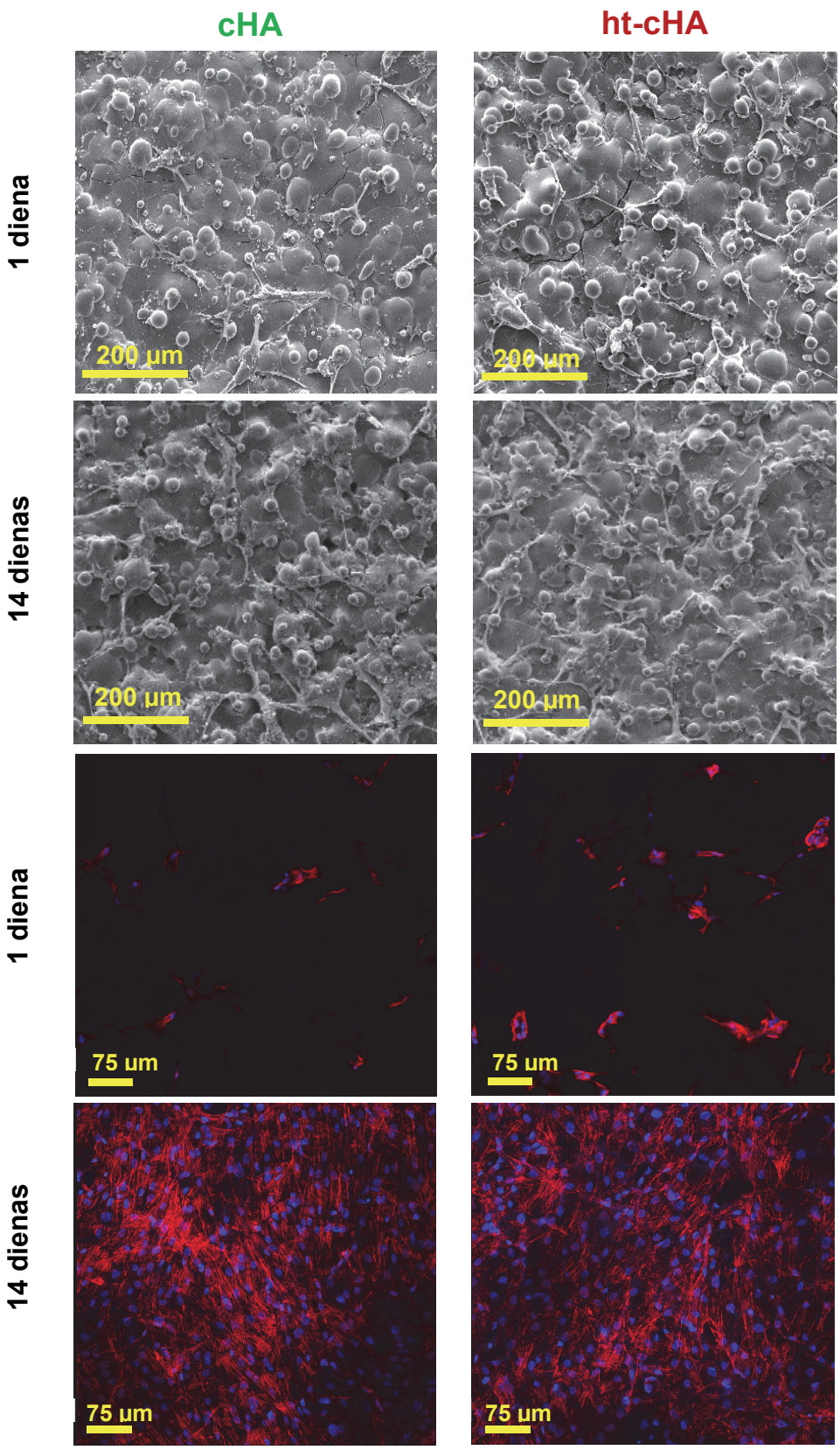
SEM un konfokālās mikroskopijas attēli tika izmantoti, lai aprēķinātu šūnu skaitu uz pārklājumiem un procentuālo laukumu, ko šūnas noklāj uz parauga virsmas (4.5. tabula). Abi rezultāti uzrāda vienu un to pašu tendenci – vairāk šūnu pēc vienas dienas šūnu kultūras ir piesaistījušās uz HA pārklājuma ar lielāku hidroksiljonu koncentrāciju. Abu mērījumu rezultātā iegūts, ka uz parauga ht-cHA ir par aptuveni 50 % vairāk šūnu nekā uz pārklājuma cHA. Taču laika gaitā šūnu skaits uz abiem paraugu veidiem izlīdzinās, un pēc 14 dienu šūnu kultūras būtiskas atšķirības vairs nav novērojamas.

4.5. tabula

Osteoblastu skaits uz 1 mm^2 un parauga virsmas laukums (%), ko šūnas noklāj pēc vienas un 14 dienu šūnu kultūras uz tradicionāla un hidrotermiski apstrādāta HA pārklājuma

Parauga veids	Šūnu skaits, šūnas/mm^2		Šūnu noklātais laukums, %	
	1 diena	14 dienas	1 diena	14 dienas
cHA	35,2 ± 5,21	608 ± 284	4,40 ± 1,03	39,6 ± 6,39
ht-cHA	73,7 ± 20,9	611 ± 234	7,40 ± 1,36	32,2 ± 6,47

Šūnu skaits iegūts, skaitot ar aci redzamos šūnu kodolus konfokālajos attēlos. Šūnu noklātais laukums aprēķināts no SEM mikrofotogrāfijām.



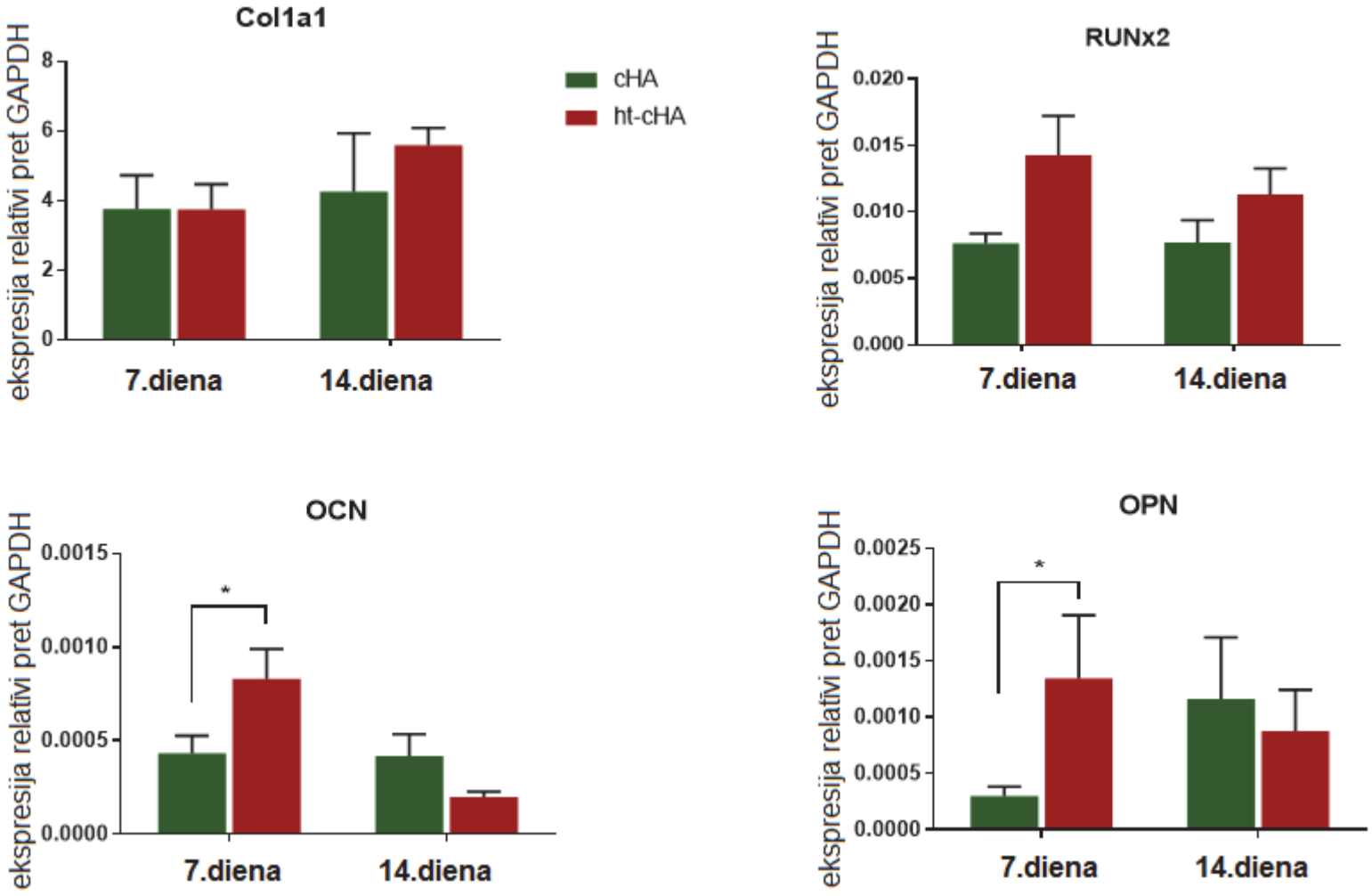
4.14. attēls. Osteoblastu SEM un konfokālās mikroskopijas attēli uz tradicionālā un hidrotermiski apstrādātā HA pārklājuma pēc vienas un 14 dienu šūnu kultūras.

Gēnu ekspresijas profilēšana tika veikta, lai novērtētu transkripcijas aktivitāti attiecībā uz mRNS[1] kodēšanas marķieriem, kas saistīti ar osteoblastu diferenciāciju un kaula matricas veidošanos. Osteoblastiem, kas tika audzēti uz HA pārklājumiem septiņas dienas, tika veikta polimerāzes ķēdes reakcijas (*PCR*) analīze. Rezultāti rāda, ka hidrotermiski apstrādātiem pārklājumiem raksturīga palielināta to gēnu ekspresija, kas saistīti ar osteoblastu augšanu, nobriešanu un pāreju uz osteocīta fenotipu (4.15. attēls).

Col1a1 marķieris ir nozīmīgs osteoīda veidošanās un turpmākas mineralizācijas procesā, tā ekspresija novērojama jau osteoblastu diferenciācijas sākumā. *PCR* rezultāti neuzrāda atšķirību šī marķiera izpausmē atkarībā no pārklājuma veida pēc septiņām dienām, taču lielāka šī marķiera ekspresija uz hidrotermiski apstrādāta pārklājuma pēc 14 dienām norāda, ka ht-cHA pārklājums varētu veicināt osteoīda nogulsnēšanu. Hidrotermiski apstrādātajam paraugam tika novērota lielāka *RUNx2* marķiera ekspresija pēc septiņu un 14 dienu šūnu kultūras, salīdzinot ar tradicionālo HA pārklājumu. Arī šim marķierim ir liela loma kaula veidošanas procesā, jo tas veicina galveno kaula matricas gēnu ekspresiju osteoblastu diferenciācijas sākumā. Tas ļauj osteoblastiem diferencēties par nobriedušiem osteoblastiem, kuriem raksturīga palielināta citu gēnu (osteokalcīna un osteopontīna) ekspresija. Hidroksilapatīta pārklājumam ar vairāk hidroksiljoniem tika novērota paaugstināta osteokalcīna un osteopontīna ekspresija pēc septiņu dienu šūnu kultūras, taču pēc 14 dienām tā nedaudz samazinājās, salīdzinot ar tradicionālo HA pārklājumu.

Kā galvenais iemesls lielajām *in vitro* rezultātu standartnovirzēm minams osteoblastu izmantošana no tikai trīs donoriem. Donoru vecums un dzimums atšķiras, tāpēc ir sagaidāma dažāda šūnu aktivitāte. Statistiski precīzāku rezultātu iegūšanai būtu nepieciešams izmantot vismaz trīs reizes vairāk donorus. Neskatoties uz to, visi bioloģiskie eksperimenti uzrāda vienu un to pašu tendenci – hidroksilapatīta pārklājumiem ar lielāku hidroksiljonu koncentrāciju raksturīga palielināta sākotnējā osteoblastu aktivitāte. Ātrāka šūnu piesaiste un nobriešana varētu būt būtisks faktors implantēšanas procesa uzlabošanai, nodrošinot ātrāku implanta pieņemšanu ķermenī, līdz ar to samazinot iekaisumu rašanās un implanta atgrūšanas riskus.

[1] Transporta RNS (mRNS) saista un novieto aminoskābes noteiktā secībā atbilstoši ģenētiskajam kodam. Tās nodod DNS ģenētisko informāciju ribosomām, raksturojot gēnu ekspresijas proteīnu produktu aminoskābju secību.



4.15. attēls. Kaula šūnu marķieru ekspresija osteoblastos, kas audzēti uz tradicionāliem (cHA, zaļš) un hidrotermiski apstrādātiem (ht-cHA, sarkans) HA pārklājumiem pēc septiņu un 14 dienu šūnu kultūras (* $P \leq 0,05$).

SECINĀJUMI

1. DAĻA. HIDROKSILJONU DAUDZUMA NOTEIKŠANA HIDROKSILAPATĪTĀ

1. Termogravimetriskā analīze, izmantojot HA termisko reakciju ar kalcija pirofosfātu vai kalcija fluorīdu, var tikt izmantota hidroksiljonu daudzuma aprēķināšanai hidroksilapatītā, ja tas nesatur citas viegli gaistošas fāzes.
2. Ir izveidota kalibrēšanas taisne hidroksiljonu daudzuma noteikšanai hidroksilapatītā ar Furjē transformācijas infrasarkano spektroskopiju. Izveidotā metode ir lineāra hidroksiljonu koncentrācijas diapazonā no 0 līdz 100 % ar aproksimācijas koeficientu 0,9921, tā ļauj noteikt hidroksiljonu daudzumu hidroksilapatītā ar precizitāti 2 % un pareizību 6 %.
3. Abas hidroksiljonu absorbcijas joslas Furjē transformācijas infrasarkanajos spektros (pie 632 un 3570 cm^{-1}) var tikt izmantotas hidroksiljonu daudzuma noteikšanai hidroksilapatītā, kas satur vairāk nekā 50 % hidroksiljonu, bet tikai absorbcijas josla pie 632 cm^{-1} sniedz precīzus kvantitatīvos rezultātus, ja paraugs satur mazāk kā 50 % hidroksiljonu.
4. *Raman* spektroskopija ir mazāk jutīga hidroksiljonu detektēšanai un uzrāda par 20–30 % mazāk hidroksiljonu oksihidroksilapatīta paraugos, salīdzinot ar *FTIR* spektroskopiju.
5. Apstarošana ar lāzeri (līdz 100 min, izmantojot 514,5 nm lāzera 100 % jaudu) *Raman* skeptroskopijas rezultātā neietekmē hidroksiljonu daudzumu hidroksilapatīta paraugos.

2. DAĻA. HIDROKSILJONU DAUDZUMA IETEKME UZ HIDROKSILAPATĪTA PĀRKLĀJUMU ŠŪNU ATBILDES REAKCIJU

6. Hidroksiljonu daudzuma palielināšana par 30 % HA pārklājumā palielina tā virsmas elektrisko potenciālu 1,7 reizes.
7. HA pārklājums ar lielāku hidroksiljonu daudzumu palielina sākotnējo šūnu adhēziju par aptuveni 50 % (pamatojoties uz šūnu skaita mērījumiem), kā arī veicina osteoblastu sākotnējo nobriešanu un diferencēšanos, par ko liecina paaugstināta osteoblastu aktivitātes marķieru (RUNx2, OCN, OPN) izpausme pēc septiņu dienu šūnu kultūras.
8. Hidroksiljonu daudzuma ietekme uz hidroksilapatīta pārklājuma bioloģiskajām īpašībām laika gaitā mazinās, un pēc divu nedēļu šūnu kultūras nav novērojamas būtiskas atšķirības.

IZMANTOTĀS LITERATŪRAS SARAKSTS

[1] OECD/EU. Health at a Glance: Europe 2016 – State of Health in the EU Cycle. OECD Publishing, Paris2016. p. 200.
[2] Eurostat EC. Surgical operations and procedures statistics. http://eceuropaeu/eurostat/statistics-explained/indexphp/Surgical_operations_and_procedures_statistics (webpage viewed on 18.04.2017.).
[3] Victoria G, Petrisor B, Drew B, Dick D. Bone stimulation for fracture healing: Whats all the fuss. Indian Journal of Orthopaedics 2009;43:117-20.
[4] Elliott JC. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Elsevier Inc, Amsterdam 1994:387.
[5] Emara KM, Diab RA, Emara AK. Recent biological trends in management of fracture non-union. World Journal of Orthopaedics 2015;6:623-8.
[6] Olszta MJ, Cheng X, Jee SS, Kumar R, Kim Y-Y, Kaufman MJ, et al. Bone structure and formation: A new perspective. Materials Science & Engineering R-Reports 2007;58:77-116.
[7] Baxter FR, Bowen CR, Turner IG, Dent ACE. Electrically active bioceramics: A review of interfacial responses. Annals of Biomedical Engineering 2010;38:2079-92.
[8] 13779-1:2008(E) IsI. Implants for surgery – Hydroxyapatite. Part 1: Ceramic hydroxyapatite. 2008.
[9] Rapacz-Kmita A, Paluszkiewicz C, Slosarczyk A, Paszkiewicz Z. FTIR and XRD investigations on the thermal stability of hydroxyapatite during hot pressing and pressureless sintering processes. Journal of Molecular Structure 2005;744:653-6.
[10] Bianco A, Cacciotti I, Lombardi M, Montanaro L, Bemporad E, Sebastiani M. F-substituted hydroxyapatite nanopowders: Thermal stability, sintering behaviour and mechanical properties. Ceramics International 2010;36:313-22.
[11] Peeran M. Comparison of Raman and IR Spectroscopy. http://wwwchemvistaorg/ramanIR4html (webpage viewed on 15.04.2017).
[12] Pasteris JD, Wopenka B, Freeman JJ, Rogers K, Valsami-Jones E, van der Houwen JAM, et al. Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: implications for bone and biomaterials. Biomaterials 2004;25:229-38.
[13] Saber-Samandari S, Alamara K, Saber-Samandari S, Gross KA. Micro-Raman spectroscopy shows how the coating process affects the characteristics of hydroxylapatite. Acta Biomaterialia 2013;9:9538-46.
[14] Gross KA, Berndt CC, Stephens P, Dinnebier R. Oxyapatite in hydroxyapatite coatings. Journal of Materials Science 1998;33:3985-91.
[15] Gittings JP, Bowen CR, Dent ACE, Turner IG, Baxter FR, Chaudhuri JB. Electrical characterization of hydroxyapatite-based bioceramics. Acta Biomaterialia 2009;5:743-54.
[16] Nakamura S, Takeda H, Yamashita K. Proton transport polarization and depolarization of hydroxyapatite ceramics. Journal of Applied Physics 2001;89:5386-92.
[17] Bodhak S, Bose S, Bandyopadhyay A. Electrically polarized HAp-coated Ti: In vitro bone cell-material interactions. Acta Biomaterialia 2010;6:641-51.
[18] Gross KA, Muller D, Lucas H, Haynes DR. Osteoclast resorption of thermal spray hydoxyapatite coatings is influenced by surface topography. Acta Biomaterialia 2012;8:1948-56.

DARBA APROBĀCIJA

Grāmatas nodaļa

1. K. A. Gross, L. Pluduma. Putting oxyhydroxyapatite into perspective: A pathway to oxyapatite and its applications. Calcium Phosphates: Structure, Synthesis, Properties and Applications (Ed. R. B. Heimann), 2012, p. 95–120, Nova Science Publishers. *SCOPUS*

Žurnālu raksti

1. L. Pluduma, E. Freimanis, K. A. Gross, H. Koivuoloto, K. Algate, D. Haynes, P. Vuoristo. Functionalizing surface electrical potential of hydroxyapatite coatings. Advances in Science and Technology, 102, 2017, p. 12–17.
2. K. Tonsuaadu, K. A. Gross, L. Pluduma, M. Veiderma. A review on the thermal stability of calcium apatites. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 110 (2), 2012, p. 647.–659. *SCOPUS, Web of Science*
3. L. Pluduma, K. Salma, L. Berzina Cimdina. Thermal characterization of Hap/TCP bioceramics with variable phase reatio. European Cells and Materials, 20 (3), 2010, p. 203. *SCOPUS*

Recenzētas konferenču tēzes

1. D. Ubele, L. Pluduma, A. Brangule, A. Berzina, H. Koivuluoto, P. Vuoristo, R. Juskenas, K. A. Gross. Investigations on the tailorability of hard tissue implant surfaces by printing. European Cells and Materials, 33 (1), 2017, p. 203.
2. E. Freimanis, L. Pluduma, K. A. Gross, M. Kylmälahti, Y. Dekhtyar, H. Koivuluoto, P. Vuoristo. Flame sintered HAP adopted to bone properties. European Cells and Materials, 29 (1), 2015. p. 9.

Prezentācijas starptautiskās konferencēs ar publicētām tēzēm

1. D. Ubele, L. Pluduma, A. Brangule, A. Berzina, H. Koivuluoto, P. Vuoristo, R. Juskenas, K. A. Gross. Investigations on the tailorability of hard tissue implant surfaces by printing. Scandinavian Society for Biomaterials 10th Annual Meeting, Hafjell, Norway, March 15–17, 2017.
2. D. Haynes, L. Pluduma, K. Algate, D. Menicanin, K. A. Gross. Optimizing surface charge on hydroxyapatite coatings to promote mesenchymal stem cell development. ANZORS, Melbourne, Australia, October 13–15, 2016.
3. L. Pluduma, K. A. Gross, E. Freimanis, I. Daenke. Functionalizing surface electrical potential of hydroxyapatite coatings. 7th Forum on New Materials (CIMTEC 2016), Perugia, Italy, June 5.–9, 2016.
4. E. Freimanis, L. Pluduma, K. A. Gross, M. Kylmalahti, Y. Dekhtyar, H. Koivuluoto, P. Vuoristo. Flame sintered HAp adopted to bone properties. Scandinavian Society for Biomaterials 8th Conference, Sigulda, Latvia. May 6–8, 2015.
5. K. Gross, L. Pluduma, A. Ubelis, A. Kapralovs, P. Brangulis, G. Darut, G. Montavon. The unstable hydroxyl content in thermally processed hydroxyapatite. Bioceramics 26, Barcelona, Spain, November 6–8, 2014.

6. L. Pluduma, K. A. Gross. Producing a true hydroxyapatite with the necessary OH content. International Symposium on Apatite and Correlative Biomaterials (ISACB 6), Nantes, France, June 5.–8., 2013.
7. L. Pluduma, K. A. Gross. Develpment of new analysis tools for thermally sprayed hydroxyapatite. 5th Les Rencontres Internationales sur la Projection Thermique (RIPT), Limoge, France, December 7.–9., 2011.
8. L. Pluduma, K. A. Gross, L. Bērziņa-Cimdiņa, C. Rey. Scoping different approaches for the measurement of OH in hydroxyapatite. 23rd Symposium and Annual Meeting of International Society for Ceramics in Medicine, Istanbul, Turkey, November 6.–9., 2011. *Best Student Podium Award (presented by Acta Biomaterialia)*.
9. L. Pluduma, K. A. Gross, L. Bērziņa-Cimdiņa. The Effects of Heating Atmosphere on the Stability of HAp. 52nd International Scientific Conference of Riga Technical University, Material Science and Applied Chemistry, Latvia, Riga, October 13.–15., 2011.