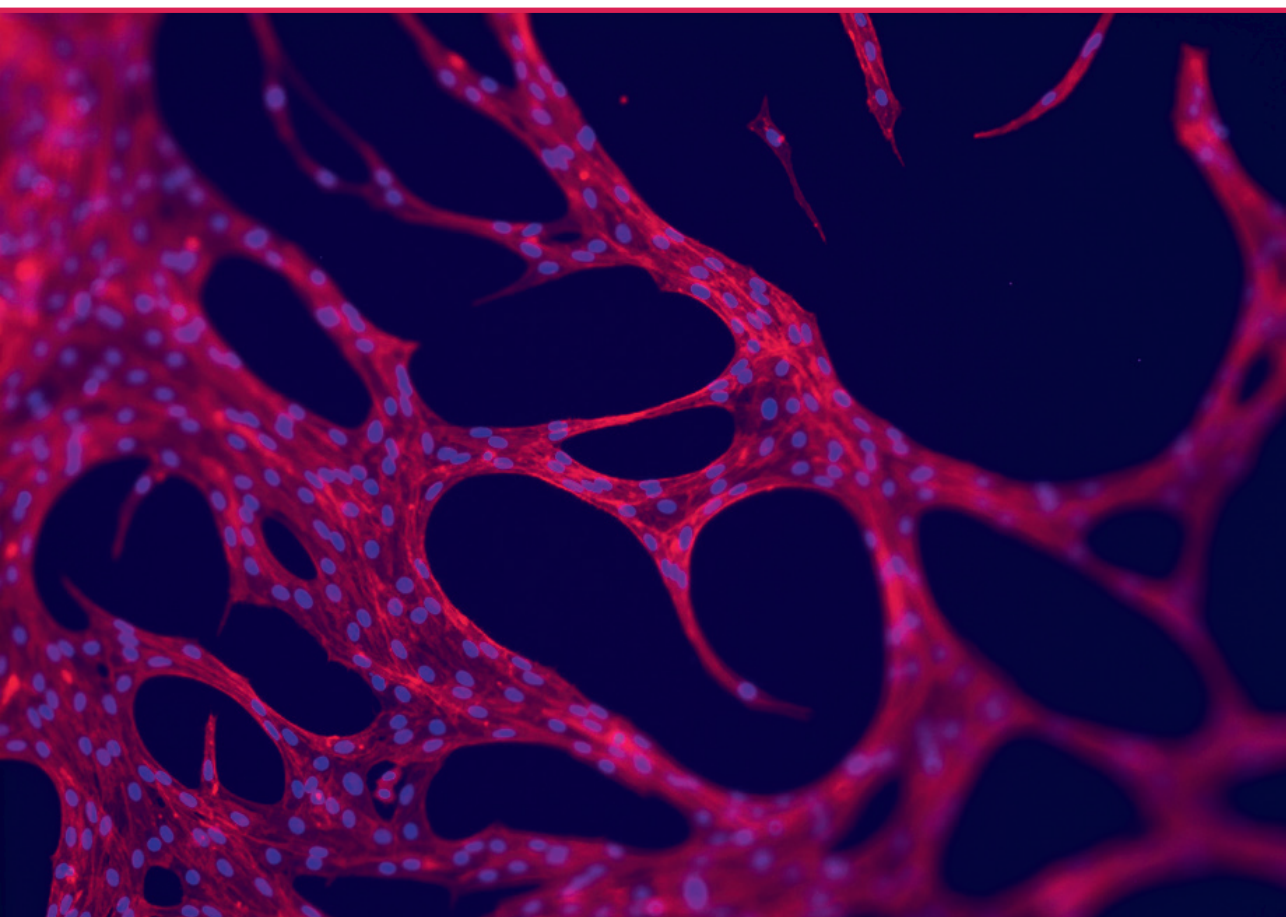


Abhishek Rajesh Indurkar

AMORFI KALCIJA FOSFĀTI UN TO NANOKOMPOZĪTI

Promocijas darba kopsavilkums



RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE

Dabaszinātņu un tehnoloģiju fakultāte
Biomateriālu un bioinženierijas institūts

Abhishek Rajesh Indurkar

Doktora studiju programmas “Ķīmija, materiālu zinātne un inženierija” doktorants

**AMORFI KALCIJA FOSFĀTI
UN TO NANOKOMPOZĪTI**

Promocijas darba kopsavilkums

Zinātniskais vadītājs
profesors *Dr. sc. ing.* JĀNIS LOČS

Līdzvadītājs
Dr. sc. ing. KRISTAPS RUBENIS

RTU Izdevniecība

Rīga 2024

Indurkar, A. R. Amorfi kalcija fosfāti
un to nanokompozīti. Promocijas darba kopsavilkums.
Rīga: RTU Izdevniecība, 2024. – 41 lpp.

Publicēts saskaņā ar promocijas padomes “RTU P-02”
2024. gada 28. augusta lēmumu, protokols Nr. 04030-9.2.2/6.

Vāka attēla autors – Abhishek Rajesh Indurkar

<https://doi.org/10.7250/9789934371011>

ISBN 978-9934-37-101-1 (pdf)

**PROMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS ZINĀTNES DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI
RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ**

Promocijas darbs zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2024. gada 28. augustā plkst. 10.00 Rīgas Tehniskās universitātes Dabaszinātņu un tehnoloģiju fakultātē, Paula Valdena ielā 3/7, 272. auditorijā.

OFICIĀLIE RECENZENTI

Profesors Sergejs Gaidukovs,
Rīgas Tehniskā universitāte

Dr. Antons Sizovs,
Latvijas Organiskās Sintēzes institūts

Profesors Jagoda Litowczenko-Cybulska,
Poznaņas Adama Mickeviča universitāte, Polija

APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājis šo promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai. Promocijas darbs zinātniskā grāda iegūšanai nav iesniegts nevienā citā universitātē.

Abhishek Rajesh Indurkar (paraksts)

Datums:

Promocijas darbs ir uzrakstīts kā rakstu krājums. To veido kopsavilkums latviešu un angļu valodā un astoņas publikācijas. Publikācijas ir rakstītas angļu valodā un ietver elektroniski pieejamu papildu informāciju.

SATURS

PATEICĪBA.....	5
SAĪSINĀJUMI.....	6
PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS.....	7
IEVADS.....	7
MĒRĶIS.....	8
AIZSTĀVĀMĀS TĒZES.....	8
ZINĀTNISKĀ NOVITĀTE.....	8
PRAKTISKĀ NOZĪME.....	8
PROMOCIJAS DARBA STRUKTŪRA.....	8
SCI/PUBLIKĀCIJAS, KURĀS PREZENTĒTI PROMOCIJAS DARBA REZULTĀTI.....	10
Publicētās.....	10
Iesniegtas publicēšanai.....	10
ZINĀTNISKĀS KONFERENCES, KURĀS PREZENTĒTI PROMOCIJAS DARBA REZULTĀTI.....	10
AUTORA PERSONĪGAIS IEGULDĪJUMS.....	11
PROMOCIJAS DARBA IZSTRĀDES GAITĀ SAGATAVOTO UN PUBLICĒTO ZINĀTNISKO PUBLIKĀCIJU SAVSTARPĒJĀ SAISTĪBA.....	12
PROMOCIJAS DARBA REZULTĀTI.....	13
LITERATŪRAS APSKATS.....	13
MAZO ORGANISKO MOLEKULU IZVĒLE.....	15
MOM SATUROŠA AKF SINTĒZE.....	16
SINTĒZES REZULTĀTĀ IEGŪTO AKF ĪPAŠĪBAS.....	18
SINTEZĒTO AKF KRISTALIZĀCIJAS KINĒTIKA ŪDENS VIDĒ.....	19
SINTEZĒTO AKF RAKSTUROŠANA <i>IN VITRO</i>	22
NANOKOMPOZĪTA BIOTINTE.....	24
NANOKOMPOZĪTU HIDROGELI.....	29
DUBULTĪKLA NANOKOMPOZĪTHIDROGELI.....	31
SECINĀJUMI.....	37
IZMANTOTĀ LITERATŪRA.....	38

PATEICĪBA

Sirsnīgs paldies visiem, kuri palīdzēja izstrādāt šo promocijas darbu, sniedzot atbalstu un iedrošinājumu!

Liels paldies pētījumu līdzautoriem! Jūsu ieguldījums un atbalsts ievērojami uzlaboja šī promocijas darba kvalitāti. Jūsu ieguldījums ir nenovērtējams.

Sirsnīgi pateicos promocijas darba vadītājiem par ieteikumiem, mentorēšanu un pacietību! Viņu izpratnei un iedrošinājumam bija izšķiroša nozīme, veidojot manu pētniecības ceļu.

Liels paldies maniem vecākiem! Jūsu nelokāmais atbalsts un ticība manām spējām bija pastāvīgs motivācijas avots. Jūsu upurēšanās un uzmundrinājumi ir likuši pamatus maniem akadēmiskajiem sasniegumiem. Es ļoti pateicos savai sievai par atbalstu, sapratni un iedrošinājumu šajā izaicinošajā, bet piepildītajā ceļojumā! Viņas klātbūtne ir mans balsts, un man ir prieks dalīties šajā sasniegumā ar viņu.

Visbeidzot – gribu atzīt Dieva dievišķo vadību un svētību. Spēks un izturība, ko atradu grūtajos brīžos, liecina par viņa žēlastību.

Nobeigumā vēlos pateikties visiem, kas veicinājuši manu akadēmisko darbību. Jūsu kopējais ieguldījums un atbalsts ir darījis to jēgpilnu un atalgotu.

SAĪSINĀJUMI

MOM – mazas organiskās molekulas

CaP – kalcija fosfāts

Ap –apatīts

HA – hidroksiapatīts

AKF – amorfais kalcija fosfāts

AKF_CL – amorfais kalcija fosfāts, kura sintēzei izmantots CaCl_2

AKF_NIT – amorfais kalcija fosfāts, kura sintēzei izmantots $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

AKF_ACE – acetātu saturošs amorfais kalcija fosfāts

AKF_ASK – askorbātu saturošs amorfais kalcija fosfāts

AKF_CIT – citrātu saturošs amorfais kalcija fosfāts

AKF_GLU – glutamātu saturošs amorfais kalcija fosfāts

AKF_ITN – itakonātu saturošs amorfais kalcija fosfāts

ADA-GEL – algināts-didehīds-želatīns

VT – viens tīkls

DT – dubulttīkls

FBS – fosfāta buferšķīdums

α -MEM – Minimum Essential Medium

P123 – Pluronic P123

GELMA – želatīna metakrilāts

PAM – poliakrilamīds

APS – amonija persulfāts

TMED –tetrametiletēlēndiamīns

MCŠ – mezenhimālās cilmes šūnas

LFS – liellopa fetālais serums

FTIS – Furjē transformāciju infrasarkanā spektroskopija

VEA – viskoelastīgo īpašību apgabals

PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

IEVADS

Lai risinātu dažādas problēmas, tostarp nelaimes gadījumu un vēža ārstēšanas sekas, kā arī veiktu kosmētiskus uzlabojumus, pasaulē katru gadu tiek veiktas vairāk nekā 4,5 miljoni rekonstruktīvas ķirurģiskas operācijas [1]. Globālās saslimstības datu analīze liecina, ka aptuveni 1,71 miljardam cilvēku visā pasaulē ir muskuļu un skeleta sistēmas slimības [2]. Kaulaudu ārstēšanai un aizvietošanai ir nepieciešami efektīvi biomateriāli. Kaulaudu unikālās īpašības, tos veidojošās fāzes un to strukturālā mijiedarbība dažādos hierarhijas līmeņos ir ļoti sarežģīta. Tāpēc atdarināt dabīgos kaulaudus un iegūt biomateriālus, kuru īpašības būtu salīdzināmas ar dabīgajiem kauliem, ir sarežģīti [3].

Šā iemesla dēļ alotransplantāts joprojām ir “zelta” standarts ar kaulaudiem saistītu slimību ārstēšanā [4]. Alotransplantātiem ir vairāki trūkumi, tāpēc ir liela nepieciešamība pēc sintētiskajiem materiāliem, kas ir līdzīgi dabīgajam kaulam [5]. Kauls ir nanokompozītmateriāls, kas sastāv no neorganiskās un organiskās fāzes. Neorganisko fāzi galvenokārt veido kalcija fosfāts (CaP), savukārt organisko fāzi galvenokārt veido kolagēns.

Kaulu neorganiskā fāze veidojas procesos, kas saistīti ar šūnu mitohondrijiem. Šo procesu rezultātā vispirms veidojas amorfs kalcija fosfāts (AKF), kas kolagēna klātbūtnē transformējas uz vāji kristāliskā apatīta (Ap) fāzi [6]. Mitohondrijos AKF ir saistīts ar organisko savienojumu, kas regulē starpfibrilāro kolagēna mineralizāciju. Organisku savienojumu sānu grupas (karboksilgrupas vai hidroksilgrupas) var mijiedarboties ar CaP virsmu [7]. Organiskie savienojumi var aizkavēt AKF kristalizāciju un transformāciju uz Ap, kavējot kristalizācijas centru veidošanos un augšanu, un tiem ir būtiska nozīme starpfibrilārā kolagēna mineralizācijas procesā [8]. Šī promocijas darba mērķis ir izstrādāt mazas organiskās molekulas (MOM) saturošus AKF un tos saturošus hidrogelus, kas būtu lietojami kaulaudu reģenerācijā. Pētījumos tika izmantotas piecas MOM, kas dabīgi sastopamas arī mitohondrijos. Šīm MOM ir liela nozīme kaulaudu atjaunošanā, un tām ir dažādas funkcionālās grupas.

Promocijas darba primārais mērķis bija izstrādāt sintēzes metodi MOM saturošu AKF iegūšanai un analizēt MOM ietekmi uz AKF īpašībām – daļiņu izmēru, morfoloģiju, patieso blīvumu, īpatnējo virsmas laukumu (ĪVL), kristalizācijas kinētiku, kā arī citosaderību. Pēc tam sintezētie MOM saturošie AKF tika izmantoti kā neorganiska pildviela organiskā matricā, veidojot nanokompozītus.

Nanokompozītbiotinte tika iegūta, pievienojot MOM saturošus AKF kā neorganisku pildvielu algināta dialdehīda-želatīna (*ADA-GEL*) organiskajai matricē. Citrātu saturošais AKF (AKF_CIT) bija efektīvākā pildviela izdrukāto konstrukciju strukturālās integritātes nodrošināšanai. Pēc tam, izmantojot ķīmisko šķērssaistīšanu, tika izstrādāts viena tīkla (VT) nanokompozīthidrogels, kas sastāvēja no želatīna metakrilāta (*GELMA*) un AKF_CIT.

Papildus tika izveidots AKF_CIT saturošs poliakrilamīda (PAM) – *Pluronic P123 (P123)* – *GELMA* dubulttīkla (DT) nanokompozīthidrogels. Vispirms tika izvērtēta *P123* ietekme uz PAM-*GELMA* hidrogela mehāniskajām īpašībām, pēc tam tika analizēta AKF_CIT ietekme uz PAM-*GELMA-P123* hidrogelu mehāniskajām un reoloģiskajām īpašībām, kā arī novērtēts to formas atmiņas efekts.

Visi promocijas darba izstrādes gaitā iegūtie AKF un AKF saturošie hidrogeli ir citosaderīgi, kas liecina, ka potenciāli tos var izmantot kaulaudu reģenerācijai.

MĒRĶIS

Promocijas darba mērķis bija iegūt MOM saturošus AKF, izpētīt to īpašības un raksturot citosaderību, kā arī izmantot tos kā pildvielas nanokompozīthidrogelu iegūšanai un novērtētiegūto nanokompozīthidrogelu mehāniskās un reoloģiskās īpašības, kā arī citosaderību. Mērķasniegšanai definēti vairāki uzdevumi.

Izstrādāt sintēzes metodi MOM saturošu AKF iegūšanai.

Noskaidrot MOM ietekmi uz AKF īpašībām un transformācijas kinētiku uz vāji kristālisko Ap ūdens vidē (dejonizētā ūdenī, fosfāta buferšķīdumā (FBS) un šūnu kultūras barotnē Minimum Essential Medium (α -MEM)), kā arī AKF citosaderību.

Biotintē, VT un DT hidrogelā iekļaut sintēžu rezultātā iegūtos AKF un izpētīt iegūto nanokompozīthidrogelu īpašības.

AIZSTĀVĀMĀS TĒZES

1. MOM iekļaušana AKF ietekmē tā īpašības, transformācijas kinētiku uz Ap, kā arī citosaderību.
2. Ūdens mediētas AKF transformācijas ātrumu uz Ap ietekmē ūdens vides sastāvs (dejonizēts ūdens, FBS un α -MEM).
3. AKF pievienošana biotintai, VT un DT hidrogeliem uzlabo to reoloģiskās, mehāniskās un strukturālās īpašības, vienlaikus saglabājot citosaderību.

ZINĀTNISKĀ NOVITĀTE

1. Izstrādāta viena soļa slapjā ķīmiskās sintēzes metode tīra un MOM (piemēram, acetātu, askorbātu, citrātu, itakonātu un glutamātu) saturoša AKF sintēzei.
2. Pirmo reizi sintezēts acetātu, askorbātu un itakonātu saturošs AKF.
3. Pirmo reizi raksturota MOM ietekme uz ūdens mediētas AKF transformācijas kinētiku uz Ap.
4. Izstrādāta jauna AKF saturoša biotinte, kā arī AKF saturoši VT un DT hidrogeli.
5. Izveidots jauna sastāva PAM-GELMA-PI23 hidrogels.

PRAKTISKĀ NOZĪME

1. Izstrādāto metodi var izmantot arī citu MOM saturošu AKF sintēzei.
2. Specifiskam lietojumam AKF transformācijas kinētiku uz Ap var pielāgot, izmantojot noteiktu MOM un ūdens vides kombināciju.
3. DT hidrogela mehāniskās īpašības var kontrolēt, modulējot PI23 koncentrāciju PAM-GELMA hidrogelā.

PROMOCIJAS DARBA STRUKTŪRA

1. Promocijas darbs veidots kā tematiski vienota zinātnisko publikāciju kopa, kur iekļauti pētījumi, kas vēltīti MOM saturošu AKF sintēzei un sintezēto AKF saturošas biotintes, VT

un DT hidrogelu izstrādei. Katra publikāciju kopas zinātniskā publikācija ir oriģinālpētījums, kurā atspoguļotas jaunas zināšanas. Kopā šīs publikācijas apraksta pētījumu par jaunu pieeju MOM saturošu AKF sintezēšanai un tos saturošu nanokompozītu izstrādi.

2. Pirms eksperimentālā darba sākšanas veikts literatūras apskats (promocijas darba autora 1. publikācija) par dažādu CaP veidu fizikālajām īpašībām, bioloģisko sastopamību un sintēzi, kā arī to lietošanu kaulaudu reģenerācijā. Literatūras izpētes rezultātā secināts, ka ķīmiski tīra, kristāliska CaP iegūšanai nepieciešama augsta sintēzes temperatūra vai apstrāde. AKF ir metastabila CaP forma, tāpēc to nevar saķepināt augstā temperatūrā.
3. Promocijas darba autora 2. publikācijā AKF tika sintezēts, izmantojot šķīdināšanas-nogulsnēšanas metodi. No sintezētā AKF pulvera tika iegūti paraugi ar augstu relatīvo blīvumu, to uniaksiāli presējot 1250 MPa līdz 1500 MPa spiedienā istabas temperatūrā. Iegūtie paraugi saglabāja AKF fāzi.
4. Dabīgais kaulu Ap ir nestohiometrisks un strukturāli nesakārtots. Tāpēc mērķis bija izprast kaulu Ap veidošanās mehānismu, kā arī kolagēna un organisko molekulu lomu mineralizācijas procesa regulēšanā (promocijas darba autora 3. publikācija). Dabīgais AKF veidojas procesos, kas saistīti ar šūnu mitohondrijiem. AKF mitohondrijos ir saistīts ar organisku savienojumu. Organisko savienojumu sānu grupas (karboksila un hidroksila grupu) regulē Ap nukleāciju un kolagēna intrfibrilāro mineralizāciju. Balstoties literatūras apskatā, tika atlasītas piecas MOM, kas sastopamas šūnu mitohondrijos, kurām ir dažādas funkcionālās grupas un kas ir nozīmīgas kaulu fizioloģijā. Šīs MOM tika izmantotas MOM saturošu AKF sintēzei, kas bija promocijas darba galvenais mērķis.
5. Promocijas darba autora 4. publikācijā galvenā uzmanība tika pievērsta vienas pakāpes slapjās ķīmiskās metodes izstrādei AKF_ ACE un AKF_ CIT sintēzei. 4. publikācijā aprakstītā autora izstrādātā sintēzes metode pēc tam tika izmantota, lai sintezētu arī AKF_ GLU, AKF_ ITA un AKF_ ASK (promocijas darba autora 5. publikācija). Sintēžu rezultātā iegūtie AKF tika raksturoti ar dažādām metodēm. Iegūtie rezultāti demonstrē MOM ietekmi uz AKF īpašībām un citosaderību.
6. Promocijas darba autora 6. publikācijā analizēta AKF daļiņu lieluma, transformācijas kinētikas un MOM ietekme uz *ADA-GEL* hidrogelu un izdrukātajām konstrukcijām. AKF_ ACE un AKF_ CIT tika izmantoti kā neorganiskā pildviela *ADA-GEL* organiskajā matricē nanokompozīthidrogelu iegūšanai. Nanokompozītu biotintes tika iegūtas, AKF-*ADA-GEL* hidrogeliem pievienojot *MC3T3-E1* šūnas. Gan AKF_ ACE, gan AKF_ CIT biotintes bija citosaderīgas, tomēr AKF_ CIT bija efektīvāka izdrukāto konstrukciju strukturālās integritātes saglabāšanai.
7. Promocijas darba autora 7. publikācijā aprakstīts izstrādātais AKF_ CIT saturošs *GELMA* hidrogels, izmantojot ķīmiskās šķērssaistīšanas metodi kā alternatīvu fotošķērssaistīšanai. *In vitro* analīze apstiprināja, ka ķīmiskā šķērssaistīšana un AKF_ CIT pievienošana neietekmēja *GELMA* hidrogela citosaderību.
8. Promocijas darba autora 8. publikācijā aprakstīts sintezētais DT hidrogels, kas sastāv no PAM-*GELMA-P123*. Pirmais DT hidrogela tīkls tika iegūts, izmantojot *P123*, otro tīklu veidoja PAM-*GELMA* kopolimērs. Abi PAM-*GELMA* tīkli tika ķīmiski šķērssaistīti. Sākotnēji *P123* koncentrācija PAM-*GELMA* hidrogelā tika pielāgota, lai iegūtu optimālās mehāniskās īpašības. Pēc tam tika analizēta dažādu AKF_ CIT koncentrāciju ietekme uz

PAM-GELMA-PI23 hidrogela mehāniskajām īpašībām. Papildus tika izpētīts DT nanokompozīthidrogela formas atmiņas efekts.

SCI/PUBLIKĀCIJAS, KURĀS PREZENTĒTI PROMOCIJAS DARBA REZULTĀTI

Publicētās

1. **Indurkar, A.**, Choudhary, R., Rubenis, K., & Locs, J. (2021). Advances in sintering techniques for calcium phosphates ceramics. *Materials*, 14 (20), 6133. (1. publikācija) <https://doi.org/10.3390/ma14206133>.
2. Rubenis, K., Zemjane, S., Vecstaudza, J., Lazdovica, K., Bitenieks, J., Wicinski, P., **Indurkar, A.**, & Locs, J. (2022). Sintering of amorphous calcium phosphate to near-full density by uniaxial compaction at room temperature. *Journal of the European Ceramic Society*, 42 (13), 6199–6205. (2. publikācija) <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2022.06.041>.
3. **Indurkar, A.**, Choudhary, R., Rubenis, K., & Locs, J. (2023). Role of carboxylic organic molecules in interfibrillar collagen mineralization. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1150037. (3. publikācija) <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1150037>.
4. **Indurkar, A.**, Choudhary, R., Rubenis, K., Nimbalkar, M., Sarakovskis, A., Boccaccini, A. R., & Locs, J. (2023). Amorphous calcium phosphate and amorphous calcium phosphate carboxylate: Synthesis and characterization. *ACS Omega*. (4. publikācija) <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00796>.
5. **Indurkar, A.**, Kudale, P., Rjabovs, K., Heinmaa, I., Demir, O., Kirejevs, M., Rubenis, K., Chaturbhuj, G., Turka, M., & Locs, J. (2023). Small Organic Molecules Containing Amorphous Calcium Phosphate: Synthesis, Characterization and Transformation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11. (5. publikācija) <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1329752>.

Iesniegtas publicēšanai

1. **Indurkar, A.**, Heid, S., Bauer, J., Rubenis, K., Friedrich, O., A., Locs, J., & Boccaccini, A. R. Amorphous Calcium Phosphate Reinforced Alginate-Dialdehyde-Gelatin (Ada-Gel) Bioinks for Biofabrication of Bone Tissue Scaffolds. Tiek recenzēta žurnālā *Scientific reports* (6. publikācija).
2. **Indurkar, A.**, Rubenis, K., Boccaccini, A. R., & Locs, J. Development of nanocomposite hydrogel using citrate-containing amorphous calcium phosphate and gelatin methacrylate. Iesniegta žurnālā *Frontiers Bioengineering and Biotechnology* (7. publikācija).
3. **Indurkar, A.**, Rubenis, K., Boccaccini, A. R., & Locs, J. Development and Characterization of Thermoresponsive Double-Network Nanocomposite Hydrogel for Bone Tissue Engineering. Iesniegta žurnālā *Macromolecular Materials and Engineering* (8. publikācija).

ZINĀTNISKĀS KONFERENCES, KURĀS PREZENTĒTI PROMOCIJAS DARBA REZULTĀTI

1. Development of nanocomposite double network hydrogel: Vecstaudza, J., Egle, K., **Indurkar, A.**, Locs, J. 64th International Scientific Conference, Rīgas Tehniskā universitāte, Latvija notika 2023. gada 6. oktobrī. (*Prezentācijas*)

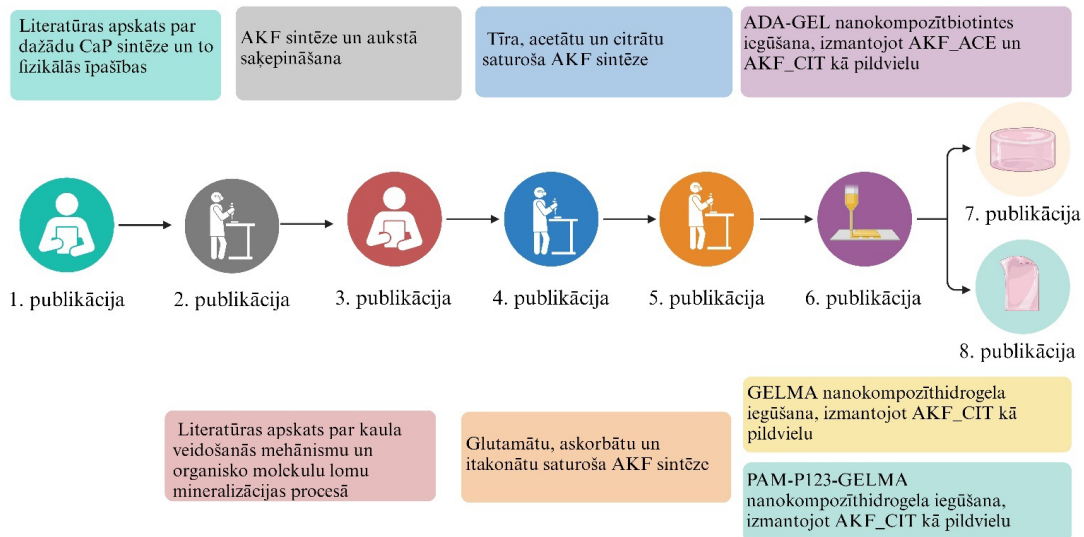
2. Development of nanocomposite double network hydrogel: **Indurkar, A.**, Rubenis, K., Boccaccini, A. R., & Locs, J. 64th International Scientific Conference, Rīgas Tehniskā universitāte, Latvija notika 2023. gada 6. oktobrī. (*Prezentācija*)
3. Amorphous calcium phosphate citrate reinforced gelatin-alginate dialdehyde bioink for bone regeneration: **Indurkar, A.**, Rubenis, K., Boccaccini, A. R., & Locs, J. International Conference on Biofabrication, Saskatūna, Kanāda, notika no 2023. gada 17. līdz 20. septembrim. (*Prezentācija*)
4. Amorphous calcium phosphate citrate reinforced gelatin-alginate dialdehyde bioink for bone regeneration: **Indurkar, A.**, Rubenis, K., Boccaccini, A. R., & Locs, J. FEMS EuroMat 2023, Frankfurte, Vācija, notika no 2023. gada 3. līdz 7. septembrim. (*Prezentācija*)
5. Amorphous calcium phosphate citrate reinforced gelatin-alginate dialdehyde bioink for bone regeneration: **Indurkar, A.**, Rubenis, K., Boccaccini, A. R., & Locs, J. 5th World Congress of Latvian Scientists, Rīga, Latvija, notika no 2023. gada 26. līdz 29. jūnijam. (*Stenda referāts*)
6. Biomimetic synthesis of amorphous calcium phosphate: **Indurkar, A.**, Choudhary, R., Rubenis., & Locs, J. 16th Scandinavian Society of Biomaterials, Roros, Norvēģija notika no 2023. gada 21. līdz 24. martam. (*Stenda referāts*)
7. Tailor-made synthesis of bionic amorphous calcium phosphate: **Indurkar, A.**, Choudhary, R., Rubenis, K., Locs, J. Biomaterials and novel technologies for healthcare 3rd biennial International Conference BIOMAH, Roma, Itālija, notika no 2022. gada 18. līdz 21. oktobrim. (*Prezentācija*)

AUTORA PERSONĪGAIS IEGULDĪJUMS

Šajā promocijas darbā aprakstītie pētījumi ir izstrādāti sadarbībā ar 16 zinātniekiem. Pētījumus uzraudzīja pieredzējuši mentori, kuri sniedza būtisku atbalstu un vērtīgu ieguldījumu. Katrā no publicētajiem pētījumiem autoram bija vadošā loma – gan pētot zinātnisko literatūru, gan veicot pētījumu. Autora personīgais ieguldījums šajā promocijas darbā ietver vienas pakāpes mitrās ķīmiskās sintēzes metodes izstrādi AKF sintēzei (ar un bez MOM) un sintezētā produkta raksturošanu. Sintezētais AKF tika izmantots kā pildviela biotintē, VT un DT hidrogelos.

Promocijas darba izstrādes gaitā liela nozīme bija diskusijām ar līdzautoriem un promocijas darba vadītājiem, kas bija būtiskas, lai pārvarētu dažādus sarežģījumus, kas radās pētniecības gaitā.

PROMOCIJAS DARBA IZSTRĀDES GAITĀ SAGATAVOTO UN PUBLICĒTO ZINĀTNISKO PUBLIKĀCIJU SAVSTARPĒJĀ SAISTĪBA



1. att. Promocijas darba izstrādes gaitā sagatavoto un publicēto zinātnisko publikāciju tematika un savstarpējā saistība.

PROMOCIJAS DARBA REZULTĀTI

LITERATŪRAS APSKATS

Kauli (kaulaudi) ir blīva saistaudu forma, kas veido cilvēka skeletu. Kaulaudi sastāv no specifiskām šūnām un matricēs, kas pēc masas satur 65–70 % biominerālu un 5–8 % ūdens, savukārt pārējais ir organiskas vielas [9]. Minerālā fāzē sastāv no kalcija fosfāta (CaP) – karbonātus saturoša hidroksilapatīta (HA). Organiskā fāzē satur 90 % kolagēna un 10 % citu proteīnu.

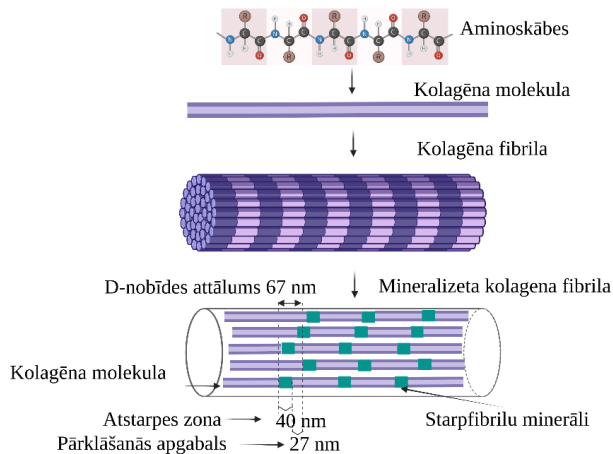
CaP ir nozīmīga kaulu sastāvdaļa. Pēdējās desmitgadēs gan kaulaudu reģenerācijas pētījumos, gan klīniski izmantoti dažādi biomateriāli, kas satur CaP [10]. Promocijas darba autora 1. zinātniskajā publikācijā ir sniegts visaptverošs pārskats par CaP, piemēram, to fizikālajām īpašībām, bioloģiskajiem aspektiem un to sintēzes metodēm [11]. Apskatīta literatūra par sintēzes metodēm, ko izmanto ķīmiski tīru, stehiometrisku CaP materiālu iegūšanai. Veicot literatūras analīzi, secināts, ka ķīmiski tīra, kristāliska CaP iegūšanai nepieciešama augsta sintēzes temperatūra vai apstrāde augstā temperatūrā.

Sintētiskā HA, kas iegūts augstās temperatūrās, ķīmiskā formula ir $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Apatīts (Ap), kas sastopams kaulos, veidojas zemā temperatūrā un nav tik kristālisks. To uzskata par vāji kristālisku Ap formu, kas nav stohiometriskā viena vai vairāku katjonu (Na^+ , K^+ , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+}) un/vai anjonu (HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , Cl^- , F^- , citrāta) klātbūtnes dēļ tā struktūrā [12]. Piemaisījumi kaula Ap rada spriegumus tā kristālstruktūrā, padarot to mazāk stabili, taču reaģētspējīgāku [13]. Kaula Ap kristāliem ir unikāla ģeometrija – garums nepārsniedz 30–50 nm, savukārt biezums ir tuvu 2 nm [14]. Promocijas darba autora 3. publikācijā galvenā uzmanība pievērsta kaulu Ap veidošanās mehānisma izpratnei [15].

Amorfais kalcija fosfāts (AKF) ir pirmā CaP fāzē, kas veidojas procesos, kas saistīti ar šūnu mitohondrijiem. AKF mitohondrijos ir saistīts ar organisku savienojumu – Hovarda faktoru, kas liecina par kompleksu organiska-neorganiska savienojuma veidošanos. Šis komplekss tiek pārnestas uz kolagēna matrici, kur AKF transformējas uz vāji kristālisku Ap.

Kaulu organiskajai komponentei ir fundamentāla nozīme Ap veidošanās procesā. Kā redzams 2. attēlā, kaulos kolagēns ir izkārtots paralēlā zigzagveida masīvā. Kolagēna molekulas cita pret citu ir nobīdītas par attālumu D (67 nm), savukārt attālums starp divām tropokolagēna molekulām ir 40 nm, ko dēvē par atstarpes zonu [16]. Atstarpes zonā notiek AKF nukleācija un transformācija uz Ap. Ap kristālu c ass ir orientēta paralēli kolagēna molekulu garenvirzienam [17].

Agrāk veiktajos pētījumos konstatēts, ka sintētiska AKF/kolagēna kombinācija neizraisa AKF transformāciju uz Ap [18]. Tā rezultātā kļuva skaidrs, ka kolagēns nevar patstāvīgi ierosināt mineralizāciju un tam nepieciešams nukleācijas procesu regulējošs katalizators. Šis katalizators ir organiska molekula ar specifiskām reaktīvām sānu grupām (karboksilgrupa vai hidroksilgrupa), kas izkārtotas stereokīmiskā formā [8].



2. att. Kolagēna hierarhiskās struktūras shematisks attēlojums.

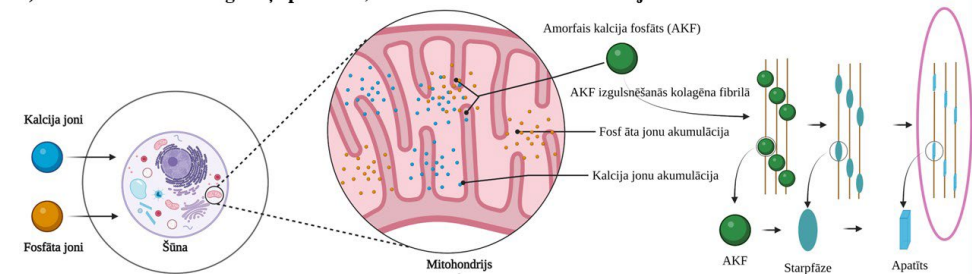
Pirmais organiskais savienojums, kura ietekme uz kolagēna starpfibrilāro mineralizāciju tika pētīta, bija poliaspartāts. Poliaspartāta pievienošana uzlaboja mijiedarbību starp CaP un kolagēnu, kā rezultātā kolagēna fibrilās veidojās atsevišķi CaP kristāli. Ja poliaspartāts netika pievienots, veidojās ar kolagēna fibrilām vāji saistīti CaP kristālu klasteri. Poliaspartāts adsorbējas uz CaP virsmas, un CaP kristalizācijas aizkavēšana var būt saistīta ar palēninātu AKF transformāciju uz Ap vai ar mijiedarbību ar kristālisko fāzi, kavējot nukleācijas centru augšanu [7]. Minētais pētījums pierādīja, ka organiskajām molekulām ir fundamentāla nozīme kolagēna starpfibrilārās mineralizācijas regulēšanā.

Zinātniskajā literatūrā izvērtēta dažādu organisko molekulu (proteīnu, polimēru un mazu organisko molekulu (MOM)) ietekme uz CaP sintēzi. Organisko molekulu saraksts, kuru ietekme uz CaP sintēzi pētīta, atrodams promocijas darba autora 3. publikācijā.

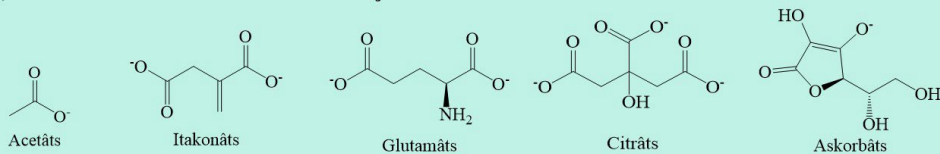
MAZO ORGANISKO MOLEKULU IZVĒLE

AKF dabīgi veidojas procesos, kas saistīti ar šūnu mitohondrijiem (3. A attēls). Šūnu mitohondrijos AKF veido kompleksu ar organisku savienojumu. Literatūrā minēts, ka organiskie savienojumi ar sānu grupām (karboksilgrupu un hidroksilgrupu) var izraisīt Ap nukleāciju [5]. Organisko savienojumu funkcionālajām grupām jābūt ar noteiktu konfigurāciju, lai izraisītu CaP nukleāciju simulētās ķermeņa vides apstākļos. Promocijas darbā pētījumu veikšanai tika izvēlētas piecas MOM, kas sastopamas šūnu mitohondrijos. Šīm MOM ir būtiska nozīme kaulaudu reģenerācijā, un tām ir dažādas funkcionālās grupas, kā redzams 3. B attēlā.

A) AKF veidošanās dabīgā ceļā procesos, kas saistīti ar šūnu mitohondrijiem



B) MOM, kuras atrodamas šūnu mitohondrijos un izmantotas MOM saturoša AKF sintēzei



3. att. A) AKF veidošanās procesos, kas saistīti ar šūnu mitohondrijiem;

B) MOM, kas atrodamas šūnu mitohondrijos un izmantotas MOM saturoša AKF sintēzei promocijas darba autora 4. publikācijā.

Acetāts ir monokarboksilsavienojums, kas uzlabo cilmes šūnu diferenciāciju, palielinot histona acetilēšanu un hromatīna veidošanos. Kaulu smadzeņu mezenhimālās cilmes šūnas (MCŠ) regulē kaulaudu reģenerāciju, diferenciējoties par adipocītiem, hondrocītiem un osteoblastiem. Novecojušām MCŠ ir samazināta spēja diferencēties osteogēnajā un hondrogēnajā šūnu līnijā. Acetāts var samazināt novecojušu MCŠ osteogēneses defektus [19].

Itakonāts un glutamāts ir dikarbonskābes savienojumi, kas sastopami šūnu mitohondrijos. Itakonāts ir metabolīts, kas regulē osteoklastu diferenciāciju un aktivāciju, uztur kaulu homeostāzi un mazina lipopolisaharīdu izraisīta iekaisuma kaulaudu zudumu [20]. Glutamāts ir fundamentāla ārpusšūnas signālmolekula, kas tiek izmantota neirālai un neneirālai signālu pārnesei kaulaudos. Osteoblasti, osteoklasti un kaulu smadzeņu šūnas ekspresē glutamāta receptorus. Glutamāta receptoru aktivācija kontrolē osteoblastu un osteoklastu fenotipu *in vitro* un kaulu masu *in vivo* [21]. Turklāt glutamāts kaulu lūzumu gadījumā palīdz uzturēt slāpekļa līdzsvaru, tādējādi paātrinot kaulu dzīšanas procesu [22].

Citrāts ir trikarbonskābes savienojums un būtiska komponente, kas tiek sintezēta Krebsa ciklā. Citrāta klātbūtne kaulos pirmo reizi tika detektēta 1941. gadā [23]. Citrāta koncentrācija kaulos

ir 20–80 $\mu\text{mol/g}$, kas 100–400 reizes pārsniedz tā koncentrāciju mīkstajos audos. Kauli satur 1,6 % citrāta, kas veido 90 % no citrāta, kas ir cilvēka ķermenī [24]. Jaunākie kodolmagnētiskās rezonanses (KMR) pētījumi ir apstiprinājuši citrāta klātbūtni kaulos [25]. Citrāta un apatīta kompleksā mijiedarbība regulē Ap kristāltrežģa orientāciju, daļiņu izmēru un sadalījumu. Citrāta molekulas gareniskā ass ir paralēla Ap virsmai. Trīs citrāta karboksilgrupas atrodas 0,3–0,45 nm attālumā no Ap virsmas. Karboksilgrupu atstatums sakrīt ar kalcija jonu uz apatīta c ass, tāpēc apatīta kristāla augšana tiek kavēta tā šķērsvirzienā, bet turpinās garenvirzienā [26].

Askorbātam (C vitamīnam) ir izšķiroša nozīme kolagēna sintēzē, un tas ir ļoti svarīgs organisks savienojums saistaudos un kaulos [27]. Kolagēns veido kaula struktūru un nodrošina elastību, ļaujot tam izturēt mehānisku slodzi. Bez pietiekama askorbāta daudzuma tiek traucēta kolagēna sintēze, vājinot kaulu struktūru un palielinot kaulu lūzumu iespējamību [28]. Askorbāts ietekmē arī osteogēno šūnu diferenciaciju [29], [30].

Kopumā tādām MOM kā acetātam, itakonātam, glutamātam, citrātam un askorbātam ir izšķiroša nozīme kaulaudu fizioloģijā. Tādēļ šīs MOM tika izmantotas, lai sintezētu MOM saturošu AKF un analizētu to funkcionālo grupu ietekmi uz AKF fizioloģiskajām īpašībām un citosaderību.

MOM SATUROŠĀ AKF SINTĒZE

Vienas pakāpes AKF sintēzei var izmantot šķīdināšanas-izgulsnēšanas metodi, vispirms izšķīdinot HA un tad iegūtajam šķīdumam strauji pievienojot bāzi (promocijas darba autora 2. publikācija), kā parādīts 4. A attēlā. Turpretī MOM saturošu AKF sintēzē parasti tiek izmantotas daudzpakāpju metodes, kur MOM pievieno vai nu skābes, vai arī bāzes formā, kā redzams 4. B attēlā.

Sarežģītākais AKF sintēzē ir fosfātu jonu triprotiskais raksturs. Ja AKF sintezēts skābā vidē, tas satur HPO_4^{2-} , nevis PO_4^{3-} , kas negatīvi ietekmē AKF īpašības [31]. *Boskey* un *Posner* pierādīja tādu faktoru kā sintēzes pH, virsmas laukuma, kalcija koncentrācijas, maisīšanas ātruma un šķīduma koncentrācijas ietekmi uz sintēzes rezultātā iegūtā AKF fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām (sintēze veikta kontrolētas temperatūras apstākļos 26 °C temperatūrā). AKF sintēzes pH ietekme uz laiku, kas nepieciešams, lai tas transformētos uz Ap, redzama 1. tabulā.

1. tabula

Sintēzes pH ietekme uz AKF transformāciju par Ap [32]

AKF sintēzes pH	Laiks, kas nepieciešams AKF transformācijai uz Ap (min)
6,8	16
7,0	30
7,5	48
8,0	120
9,0	135
10,0	280

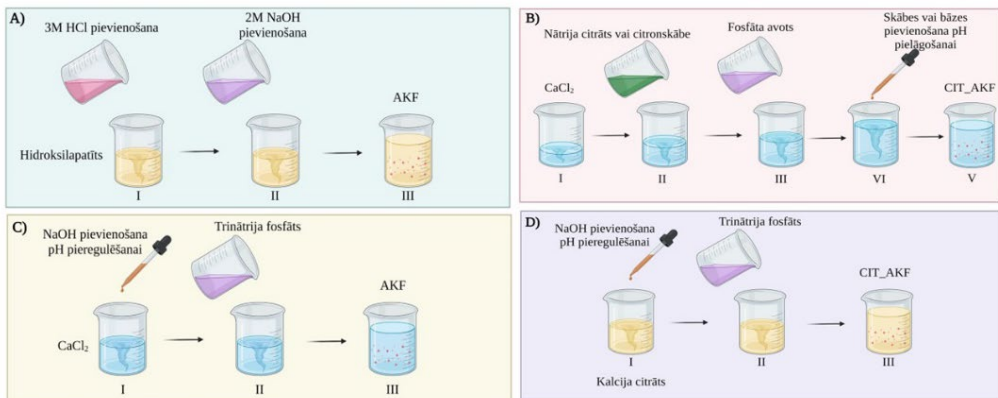
Zinātniskajā literatūrā aprakstītas dažādas metodes tīra un MOM saturoša AKF sintēzei. Sintēzes veiktas atšķirīgos pH, dažādos maisīšanas ātrumos, reakcijas laikos, atšķirīgos tilpumos, kā arī dažādās kalcija un fosfāta jonu koncentrācijās. Tāpēc ir sarežģīti salīdzināt sintežu rezultātā iegūtos tīros un MOM saturošos AKF.

Promocijas darba gaitā izstrādāta vienas pakāpes slapjās ķīmiskās sintēzes metode tīra un MOM saturoša AKF iegūšanai, saglabājot nemainīgus sintēzes parametrus, piemēram, sintēzes pH, reakcijas tilpumu, temperatūru, maisīšanas ātrumu un kalcija un fosfātu jonu koncentrāciju. Šī standartizētā pieeja ļauj analizēt MOM ietekmi uz AKF fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām.

Promocijas darba izstrādes gaitā (promocijas darba autora 4. publikācija) tīra AKF iegūšanai tika izmantota šāda pieeja: vispirms tika pagatavots kalcija hlorīda vai kalcija nitrāta šķīdums (150 mM 150 ml dejonizēta ūdens), tā pH pielāgots līdz 11,5, izmantojot 3M NaOH šķīdumu. Pēc tam, vienmērīgi maisot ar ātrumu 500 apgr./min., šim šķīdumam tika pievienots identisks apjoms trinātrija fosfāta šķīduma (100 mM 150 ml dejonizēta ūdens), kā redzams 4. C attēlā.

Lai iegūtu MOM saturošu AKF (promocijas darba autora 4. un 5. publikācija), vispirms kalcija glutamāts (150 mM), kalcija acetāts (10 mM) vai kalcija citrāts (150 mM) tika pievienots 150 ml dejonizēta ūdens. Iegūtā šķīduma pH tika pielāgots līdz 11,5, izmantojot 3M NaOH šķīdumu, kam sekoja identiska apjoma trinātrija fosfāta šķīduma pievienošana (100 mM 150 ml dejonizēta ūdens), šķīdumu maisot ar 500 apgr./min. (4. D attēls).

Itakonātu un askorbātu saturošā AKF iegūšanas process redzams 4. C attēlā. 150 ml dejonizēta ūdens tika pievienots kalcija hlorīds (150 mM), itakonskābes anhidrīds (150 mM) vai askorbīnskābe (150 mM). Iegūto šķīdumu pH tika pielāgots līdz 11,5, izmantojot 3M NaOH šķīdumu. Pēc tam tika pievienots identisks apjoms trinātrija fosfāta šķīduma (100 mM 150 ml dejonizēta ūdens), nepārtraukti maisot ar ātrumu 500 apgr./min.



4. att. Tradicionālā sintēzes pieeja tīra (A) un MOM saturoša AKF iegūšanai (B). Promocijas darba gaitā tīra AKF sintēzei izmantots kalcija hlorīda šķīdums (pH pielāgots līdz 11,5 ar 3M NaOH), kuram pēc tam pievienots trinātrija fosfāta šķīdums (C). MOM saturoša AKF sintēzei izmantots attiecīgās MOM kalcija sāls šķīdums, kuram pēc pH pielāgošanas pievienots trinātrija fosfāta šķīdums (D).

Visu sintežu gadījumā kalcija sāls šķīdumu (arī MOM saturošo) pH tika pielāgots līdz 11,5, izmantojot 3M NaOH. Trinātrija fosfāta šķīduma pH vērtība pēc būtības ir 12. Sajaucot šos

šķīdumus, reakcijas pH saglabājās robežās no 10,5 līdz 11,5. Sintēžu reakcijas tilpums, temperatūra, maisīšanas ātrums, kalcija un fosfātu jonu koncentrācija, kā arī skalošanas un žāvēšanas process (centrifugēšana, trīskārtēja skalošana ar destilētu ūdeni, iegūto nogulšņu sasaldēšana, izmantojot šķidro slāpekli un liofilizācija) bija identiski. Gan AKF, gan MOM saturošie AKF tika iegūti līdzīgos apstākļos, kas ļaujot tos savstarpēji salīdzināt un spriest par MOM ietekmi gan uz AKF fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām, gan AKF transformācijas kinētiku uz Ap.

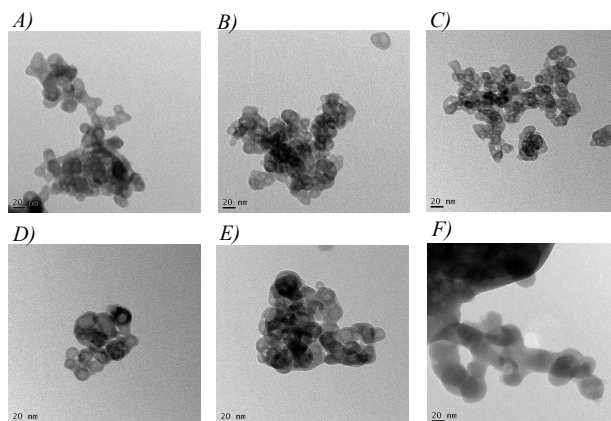
SINTĒZES REZULTĀTĀ IEGŪTO AKF ĪPAŠĪBAS

Promocijas darba autora 4. publikācijā aprakstītas gan sintēzes rezultātā iegūto tīro AKF, gan acetātu un citrātu saturošo AKF īpašības, savukārt 5. publikācijā sniegta informācija par askorbātu, glutamātu un itakonātu saturošajiem AKF.

Visu sintezēto AKF RTG ainas uzrādīja divus platus izliekumus, apliecinot, ka sintēžu rezultātā ir iegūts AKF. Absorbcijas joslu šķelšanās ν_4 PO_4^{3-} raksturīgajā svārstību apgabalā ($500\text{--}620\text{ cm}^{-1}$) paraugiem iegūtajos FTIR spektros netika novērota, liecinot par visu sintēzes rezultātā iegūto AKF amorfo dabu.

Visu iegūto AKF cietvielu ^{31}P kodolmagnētiskās rezonanses (KMR) analīze uzrādīja AKF raksturīgo plato pīķi ar Gausa sadalījuma formu, kas centrēts starp 2,2 ppm līdz 6,5 ppm. AKF un attiecīgo MOM funkcionālo grupu klātbūtne tika apstiprināta, izmantojot FTIR un cietvielu ^{13}C KMR analīzi.

Morfoloģija AKF, kura klātbūtne detektēta zebzivis spuru kaulos, cāļu embriju garajos kaulos un peļu galvaskausos, ir sfēriska vai globulāra, ar izmēru 10–50 nm [33], [34]. 5. attēlā redzama promocijas darba izstrādes gaitā sintezēto tīro un MOM saturošo AKF transmisijas elektronu mikroskopijas (TEM) attēli. Tīrā, acetātu, askorbātu, glutamātu un itakonātu saturošā AKF daļiņām ir sfēriska forma ar diametru ap 20 nm. Novērojams, ka daļiņām ir dobs vidus. Citrātu saturošajam AKF ir globulāra morfoloģija ar diametru ap 40 nm.



5. att. Promocijas darba izstrādes gaitā sintezēto AKF morfoloģija (mērogs 20 nm). A) tīrs AKF; B) AKF_ ACE (acetātu saturošs AKF); C) AKF_ITN (itakonātu saturošs AKF); D) AKF_GLU (glutamātu saturošs AKF); E) AKF_ASK (askorbātu saturošs AKF); F) AKF_CIT (citrātu saturošs AKF).

MOM ietekme uz AKF patieso blīvumu un īpatnējo virsmas laukumu (ĪVL) redzama 2. tabulā. Šajā pētījumā izmantotajām MOM ir dažādas funkcionālās grupas. Acetāts ir monokarboksilāts, glutamāts un itakonāts ir bikarboksilāts, citrātām ir trīs karboksilāta grupas un hidroksilgrupa, savukārt askorbātam ir hidroksilgrupas. AKF sastāvā esošie kalcija un fosfāta joni var reaģēt ar acetāta, citrāta, itakonāta un glutamāta karboksilāta grupām. Hidroksilgrupas var reaģēt gan ar fosfāta, gan kalcija joniem. Ņemot vērā to, ka sintēzei izmantotajām MOM ir atšķirīgs karboksilātu un hidroksilgrupu skaits un, attiecīgi, to negatīvo lādiņu skaits, tās atšķirīgi reaģē ar AKF sastāvā esošajiem kalcija un fosfāta joniem. 2. tabulā redzamas tīrā un MOM saturošo AKF patiesais blīvums un ĪVL.

2. tabula

Sintēzes rezultātā iegūto AKF patiesais blīvums un ĪVL

Paraugs	Patiesais blīvums (g/cm ³)	ĪVL (m ² /g)
AKF	2,62	105
Acetātu saturošs AKF	2,47	118
Itakonātu saturošs AKF	2,43	130
Glutamātu saturošs AKF	2,64	92
Askorbātu saturošs AKF	2,82	115
Citrātu saturošs AKF	2,57	62

SINTEZĒTO AKF KRISTALIZĀCIJAS KINĒTIKA ŪDENS VIDĒ

In vitro analīze tiek izmantota, lai noteiktu šūnu atbildes reakciju uz materiālu. Šīs analīzes laikā materiāls tiek pakļauts dažādu šķīdumu iedarbībai. Metastabiliem materiāliem, piemēram, AKF, pirms *in vitro* analīzes veikšanas ir ļoti būtiski novērtēt kristalizācijas kinētiku ūdens vidē. Promocijas darba autora 5. publikācijā aprakstīti visu sintezēto AKF kristalizācijas kinētikas pētījumi. Eksperimenti tika veikti dejonizētā ūdenī, fosfāta buferšķīdumā (*FBS*) un šūnu kultūras barotnē *Minimum Essential Medium* (α -MEM).

Līdz šim publicētie pētījumi liecina, ka AKF kristalizācijas kinētiku neietekmē šādi faktori: a) izmantotās buferšķīduma sistēmas veids; b) dažāda veida monovalento jonu klātbūtne; c) AKF saskare ar sintēzes šķīdumu, filtrēšana, žāvēšana vai tā pievienošana tikko pagatavotam buferšķīdumam.

Faktori, kas ietekmē kristalizācijas kinētiku, ir maisīšanas ātrums, sintēzes šķīduma sastāvs, šķīdinātāja veids, piesārņojuma klātbūtne un piedevas (polimetrolīti, fosfolipīdi, poliglikoli, proteīni). Līdz šim veiktajos pētījumos MOM ietekmei uz AKF kristalizāciju pievērsta maza uzmanība [32].

Kristalizācijas eksperimenti vispirms tika veikti dejonizētā ūdenī (6. att.). Acetātu saturošā AKF transformācija uz Ap notika ātrāk nekā tīrā AKF gadījumā. Organiskā savienojuma sānu grupas (karboksilāta vai hidroksilgrupa) nodrošina mijiedarbību ar CaP. Organisko molekulu funkcionālajās grupas var būtiski ietekmēt AKF fizikālās un ķīmiskās īpašības (piemēram, morfoloģiju, daļiņu lielumu, ĪVL un patieso blīvumu).

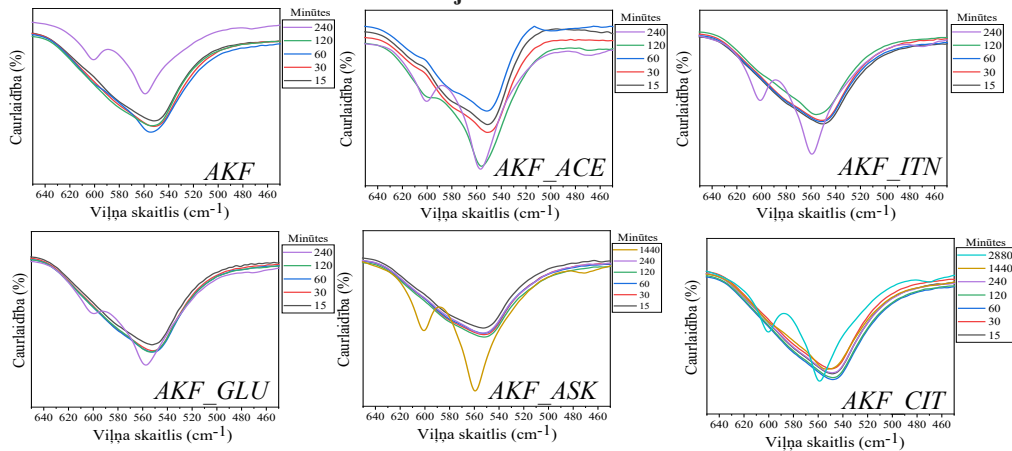
KMR analīze apstiprināja, ka tīrs AKF satur karbonātu jonus (lādiņš -2). Acetāta lādiņš ir -1. Zinātniskajā literatūrā minēts, ka fluoru saturošs AKF uz Ap transformējas ātrāk nekā tīrs

AKF, kas saistāms ar fluora jona negatīvo lādiņu [35], [36]. Acetāta negatīvais lādiņš varēja veicināt ātrāku acetātu saturošā AKF transformāciju uz Ap.

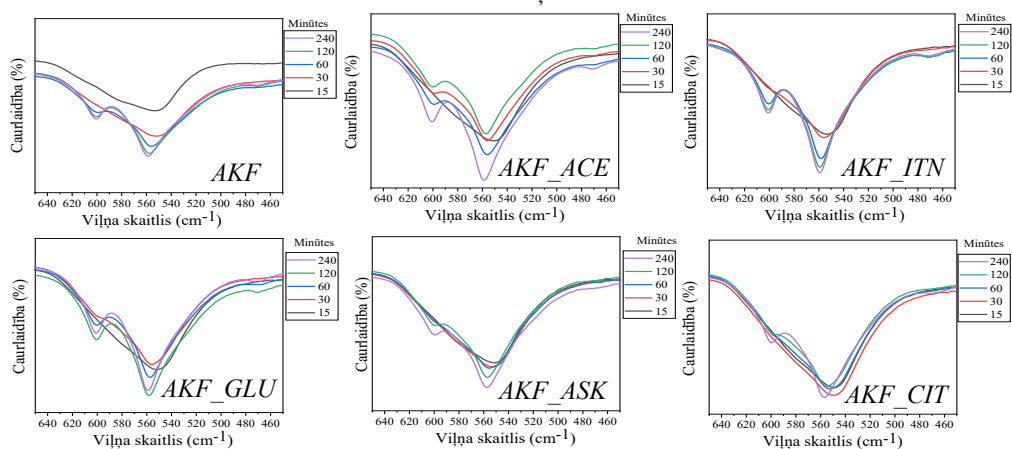
Ir zināms, ka karbonāta jonu klātbūtne AKF struktūrā kavē tā transformēšanos uz Ap [31]. Itakonāts un glutamāts satur divas karboksilāta grupas (katrai lādiņš -1), kā rezultātā to ietekme varētu būt līdzīga kā karbonātus saturošam AKF. Tāpēc tīra, kā arī glutamātu un itakonātu saturoša AKF transformācijas ātrums uz Ap varēja būt līdzīgs.

Citrāts satur trīs karboksilāta grupas (kopējais negatīvais lādiņš -3). Tā rezultātā citrātu saturošā AKF transformācijas ātrums bija vislēnākais. Askorbāta anjona lādiņš ir -1 , kas varēja palēnināt tā transformācijas ātrumu, salīdzinot ar tīru, acetātu, itakonātu un glutamātu saturošu AKF.

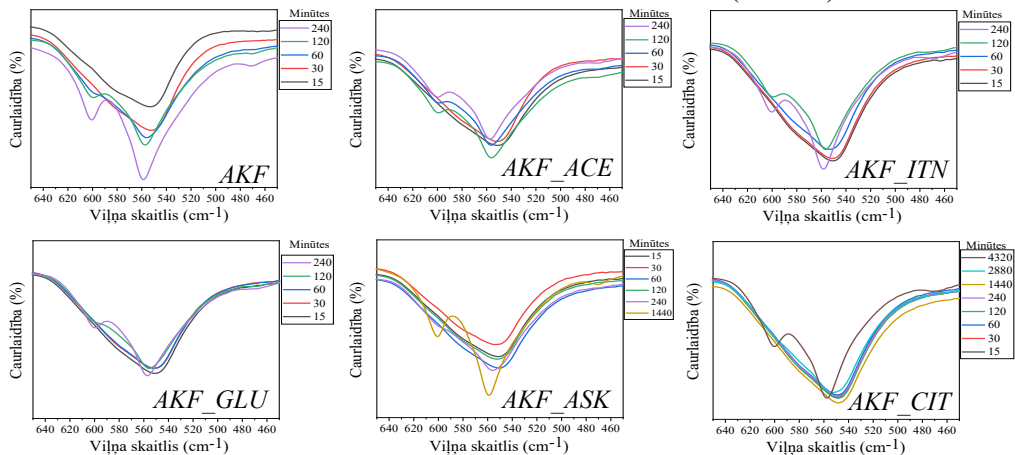
Dejonizētā



Fosfāta buferšķīdumā



Šūnu kultūras barotnē *Minimum Essential Medium* (α -MEM)



6. att. AKF transformācija uz Ap dažādās ūdens vidēs. Transformācijas kritērijs bija ν_4 PO_4^{3-} svārstību apgabals paraugu FTIS spektros. Paraugi, kuros ν_4 PO_4^{3-} svārstību apgabālā netika

novērota skaidra šķelšanās, uzskatīti par amorfiem; paraugi, kuriem novērota šķelšanās v_4 PO_4^{3-} svārstību apgabalā transformējušies uz Ap.

FBS gadījumā visi sintezētie AKF ātrāk transformējās par Ap. Zinātniskajā literatūrā minēts, ka *FBS* šķīdumā organiskie savienojumi no AKF virsmas izdalās jonu apmaiņas ar fosfātu grupām no *FBS* vides rezultātā. Tā rezultātā pieaug fosfātu koncentrācija AKF, kas samazina tā stabilitāti un izraisa straujāku transformāciju uz Ap fāzi [37]. Fosfātu saturs α -MEM vidē ir mazāks nekā *FBS*. Tādēļ transformācijas kinētika bija lēnāka (izņemot citrātu saturošo AKF).

Citrātus saturošais AKF α -MEM vidē stabilitāti saglabāja līdz 2880 minūtēm ilgi. Agrāk publicētajos pētījumos minēts, ka ap citrāta stabilizētām zelta nanodaļiņām albumīna serumā veidojas ar proteīniem bagāts slānis. Iespējams, līdzīgi, negatīvi lādētais citrāts no citrāta stabilizētajām AKF daļiņām mijiedarbojas ar fetālo liellopa serumu, kas ir α -MEM sastāvā, un tā rezultātā tiek aizkavēta AKF kristalizācija [38], [39].

FTIS analīzes apstiprināja, ka attiecīgo MOM funkcionālās grupas CaP struktūrā saglabājas arī pēc transformācijas. MOM saturošu Ap var iegūt, integrējot sintēzes un transformācijas kinētikas procesus.

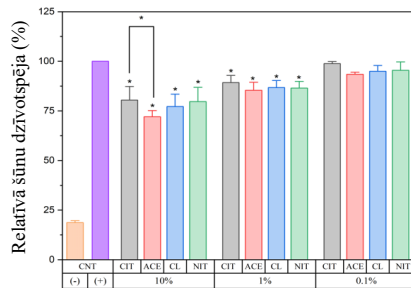
SINTEZĒTO AKF RAKSTUROŠANA *IN VITRO*

Sintezētā AKF raksturošana *in vitro* tika veikta ar osteoblastu prekursoru šūnām, kas iegūtas no peles (*Mus musculus*) galvaskausa (*MC3T3-E1*). Lai veiktu testus ar šūnām, tika sagatavotas AKF suspensijas, pievienojot 10 m/v % AKF daļiņu α -MEM videi, kas pēc tam ar ūdens tvaikiem piesātinātā atmosfērā, kas sastāvēja no 95 % gaisa un 5 % CO_2 , 37 °C temperatūrā tika inkubēta 24 stundas.

Ekstrakti vispirms tika centrifugēti un pēc tam filtrēti, lai atdalītu cietās daļiņas. Pēc tam tie tika atšķaidīti ar α -MEM, lai iegūtu nepieciešamo koncentrāciju – 1 m/v% un 0,1 m/v %. *In vitro* pētījumiem izmantots gan neatšķaidīts ekstrakts, gan ekstraktu atšķaidījumi (1 m/v un 0,1 m/v %). Pēc tam ekstrakti tika pievienoti *MC3T3-E1* saturošām šūnu platēm, kas pēc tam tika inkubētas 48 stundas. α -MEM vide tika izmantota kā pozitīvā kontrole. Kā negatīvā kontrole tika izmantota α -MEM vide, kas saturēja 6 tilp.% dimetilsulfoksīda. Šūnu dzīvotspējas analizēšanai tika izmantots *WST-8 (CCK-8, Sigma Aldrich)* komplekts.

Promocijas darba autora 4. publikācijā analizēti tīra, kā arī AKF_CIT un AKF_ACE *in vitro* testu rezultāti. Absorbēšana, kas reģistrēta no šūnām, kas tika kultivētas pozitīvās kontroles vidē, tika normalizēta līdz 100 %. Šūnas, kas kultivētas ar 10 w/v % AKF_ACE ekstraktu, uzrādīja zemāko šūnu dzīvotspēju. Vislielākā šūnu dzīvotspēja tika novērota 0,1 w/v % AKF_CIT ekstraktā. Starp 10 w/v % koncentrācijas ekstraktiem visaugstāko šūnu dzīvotspēju uzrādīja AKF_CIT ekstrakts, kam sekoja tīrs AKF (AKF_CL un AKF_NIT) un AKF_ACE.

Tā kā visi AKF paraugi (7. att.) uzrādīja šūnu dzīvotspēju virs 70 %, var secināt, ka visi paraugi ir citosaderīgi. *In vitro* analīzes rezultāti liecina, ka AKF_CIT ekstraktos šūnu dzīvotspēja bija visaugstākā, kas liecina, ka šūnu dzīvotspēja pieauga, ja AKF satur citrātus.

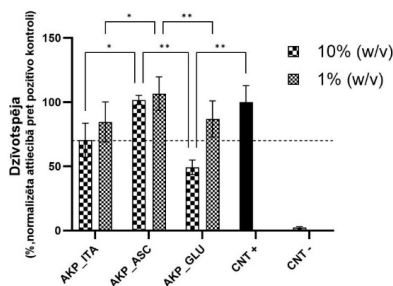


7. att. Atšķirīgu koncentrāciju (10 % m/v, 1 % m/v un 0,1 % m/v) AKF ekstraktos kultivētu *MC3T3-E1* šūnu relatīvā dzīvotspēja ($n = 12$, CNT – kontrole, trīs atkārtojumi, $*p < 0,05$). CL un NIT reprezentē tīru AKF paraugus, CIT un ACE – citrātu un acetātu saturošus AKF.

Promocijas darba autora 5. publikācijā aprakstīta *in vitro* analīze, kas veikta askorbātu, glutamātu un itakonātu saturošiem AKF. Pozitīvā un negatīvā kontrole apzīmēta attiecīgi kā CNT+ un CNT-. Iegūtie rezultāti liecināja, ka 10 % w/v AKF_GLU ekstrakts bija citotoksisks. Augsta glutamāta koncentrācija var izraisīt ekscitotoksicitāti un/vai oksidatīvu glutamāta toksicitāti [40], [41]. Tomēr, samazinot AKF_GLU ekstrakta koncentrāciju līdz 1 % w/v, šūnu dzīvotspēja pieauga.

Šūnu dzīvotspēja 10 % AKF_ITN un AKF_ASK ekstraktā bija labāka nekā 10 % AKF_GLU ekstraktā. Līdzīga tendence tika novērota arī 1 % w/v AKF_ITN un AKF_ASK ekstrakta gadījumā. Šūnu dzīvotspēja 10 % w/v un 1 % w/v AKF_ASK ekstraktā bija labāka nekā CNT+ gadījumā.

Askorbātam ir izšķiroša nozīme preosteoblastu diferenciācijā, un tas var būt iemesls lielākai šūnu dzīvotspējai [42], [43]. Kā redzams 8. attēlā, šūnu dzīvotspēja visos AKF ekstraktos (izņemot 10 % w/v AKF_GLU) bija lielāka par 70 %, tāpēc var secināt, ka visi ekstrakti ir citosaderīgi.



8. att. Relatīvā dzīvotspēja *MC3T3-E1* šūnām, kas kultivētas dažādu koncentrāciju AKF ekstraktos (10 % un 1 % m/v), kas iegūti α -MEM vidē. Visi paraugi tika analizēti trīs reizes, un

dati norādīti kā vidējā vērtība un standartnovirze. CNT + un CNT – attiecīgi ir pozitīvā un negatīvā kontrole.

NANOKOMPOZĪTA BIOTINTE

Promocijas darba gaitā izstrādātā nanokompozīthidrogela biotinte, kas satur AKF, tika izstrādāta pirmo reizi. Nanokompozīthidrogela biotintes iegūšanai tika izmantots citrātu un acetātu saturošais AKF. Pētījumā analizēta izdrukāto konstrukciju strukturālā integritāte, daļiņu izmēra, kristalizācijas kinētikas un attiecīgā MOM ietekme uz biotintes īpašībām.

Promocijas darba autora 6. publikācijā aprakstīta nanokompozīthidrogela pamatņu biodrukāšana, kas tika veikta trīs posmos – pirmsdrukāšana, drukāšana un pēcdrukāšanas analīze.

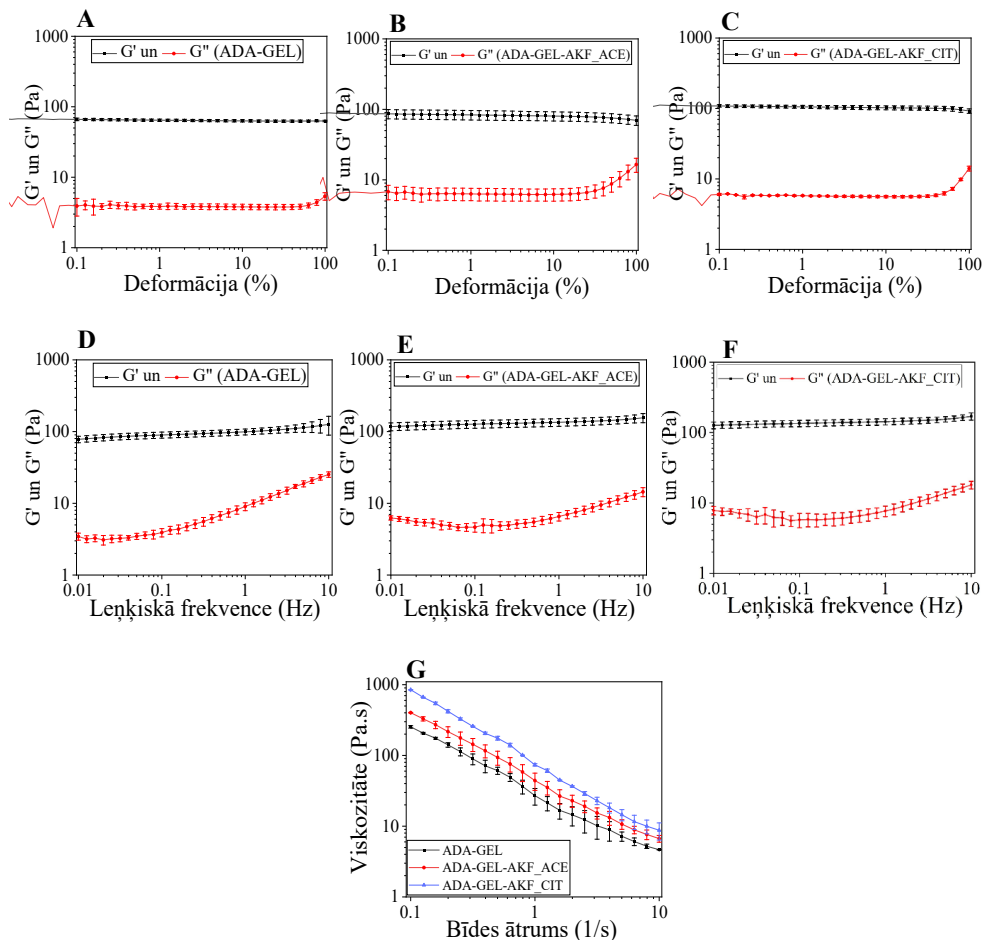
Pirmsdrukāšanas posmā tika izvēlēts pamatņu dizains, materiāls un šūnas. Kopumā iegūtas divas nanokompozīta biotintes, kur algināta dialdehīda-želatīna (*ADA-GEL*) organiskajā matricē tika iekļauts citrātu un acetātu saturošais AKF.

GEL ir vienpavediena proteīns, kas iegūts kolagēna hidrolītiskās noārdīšanas rezultātā. Tas satur glicīnu, prolīnu un 4-hidroksiprolīnu, un tam piemīt līdzīgas biomehāniskās īpašības kā kolagēnam [44]. Algināts ir dabīgs polimērs, kas iegūts no brūnajām jūraszālēm, kas sastāv no β -(1-4), kas saistīts ar mannouronskābi, un β -(1-4), kas saistīts ar I-glikuronskābes vienībām. Pie algināta nevar piesaistīties šūnas, taču to bieži izmanto kopā ar *GEL*, lai izgatavotu 3D pamatnes [45]. Alginātam nepiemīt spēja mijiedarboties ar *GEL*, tāpēc tas tika pārveidots par algināta dialdehīdu (*ADA*). Tā rezultātā tas nodrošināja reaktīvās grupas *GEL* šķērssaistīšanai, nodrošinot Šifa bāzes veidošanos [46].

Otrais solis bija biotīnšu drukāšana. Vispirms tika veikta hidrogelu reoloģijas analīze, kā arī veikta biodrukāšanas parametru optimizācija. Amplitūdas tests ir pirmais solis hidrogelu viskoelastīgo īpašību raksturošanā [47].

Visu hidrogelu *VEA* iekļaujas 20 % no maksimālās bīdes deformācijas vērtības, kā redzams 9. A–C attēlā. Papildus visiem hidrogeliem tika veikts frekvences un tecēšanas tests pie 1 % no maksimālās bīdes deformācijas vērtības. Frekvences tests tika veikts, lai analizētu hidrogelu krājuma moduli (G') un zuduma moduli (G''), kā redzams 9. D–F attēlā.

ADA-GEL un AKF saturošā *ADA-GEL* hidrogeliem $G' > G''$, kas ir vēlami konstrukciju biodrukāšanai. Zemākā frekvence, pie kuras tika analizētas hidrogelu G' un G'' vērtības, bija 1 Hz. *ADA-GEL* hidrogelā G' un G'' bija attiecīgi $99,2 \pm 9,3$ Pa un $9 \pm 1,1$ Pa. AKF_ ACE saturošajam *ADA-GEL* hidrogelam G' un G'' vērtības ir $134,9 \pm 16,5$ Pa and $6,5 \pm 0,5$ Pa, savukārt AKF_CIT saturošajam *ADA-GELA* hidrogelam G' un G'' vērtības ir attiecīgi $142,6 \pm 14,1$ Pa un $7,6 \pm 1,2$ Pa. Visiem iegūtajiem hidrogeliem piemīt neņūtona šķidrums īpašības (9. G att.).

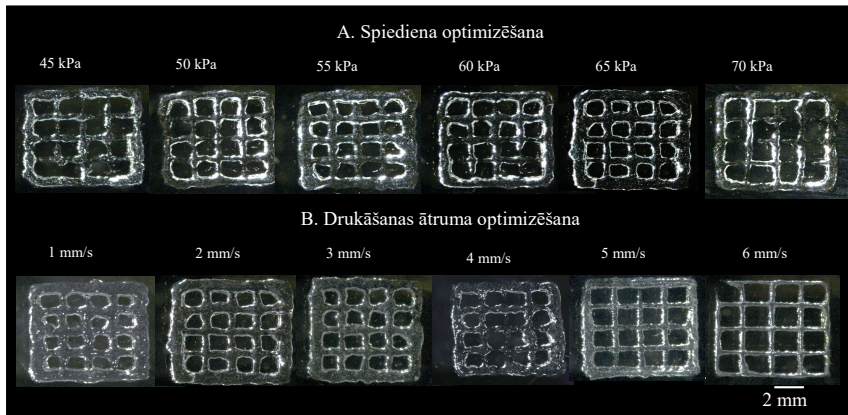


9. att. ADA-GEL un AKF saturoša ADA-GEL hidrogela oscilācijas testi. (A–C) amplitūdas krituma analīze tika veikta, lai novērtētu hidrogela VEA. (D–F) frekvenču analīze – lai raksturotu hidrogelu krājuma (G') un (G''). Rezultāti liecina, ka AKF pievienošana ADA-GEL hidrogelam uzlabo tā G' un G'' . (G) hidrogela plūstamības analīze veikta, attiecinot viskozitātes.

Drukāšanas parametri tika optimizēti ar izmēģinājuma un kļūdu metodi, izmantojot ADA-GEL hidrogelu. Lai optimizētu printēšanas spiedienu un drukāšanas ātrumu, tika izdrukāta $8 \times 8 \text{ mm}^2$ konstrukcija – režģis. Sākotnēji drukāšana tika veikta lēnām – ar ātrumu 2 mm/s – pie mainīga spiediena. Drukāšanas ātrums tika optimizēts pēc tam, kad drukāšanas rezultātā tika iegūts nepārtraukts režģis ar viendabīgu acu izmēru, kā redzams 10. attēlā. Optimālais drukāšanas spiediens bija 65 kPa , savukārt ātrums 5 mm/s . Šie drukāšanas parametri tika izmantoti, lai izdrukātu konstrukcijas, izmantojot ADA-GEL un AKF saturošu ADA-GEL biotinti, kas pēc tam tika šķērssaistītas, izmantojot kalcija hlorīdu un bakteriālo transglutamināzi un iemērkta α -MEM vidē.

Trešais posms ir izdrukāto konstrukciju analīze, kuras laikā autors pārliecinājās par izdrukāto konstrukcijas stabilitāti. Drukāšanas indekss un vidējā poru laukuma analīze tika veikta, izmantojot ImageJ programmatūru. Agrāk publicētos pētījumos drukāšanas indekss

izmantots, lai optimizētu drukāšanas parametrus. Veiktajā pētījumā drukāšanas indekss izmantots, lai raksturotu izdrukāto konstrukciju acu ģeometrijas izmaiņas kā funkciju no laika. Savukārt drukāšanas indeksa rezultāti tika korelēti ar vidējo režģa acs laukumu, kā redzams 11. attēlā.



10. att. Izmēģinājuma un kļūdu metodes izmantošana drukāšanas parametru optimizācijai, izmantojot dažādas drukāšanas spiediena un ātruma kombinācijas. A) Vispirms drukāšanas spiediens tika optimizēts pie drukāšanas ātruma 2 mm/s. B) Drukāšanas ātrums optimizēts pie spiediena 65 kPa.

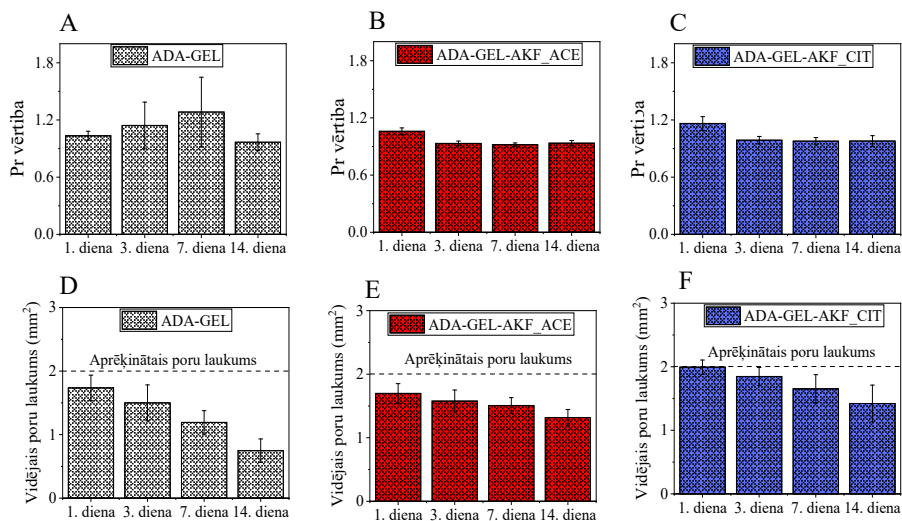
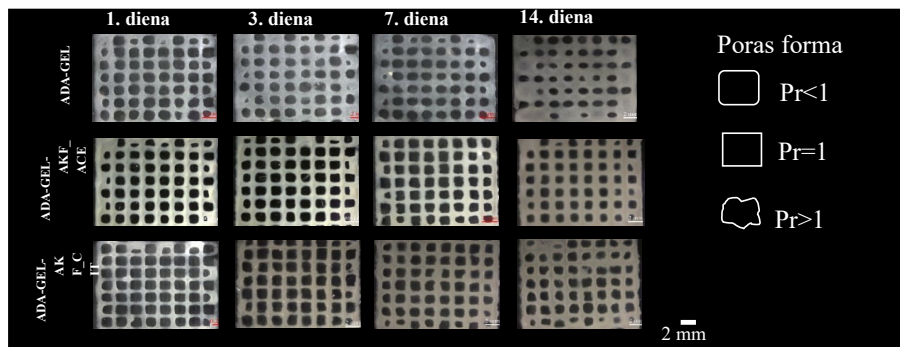
Izdrukāto konstrukciju acu ģeometrija tika novērtēta, izmantojot drukāšanas indeksu [48]. Slēgta apgabala cirkularitāte (C) tiek definēta kā:

$$C = \frac{4\pi A}{L^2} \quad (1),$$

kur L – perimetrs, A – režģa acs laukums. Apļa formai ir vislielākā cirkularitāte – $C = 1$, savukārt kvadrāta formai cirkularitāte ir vienāda ar $\pi/4$. Zinātniskajā literatūrā aprakstītajos pētījumos biotintes drukas indekss (Pr) kvadrātveida formas porām ir noteikts, izmantojot šādu funkciju [49]:

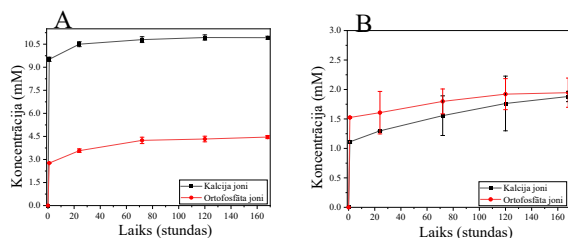
$$Pr = \frac{\pi}{4} \cdot \frac{1}{C} = \frac{L^2}{16A} \quad (2)$$

Ideāli saželējušas režģa konstrukcijas acij ir kvadrātveida forma ar Pr vērtību 1. $Pr > 1$ liecina par neregulāras acs formas ģeometriju, savukārt $Pr < 1$ apraksta izliektas formas acs ģeometriju [50]. Drukāto *ADA-GEL* un *AKF* saturoša *ADA-GEL* konstrukciju attēli iegūti, izmantojot stereomikroskopu. Katras režģa konstrukcijas acu cirkularitāte ($n = 16$) tika analizēta, izmantojot *Image-J* programmatūru, pēc tam aprēķinot Pr vērtību [51]. Dati uzrādīti kā vidējā Pr vērtība ar standartnovirzi.



11. att. ADA-GELA un AKF saturošas ADA-GEL biotintes drukāto konstrukciju pēcdrukas analīze (ADA-GEL, ADA-GEL-AKF_ ACE un ADA-GEL-AKF_ CIT). Stereomikroskopijas attēlu analīze tika veikta 1., 3., 7. un 14. dienā (mērogs 2 mm). Drukais indekss (Pr) un vidējā poru laukuma analīze tika veikta, izmantojot attēlu analīzi programmatūru, atlasot 16 poras. Poru ģeometrija tika novērtēta, analizējot Pr vērtību; piemēram, $Pr < 1$ attēlo izliektu, $Pr = 1$ atbilst kvadrātveida, $Pr > 1$ neregulāru iporu ģeometriju. (A–C) demonstrē Pr vērtības, (D–F) parāda vidējo biotintes poru laukumu. ADA-GEL biotintes uzrāda straujas konformācijas izmaiņas poru ģeometrijā un biotintes vidējā poru laukuma samazināšanos, liecinot par zemu strukturālo stabilitāti, salīdzinot ar AKF saturošajām ADA-GEL biotintēm.

AKF_ CIT pievienošana nodrošināja labāku izdrukātās konstrukcijas strukturālo integritāti nekā AKF_ ACE pievienošana, kas, iespējams, saistīts ar atšķirīgo kalcija un fosfātu jonu izdalīšanās kinētiku no AKF_ CIT un AKF_ ACE (12. att.). Jonu izdalīšanās eksperimenti tika veikti 168 stundas (septiņas dienas), lai analizētu kalcija un fosfāta jonu izdalīšanos. Sākotnēji, pirmo stundu laikā, tika novērota strauja kalcija un fosfātu jonu izdalīšanās, kas pēc tam pakāpeniski samazinājās [52], [53]. AKF_ CIT uzrādīja augstāku izdalīto jonu koncentrāciju. AKF_ ACE izdalītais kalcija un fosfātu jonu daudzums bija salīdzinoši neliels – robežās no 1 mM līdz 1,5 mM.

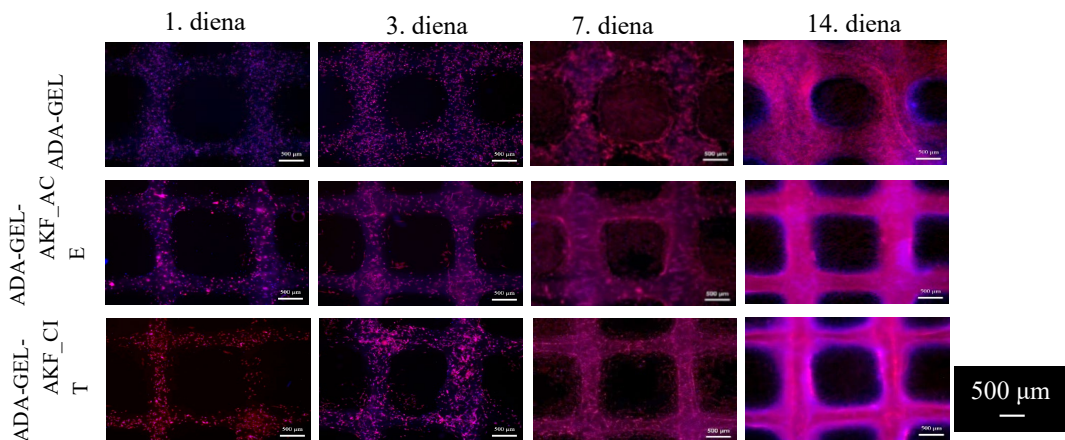


12. att. Fosfātu un kalcija jonu izdalīšanās kinētika. (A) Citrātu saturošs AKF; (B) acetātu saturošs AKF.

Arī AKF daļiņu izmēram var būt būtiska nozīme izdrukātās konstrukcijas strukturālās integritātes nodrošināšanā. AKF_ ACE daļiņu izmērs ir mazāks (~ 20 nm) nekā AKF_ CIT (~ 40 nm) (detalizētāka informācija atrodama promocijas darba autora 4. publikācijā). Mazāks daļiņu izmērs nodrošina lielāku virsmas laukumu un, attiecīgi, lielāku tendenci daļiņām aglomerēties, kas var negatīvi ietekmēt izdrukātās konstrukcijas strukturālo integritāti [54].

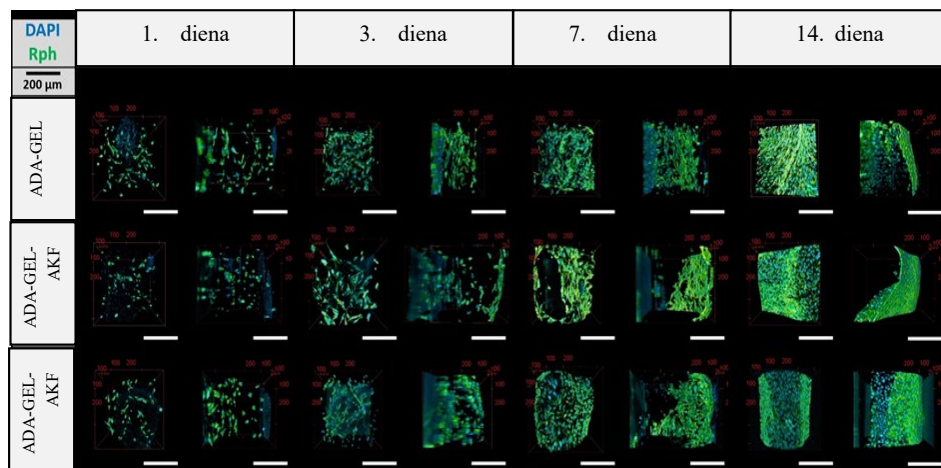
Brīvā citrāta karboksilgrupa potenciāli var reaģēt ar želatīna amīnu grupu, nodrošinot amīda saites veidošanos. Gan *ADA*, gan *GEL* var šķērssaistīt ar citrātu saturošu AKF [55]. Precīzai šķērssaistīšanās mehānisma noteikšanai būtu nepieciešams veikt papildu analīzes.

Izdrukāto konstrukciju raksturošana *in vitro* tika veikta, izmantojot iekrāsošanu ar rodamīna falloidīnu un *DAPI*. 13. attēlā redzams šūnu piesaistīšanās izdrukātajai konstrukcijai pirmajā dienā, kam seko šūnu pagarināšanās, saplūšana un tīklojuma veidošanās nākamā dienu laikā. Konstrukciju virsmu 14. dienā klāja šūnas, kas apstiprina izveidotās nanokomozīta biotintes citosaderību.



13. att. Epifluorescences mikroskopija rodamīna-faloidīna (sarkanā krāsā) un *DAPI* (zilā krāsā) iekrāsotām *MC3T3-E1* šūnām, kas iekļautas *ADA-GEL* un AKF saturoša *ADA-GEL* konstrukcijās (*ADA-GEL-AKF_ ACE* un *ADA-GEL-AKF_ ACE*). Mērogs 500 μm.

Lai raksturotu šūnu izplatīšanos izdrukāto konstrukciju tilpumā, izmantota divfotonu mikroskopija. Iegūto divfotonu mikroskopijas attēlu grupu 3D rekonstrukcijas redzamas 14. attēlā. Attēlos redzams, ka šūnu populācija ar laiku pakāpeniski pieaug, apstiprinot rezultātus, kas iegūti ar epifluorescences mikroskopiju.



14. att. Trīsdimensionāli rekonstruēti daudzfotonu mikroskopijas attēli kvalitatīvai morfometrijas un šūnu sadalījuma analīzei.

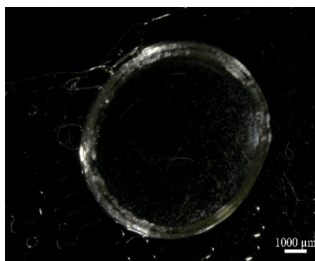
NANOKOMPOZĪTU HIDROGELI

Promocijas darba autora 7. publikācijā aprakstīts nanokompozīthidrogels, kura matricu veido *GELMA*, savukārt pildviela ir AKF. *GELMA* ir pateicīgs materiāls audu inženierijai, ņemot vērā tā biosaderību, bioloģisko noārdīšanos, bioaktivitāti un unikālās šķērssaistīšanās īpašības, kas lietojamas nanokompozītuhidrogelu izgatavošanai [56].

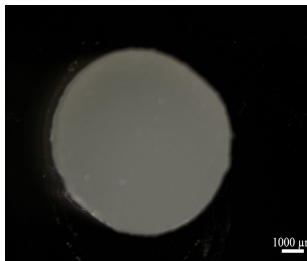
Izplatītākā metode *GELMA* hidrogelu šķērssaistīšanai ir fotošķērssaistīšana, kur tiek izmantota ultravioletā (UV) gaisma un fotoiniciators. *GELMA* šķīdums satur fotoiniciatoru, kas tiek pakļauts UV gaismas iedarbībai. Fotoiniciators absorbē UV gaismu un fotolīzes reakcijas rezultātā ģenerē brīvos radikāļus. Brīvie radikāļi reaģē ar *GELMA* esošajām metakriloila grupām, izraisot radikāļu veidošanos uz *GELMA* molekulām. Radikāļi blakus esošajās *GELMA* molekulās sāk ķēdes reakciju, veidojot kovalentās saites starp metakriloila grupām. Līdzīgā veidā redoksa sistēma izmanto ķīmisko iniciatoru amonija persulfātu (APS) un n,n,n',n'-tetra metiletilēnadiamīnu (*TEMED*).

Fotošķērssaistīšanai ir trūkumi, piemēram, lēna želēšana un sarežģīts sagatavošanas process [57]. Fotošķērssaistīšanas efektivitāti var būtiski samazināt pildvielas, kas hidrogelu padara necaurspīdīgu, proti, pasliktina tā gaismas caurlaidību, kas traucē fotopolimerizācijas reakcijas procesu un šķērssaistīšanas dziļumu [58]. AKF pievienošanas rezultātā hidrogels kļūst necaurspīdīgs (15. B att.), kas apgrūtinā *GELMA* fotošķērssaistīšanas procesu. Lai izstrādātu AKF_CIT saturošus *GELMA* hidrogelus, tika izmantota redoksa ierosināta ķīmiskā šķērssaistīšana, izmantojot APS/*TEMED* [59]. Izgatavotie hidrogeli redzami 15. attēlā. AKF_CIT pievienošana minimāli ietekmēja *GELMA* hidrogela viskoelastiskās īpašības.

A) GELMA

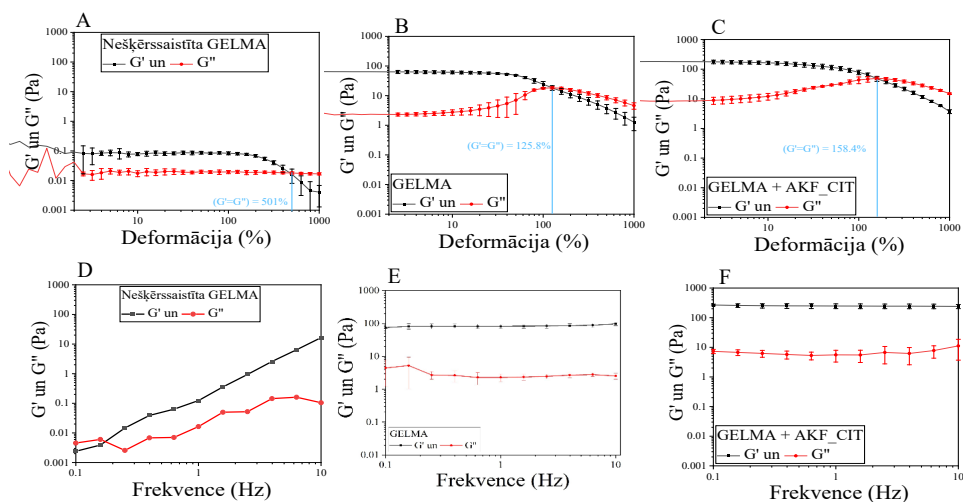


B) GELMA-AKF_CIT

15. att. Iegūtie GELMA un GELMA-KF_CIT hidrogeli (mērogs 1000 μm).

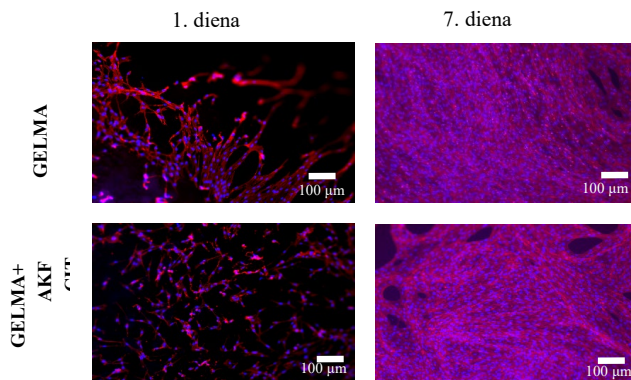
Amplitūdas testa rezultāti redzami 16. (A–C) attēlā. Hidrogela VEA tika analizēts, izmantojot amplitūdas testu apgabalā, kas ir mazāks par 10 % no maksimālās bīdes deformācijas vērtības. Papildu analīze tika veikta zem 1 % no maksimālās bīdes deformācijas vērtības. Nešķērssaistītas GELMA krājuma (G'') un zuduma modulis (G') bija ļoti zems (mazāks par 0,1 Pa) ar krustošanās punktu ($G' = G''$) 501 %, kas liecina par tās spēju izturēt bīdes spēku izraisītu neatgriezenisku deformāciju. Pēc šķērssaistīšanas GELMA hidrogela G' un G'' pieauga, savukārt krustošanās punkts samazinājās līdz 125,8 %. AKF_CIT pievienošana GELMA hidrogelam uzlaboja moduli, paaugstinot krustošanās punktu līdz 158,4 %, un tā rezultātā uzlabojās hidrogela spēja izturēt bīdes spēku izraisītu neatgriezenisku deformāciju.

Lai novērtētu iegūto hidrogelu viskoelastīgās īpašības, tiem tika veikts frekvences tests (16. (D–F) att.). Hidrogelu G' un G'' tika noteikti pie frekvences 1 Hz (16. A att.). Nešķērssaistītai GELMA G' un G'' vērtības ir ļoti zemas (attiecīgi, 0,12 Pa un G'' 0,016 Pa), kas raksturīgas mehāniski neizturīgam un viegli deformējamam materiālam. Pēc šķērssaistīšanas tās tika uzlabotas, G' sasniedzot $82,6 \pm 13$ Pa, savukārt G'' $2,28 \pm 0,5$ Pa. Pievienojot AKF_CIT, GELMA krājuma un zuduma moduļa vērtības palielinājās, G' sasniedzot $318,8 \pm 6,5$ Pa, savukārt G'' $11,3 \pm 0,23$ Pa.



16. att. Hidrogelu viskoelastīgās īpašības tika analizētas, izmantojot oscilācijas testu: (A–C) hidrogela VEA tika analizēts ar amplitūdas testu; (D–E) hidrogelu krājuma un zuduma moduļi raksturoti ar frekvences testu.

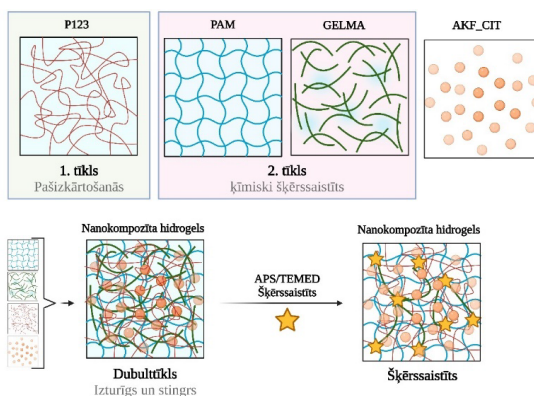
Izstrādātie VT hidrogeli tika raksturoti *in vitro*, izmantojot iekrāsošanu ar rodamīna falloidīnu un 4',6-diamidino-2-fenilindolu un *DAPI* (17. att.). Šūnu piesaistīšanās hidrogeliem tika novērota pirmajā dienā. Septītajai dienā šūnas bija vienmērīgi izklaidētas pa visu hidrogelu, apliecinot *APS/TEMED* šķērssaistīšanas paņēmiena citosaderību. Turklāt netika novērota negatīva *AKF_CIT* ietekme uz *MC3T3-E1* šūnu proliferācijas procesu.



17. att. Epifluorescences mikroskopija rodamīna-faloidīna (sarkanā krāsā) un *DAPI* (zilā krāsā) iekrāsotām *MC3T3-E1* šūnām, kas iekļautas *GELMA* un *GELMA-AKF_CIT* hidrogelos.

DUBULTTĪKLA NANOKOMPOZĪTHIDROGELI

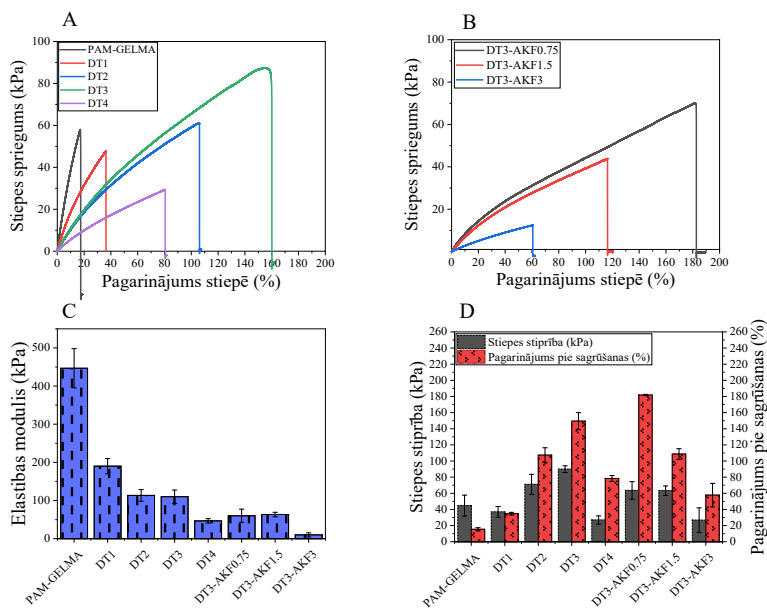
Promocijas darba autora 8. publikācijā aprakstīts dubulttīkla nanokompozīthidrogels (*DTKH*), kurā *AKF_CIT* iekļauts *P123-PAM-GELMA* matricē. Pirmais dubulttīkla hidrogela tīkls tika izveidots, izmantojot *P123*. Otrais tīkls sastāv no *PAM* un *GELMA* kopolimēriem. Otrā tīkla šķērssaistīšana tika veikta, izmantojot *APS* un *TEMED* (18. att.).



18. att. DT hidrogela iegūšana, izmantojot fizikālo un ķīmisko šķērssaistīšanu. Primāro tīklu veidoja *Pluronic P123*, savukārt sekundāro tīklu – kopolimēra sistēma, kas sastāv no poliakrilamīda-želatīna metakrilāta (*PAM-GELMA*). *AKF_CIT* izmantota kā neorganiskā pildviela hidrogelā.

Sagatavojot DT nanokompozītu hidroželus, tika izmantota sistemātiska pieeja; sākotnēji tika pētīta dažādu *P123* (2,5 %, 5 %, 7,5 % un 10 %) koncentrāciju ietekme uz *PAM-GELMA* mehāniskajām īpašībām (elastības moduli, stiepes stiprību, pagarinājumu stiepē). Starp tiem DT hidrogelam ar 7,5 w/v % *P123* koncentrāciju *PAM-GELMA* bija vislabākās mehāniskās īpašības, tādēļ tas tika izmantots arī nanokompozīta DT hidrogelu izstrādē, hidrogelā iekļaujot dažādas AKF_CIT koncentrācijas (0,75 %, 1,5 % un 3 %).

AKF_CIT saturošais DT hidrogelis ar 0,75 w/v% AKF_CIT koncentrāciju (saīsināti DT3-AFK0,75) uzrādīja visaugstvērtīgākās mehāniskās īpašības (19. att.). Šim kompozītam papildus tika izvērtētas reoloģiskās īpašības un citosaderība un salīdzināta ar tīra DT hidrogeļa (7,5 w/v% *P123-PAM-GELMA*, saīsināti DT3) īpašībām.



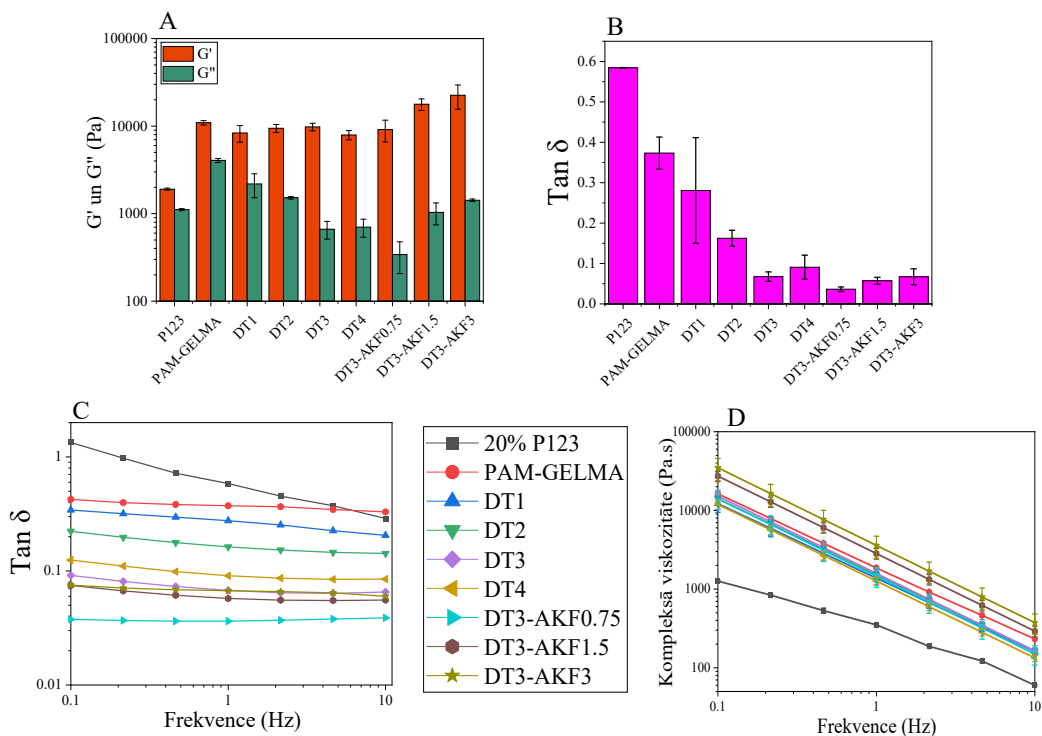
19. att. Iegūto hidrogelu stiepes sprieguma-deformācijas līkne. (A) *P123* koncentrācijas ietekme uz *PAM-GELMA* hidrogeļa pagarinājumu stiepē. (B) AKF_CIT koncentrācijas ietekme uz DT3 hidrogeļa pagarinājumu stiepē. (C) Elastības modulis, (D) stiepes izturība un pagarinājums sagraušanas brīdī (%) visiem iegūtajiem hidrogeļiem.

Visu sintezēto hidrogelu reoloģijas testi parādīja, ka to $G' > G''$, kas liecina par gelam raksturīgajām īpašībām. Lai novērtētu iegūto hidrogelu viskoelastīgās īpašības, papildus tika veikts frekvences tests (20. A att.). Hidrogelu G' un G'' tika analizēts pie frekvences 1 Hz (20. A att.). *P123* ir ļoti zemas G' un G'' vērtības (attiecīgi, $1112,3 \pm 28,5$ Pa), kas atbilst mehāniski neizturīgai, mīksta materiāla īpašībām. Savukārt *PAM-GELMA* hidrogelam ir augstas G' un G'' vērtības (attiecīgi, $10916,6 \pm 625,3$ Pa un $4058,6 \pm 213,8$ Pa), kas atbilst augstai stiprībai un trauslumam. Palielinot *PAM-GELMA* hidrogeļa *P123* saturu, G' vērtība tika ietekmēta mazāk nekā G'' vērtība. G'' samazinājums nozīmē, ka deformācijas laikā tiek izkliedēts mazāks enerģijas daudzums, kas liecina, ka hidrogelis vairāk izturas elastīgi nekā viskozi. Tādējādi, palielinoties *P123* koncentrācijai, atšķirība starp G' un G'' vērtībām liecina par elastības palielināšanos [60]. Šī parādība tika novērota līdz *P123* koncentrācijai 7,5 w/v % *PAM-GELMA*

hidrogelā (DT3). Turpinot palielināt *P123* koncentrāciju līdz 10 w/v % (DT4), G' samazināšanās izraisīja G'' palielināšanos, ietekmējot hidrogela elastību.

DT3 hidrogeliem ar zemāku AKF_CIT koncentrāciju (0,75 w/v%) G' vērtība sasniedza 9141 ± 2545 Pa, savukārt G'' $341,3 \pm 134,8$ Pa. AKF_CIT iekļaušana (0,75 w/v%) samazina G' un G'' vērtības, tomēr G' vērtības kritums ir neliels, salīdzinot ar G'' vērtības samazināšanos, kas varēja veicināt tā elastīgo īpašību uzlabošanu. AKF_CIT koncentrācijai DT3 hidrogelos pieaugot līdz 1,5 %, G' un G'' vērtība būtiski palielinājās (attiecīgi, $17766,6 \pm 2689,4$ Pa un $1034,9 \pm 290,2$ Pa), kas uzlaboja hidrogela stingrību. Palielinot AKF_CIT koncentrāciju līdz 3 w/v% G' un G'' vērtības dramatiski pieauga (attiecīgi, uz $22523,3 \pm 6950$ Pa un $1422,6 \pm 47,6$ Pa), kas varēja izraisīt kompozīta mehānisko īpašību pasliktināšanos [61], [62].

Visu sintezēto hidrogelu $\tan \delta$ analīze redzama 20. C attēlā. $\tan \delta$ ir viskoelastīga materiāla G' un G'' attiecība, ko bieži izmanto materiāla slāpēšanas īpašību raksturošanai. Tā kvantificē enerģijas daudzumu, kas izkliedēts siltuma veidā. Viskoelastīga materiāla lielāka $\tan \delta$ vērtība (tuvāka 1) liecina par lielāku enerģijas daļu, kas izkliedēta siltuma veidā, attiecībā pret elastības enerģiju. No otras puses, mazāka $\tan \delta$ vērtība liecina, ka vairāk saglabāta elastības enerģija, salīdzinot ar enerģiju, kas zaudēta siltuma veidā [47].



20. att. A) Krājuma (G') un zuduma moduļa (G'') analīze pie 1 Hz frekvences. B) $\tan \delta$ analīze pie 1 Hz frekvences. C) Visu sintezēto hidrogelu $\tan \delta$ analīze dažādās frekvencēs. D) Kompleksās viskozitātes analīze.

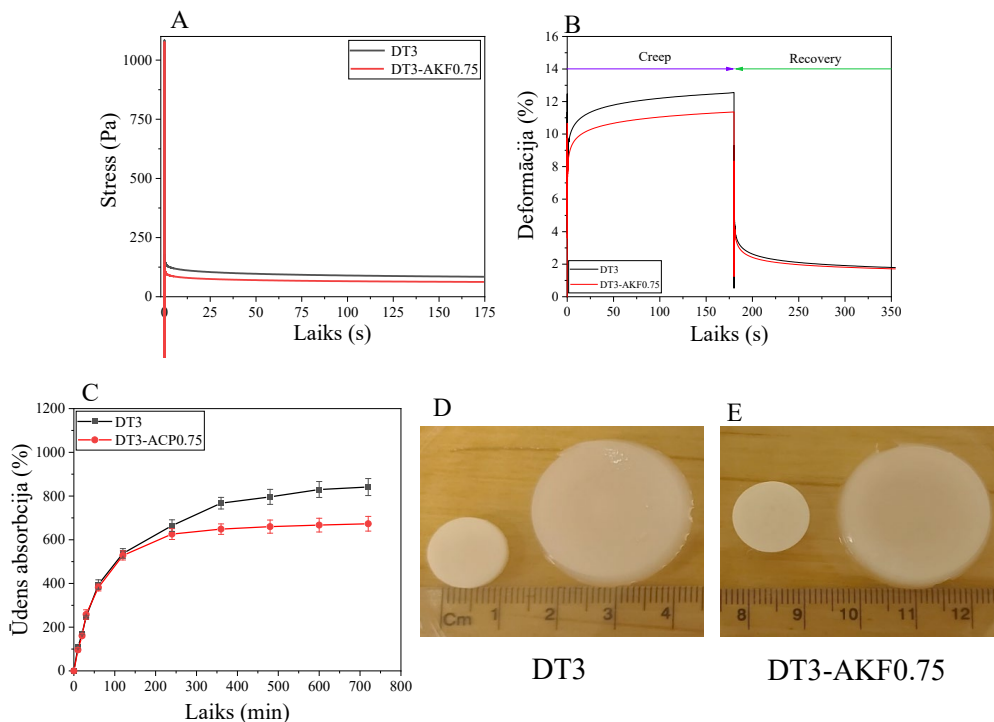
PAM-*GELMA* hidrogela tan δ vērtība bija $0,37 \pm 0,03$, analizējot pie 1 Hz frekvences (20. D att.). Palielinoties *PI23* koncentrācijai PAM-*GELMA* hidrogelos, tan δ vērtības pieaug uz attiecīgi $0,28 \pm 0,13$ DT1, $0,16 \pm 0,01$ DT2, $0,067 \pm 0,01$ DT3 un $0,09 \pm 0,02$ DT4 hidrogelam. Šī analīze liecināja, ka tan δ vērtības samazinājās, līdz *PI23* koncentrācija bija 7,5 w/v% PAM-*GELMA* (DT3), ko var attiecināt uz palielinātu elastību [65]. Ja *PI23* koncentrācija tika palielināta līdz 10 w/v% PAM-*GELMA* (DT4), slāpēšanas vērtība palielinājās, samazinot elastību.

Nanokompozīthidrogelos tan δ vērtības bija $0,036 \pm 0,05$ DT3-AKF0.75, $0,057 \pm 0,008$ DT3-AKF1.5 un $0,067 \pm 0,02$ (DT3-AKF3). DT3-AKF0.75 tan δ vērtība bija viszemākā, ko var attiecināt uz visaugstāko elastību. Palielinot AKF_CIT koncentrāciju DT3 hidrogelos līdz 1,5 m/v % (DT3-AKF1.5) un 3 m/v % (DT3-AKF3), palielinās tan δ vērtība, ko var attiecināt uz slāpēšanas īpašību samazināšanos. Palielinoties AKF_CIT koncentrācijai, sāk pieaugt tan δ vērtība, kas var ietekmēt šķērssaistīšanās blīvumu un polimēru ķēžu mobilitāti hidrogelā, tādējādi ietekmējot hidrogela kopējās mehāniskās īpašības.

Visu sintezēto hidrogelu kompleksā viskozitāte samazinājās, palielinoties frekvencei. Kompleksas viskozitātes variācijas tika novērotas pie dažādām *PI23* un AKF_CIT koncentrācijām PAM-*GELMA* hidrogelā [63]. Kā redzams 20. D attēlā, *PI23* koncentrācijas palielināšanās PAM-*GELMA* hidrogelā izraisa ievērojamu kompleksās viskozitātes samazināšanos.

Stiepes testu rezultāti korelē ar oscilācijas bīdes testiem, kas liecina par to, ka *PI23* uzlabo PAM-*GELMA* hidrogelu elastību un mehāniskās īpašības. Tomēr *PI23* ietekme ir atkarīga no koncentrācijas. Arī AKF_CIT ietekme uz hidrogela īpašībām ir atkarīga no tā koncentrācijas hidrogelā. Pie noteiktas AKF_CIT koncentrācijas novērotā hidrogela elastības pastiprināšanās varētu būt saistīta ar AKF_CIT esošā citrāta pseidošķērssaistīšanos ar *GELMA*. Tomēr, lai apstiprinātu citrāta-*GELMA* mijiedarbību, ir nepieciešamas izvērstākas analīzes. DT3 un nanokompozītmateriāla DT3-AKF0.75 hidrogelam ir augstvērtīgākās mehāniskās īpašības. Tāpēc šiem diviem hidrogeliem tika veiktas papildu analīzes.

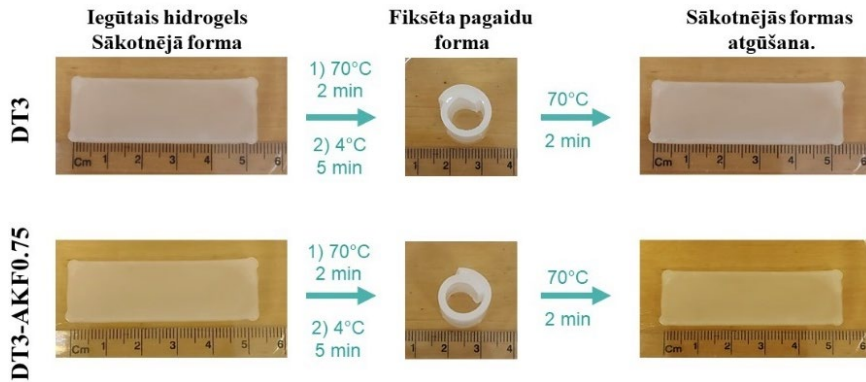
Materiāla plūstamības (*creep*) un atjaunošanās īpašības palīdz izprast viskoelastīga materiāla polimēru ķēžu mijiedarbību, kas savukārt palīdz analizēt hidrogela deformācijas mehānismu. Lai novērtētu DT3 hidrogela un DT3-AKF0.75 nanokompozīta polimēru ķēžu mijiedarbības izmaiņas, tika veikta to plūstamības un atjaunošanās analīze (21. A att.). AKF_CIT iekļaušanai DT3 hidrogelā (DT3-AKF0.75) ir pozitīva ietekme uz plūstamības sprieguma samazināšanu. Tas var būt saistīts ar polimēru ķēžu kustīguma samazināšanos AKF_CIT nanodaļiņu pievienošanas rezultātā [64]. Sprieguma relaksācijas līknes redzamas 21. B attēlā. DT3 hidrogelam un DT3-AKF0.75 nanokompozītam raksturīga strauja sprieguma relaksēšana.



21. att. Šķīdēs-atjaunošanās analīze (A), sprieguma relaksācija (B), uzbriešanas spēja C), kā arī žāvētu un uzbriedušu DT3 un DT3-AKF0.75 hidrogelu fotogrāfijas (D un E).

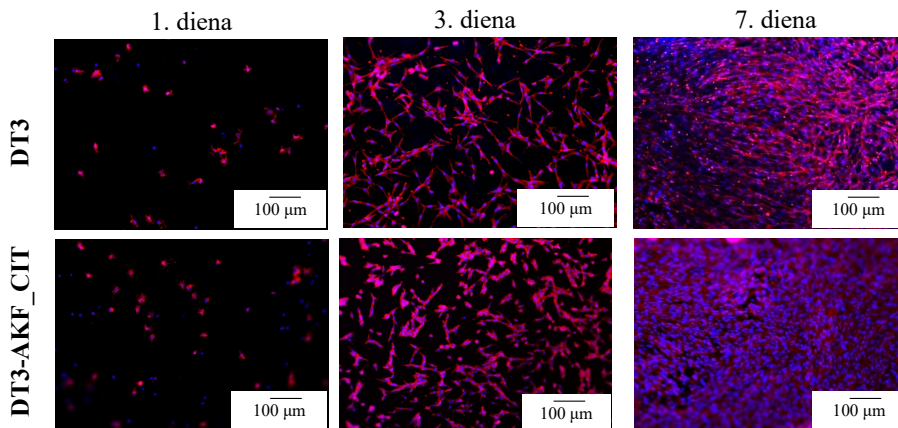
DT3 hidrogela un DT3-AKF0.75 uzbriešanas spēja redzama 21. C attēlā. Gan DT3, gan DT3-AKF0.75 izmērs uzbriešanas rezultātā pieaug divas reizes (21. D un E att.). AKF_CIT pievienošana DT3 hidrogelam ietekmē uzbriešanas kinētiku. DT3-AKF0.75 hidrogelu uzbriešanas spējas samazināšanos var izraisīt tas, ka brīvās polimēru ķēdes kustīgumu kavē AKF_CIT klātbūtnē [65].

Formas atmiņas hidrogeliem ir divu veidu šķērssaites. Pirmais tīkls ir kovalenti šķērssaitīts, kas ir būtiski hidrogela struktūras integritātes saglabāšanai. Otrais tīkls ir atgriezeniski fizikāli šķērssaitīts un atbild par pagaidu formas fiksēšanu. Pētītais hidrogels PAM-GELMA veido kovalenti šķērssaitītu tīklu [66]. Termojuīgais *PI23* augstā temperatūrā (70 °C) veido atgriezeniski šķērssaitītu tīklu, ierosinot formas maiņu, ja hidrogels tiek pakļauts 4 °C temperatūrai, tādējādi nodrošinot formas atmiņu un formas atjaunošanās īpašības, kā redzams 22. attēlā.



22. att. Temperatūras izraisīts DT3 un DT3-AKF0.75 hidrogelu formas atmiņas efekts

Iegūtā hidrogela un nanokopozīta *in vitro* analīze veikta, izmantojot iekrāsošanu ar rodamīna faloidīnu un *DAPI* (23. att.). Šūnu piesaiste hidrogelam un nanokompozītam tika novērota pirmajā dienā. Trešajā dienā šūnas bija vienmērīgi izplatījās gan pa hidrogelu, gan nanokompozītu. Gan hidrogels, gan nanokompozīts septītajā dienā bija blīvi noklāts ar šūnām, apliecinot iegūtā DT3 un DT3-AKF0.75 citosaderību.



23. att. Epifluorescences mikroskopija rodamīna-faloidīna (sarkanā krāsā) un *DAPI* (zilā krāsā) iekrāsotām *MC3T3-E1* šūnām, kas iekļautas DT3 un NC1DT3 hidrogelos.

SECINĀJUMI

1. Negatīvā lādiņa atšķirības MOM sānu grupās ietekmē MOM mijiedarbību ar AKF, ietekmējot AKF īpašības.
2. Šķīduma mediētas AKF transformācijas kinētiku uz Ap ietekmē šķīduma vides sastāvs. Neskatoties uz to, MOM saturošu AKF transformācijas uz Ap secība dažādu šķīdumu vidēs nemainās: AKF_ACE >> *tīrs* AKF = AKF_ITN = AKF_GLU >> AKF_ASK > AKF_CIT. *FBS* vidē visi sintezētie AKF ātrāk transformējās uz Ap, salīdzinot ar dejonizēta ūdens vidi. *FBS* esošie fosfātu joni nodrošina papildu vietas kalcija jonu saistīšanai, paātrinot AKF transformāciju uz Ap. Transformācija α -MEM vidē ir lēnāka nekā *FBS*, kas saistāma ar tā salīdzinoši zemo fosfātu jonu koncentrāciju.
3. Citrātu un acetātu saturoša AKF pievienošana (1 %) *ADA-GEL* hidrogelam palielina gan tā krājuma, gan zuduma moduli (AKF_CIT saturošam *ADA-GEL* $G' = 142,6 \pm 14,1$ Pa un $G'' = 7,6 \pm 1,2$ Pa, AKF_ACE saturošam *ADA-GEL* $G' = 134,9 \pm 16,5$ Pa un $G'' = 6,5 \pm 0,5$ Pa, savukārt *ADA-GEL* hidrogelam $G' = 99,2 \pm 9,3$ Pa un $G'' = 9 \pm 1,1$ Pa). Palielinātais krājuma un zuduma modulis uzlabo izdrukāto konstrukciju strukturālo integritāti. Šis uzlabojums saistāms ar papildu kalcija joniem, ko AKF nodrošina *ADA* šķērssaistīšanai.
4. *GELMA* hidrogela krājuma G' un zuduma G'' moduļu vērtības (attiecīgi, $82,6 \pm 13$ Pa un $2,28 \pm 0,5$ Pa) var būtiski uzlabot, hidrogelam pievienojot 2 % citrātu saturoša AKF. Tā rezultātā *GELMA* hidrogela G' sasniedza $318,8 \pm 6,5$ Pa, savukārt G'' $11,3 \pm 0,23$ Pa.
5. AKF_CIT ietekme uz DT3 hidrogela mehāniskajām īpašībām ir atkarīga no tā koncentrācijas hidrogelā. Pievienojot 0,75 w/v % AKF_CIT, tiek palielināta DT3 hidrogela elastība, kas saistāms ar polimēru ķēžu mijiedarbības samazināšanos AKF_CIT ietekmes rezultātā. Pieaugot AKF_CIT koncentrācijai, G' un G'' vērtības būtiski palielinās, padarot hidrogelu stingrāku un ietekmējot tā mehāniskās īpašības.

IZMANTOTĀ LITERĀTŪRA

- [1] J. M. Grasman, M. J. Zayas, R. L. Page, and G. D. Pins, "Biomimetic Scaffolds for Regeneration of Volumetric Muscle Loss in Skeletal Muscle Injuries," *Acta Biomater.*, vol. 25, p. 2, Oct. 2015, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2015.07.038.
- [2] "Musculoskeletal health." Accessed: Dec. 13, 2023. [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/musculoskeletal-conditions>
- [3] A. R. Amini, C. T. Laurencin, and S. P. Nukavarapu, "Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges," *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 40, no. 5, p. 363, 2012, doi: 10.1615/CRITREVBIOEDENG.V40.I5.10.
- [4] A. H. Schmidt, "Autologous bone graft: Is it still the gold standard?," *Injury*, vol. 52, pp. S18–S22, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.INJURY.2021.01.043.
- [5] O. Petrauskaite *et al.*, "Biomimetic mineralization on a macroporous cellulose-based matrix for bone regeneration," *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/452750.
- [6] A. L. Lehninger, "Mitochondria and Calcium Ion Transport THE FIFTH JUBILEE LECTURE," *Biochem. J.*, vol. 119, no. 2, pp. 129–138, 1970.
- [7] J. H. Bradt, M. Mertig, A. Teresiak, and W. Pompe, "Biomimetic Mineralization of Collagen by Combined Fibril Assembly and Calcium Phosphate Formation," *Chem. Mater.*, vol. 11, no. 10, pp. 2694–2701, 1999, doi: 10.1021/CM991002P.
- [8] A. G. Walton, B. A. Friedman, and A. Schwartz, "Nucleation and mineralization of organic matrices," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 1, no. 3, pp. 337–354, Sep. 1967, doi: 10.1002/JBM.820010305.
- [9] "Biomedical Applications of Inorganic Materials," *Biomed. Appl. Inorg. Mater.*, Dec. 2021, doi: 10.1039/9781788019293.
- [10] C. Drouet, "Apatite formation: Why it may not work as planned, and how to conclusively identify apatite compounds," *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/490946.
- [11] A. Indurkar, R. Choudhary, K. Rubenis, and J. Locs, "Advances in Sintering Techniques for Calcium Phosphates Ceramics," *Mater. 2021, Vol. 14, Page 6133*, vol. 14, no. 20, p. 6133, Oct. 2021, doi: 10.3390/MA14206133.
- [12] H. C. W. Skinner and H. Ehrlich, "Biomineralization," *Treatise Geochemistry Second Ed.*, vol. 10, pp. 105–162, Jan. 2014, doi: 10.1016/B978-0-08-095975-7.00804-4.
- [13] I. Cacciotti, "Cationic and anionic substitutions in hydroxyapatite," *Handb. Bioceram. Biocomposites*, pp. 145–211, Jan. 2016, doi: 10.1007/978-3-319-12460-5_7/FIGURES/6.
- [14] A. Lotsari, A. K. Rajasekharan, M. Halvarsson, and M. Andersson, "Transformation of amorphous calcium phosphate to bone-like apatite," *Nat. Commun. 2018 91*, vol. 9, no. 1, pp. 1–11, Oct. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-06570-x.
- [15] A. Indurkar, R. Choudhary, K. Rubenis, and J. Locs, "Role of carboxylic organic molecules in interfibrillar collagen mineralization," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 11, p. 439, Apr. 2023, doi: 10.3389/FBIOE.2023.1150037.
- [16] W. J. Landis, F. H. Silver, and J. W. Freeman, "Collagen as a scaffold for biomimetic mineralization of vertebrate tissues," *J. Mater. Chem.*, vol. 16, no. 16, pp. 1495–1503, 2006, doi: 10.1039/B505706J.
- [17] W. J. Landis and F. H. Silver, "Mineral Deposition in the Extracellular Matrices of Vertebrate Tissues: Identification of Possible Apatite Nucleation Sites on Type I Collagen," *Cells. Tissues. Organs*, vol. 189, no. 1–4, p. 20, Dec. 2008, doi: 10.1159/000151454.
- [18] Y. K. Kim *et al.*, "Mineralisation of reconstituted collagen using polyvinylphosphonic acid/polyacrylic acid templating matrix protein analogues in the presence of calcium, phosphate and hydroxyl ions," *Biomaterials*, vol. 31, no. 25, p. 6618, Sep. 2010, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.04.060.
- [19] A. Pouikli *et al.*, "Chromatin remodeling due to degradation of citrate carrier impairs osteogenesis of aged mesenchymal stem cells," *Nat. Aging 2021 19*, vol. 1, no. 9, pp. 810–825, Sep. 2021, doi: 10.1038/s43587-021-00105-8.

- [20] Y. Wang *et al.*, “Aging Relevant Metabolite Itaconate Inhibits Inflammatory Bone Loss,” *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 13, Jul. 2022, doi: 10.3389/FENDO.2022.885879/FULL.
- [21] K. S. Brakspear and D. J. Mason, “Glutamate signaling in bone,” *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 3, no. AUG, 2012, doi: 10.3389/FENDO.2012.00097.
- [22] O. Polat, S. S. Kilicoglu, and E. Erdemli, “A controlled trial of glutamine effects on bone healing,” *Adv. Ther.*, vol. 24, no. 1, pp. 154–160, May 2007, doi: 10.1007/BF02850003.
- [23] F. Dickens, “The citric acid content of animal tissues, with reference to its occurrence in bone and tumour,” *Biochem. J.*, vol. 35, no. 8–9, pp. 1011–1023, Sep. 1941, doi: 10.1042/BJ0351011.
- [24] D. Granchi, N. Baldini, F. M. Ulivieri, and R. Caudarella, “Role of Citrate in Pathophysiology and Medical Management of Bone Diseases,” *Nutrients*, vol. 11, no. 11, 2019, doi: 10.3390/NU11112576.
- [25] E. Davies *et al.*, “Citrate bridges between mineral platelets in bone,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 14, 2014, doi: 10.1073/PNAS.1315080111/-DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201315080SI.PDF.
- [26] B. Xie and G. H. Nancollas, “How to control the size and morphology of apatite nanocrystals in bone,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 52, p. 22369, Dec. 2010, doi: 10.1073/PNAS.1017493108.
- [27] S. Murad, D. Grove, K. A. Lindberg, G. Reynolds, A. Sivarajah, and S. R. Pinnell, “Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 78, no. 5, p. 2879, 1981, doi: 10.1073/PNAS.78.5.2879.
- [28] D. Gunson, K. E. Gropp, and A. Varela, “Bone and Joints,” *Haschek Rousseaux’s Handb. Toxicol. Pathol. Third Ed. Vol. 1-3*, vol. 1–3, pp. 2761–2858, Jan. 2013, doi: 10.1016/B978-0-12-415759-0.00063-7.
- [29] R. Thaler *et al.*, “Vitamin C epigenetically controls osteogenesis and bone mineralization,” *Nat. Commun.* 2022 131, vol. 13, no. 1, pp. 1–18, Oct. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-32915-8.
- [30] P. Aghajanian, S. Hall, M. D. Wongworawat, and S. Mohan, “The Roles and Mechanisms of Actions of Vitamin C in Bone: New Developments,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 30, no. 11, p. 1945, Nov. 2015, doi: 10.1002/JBMR.2709.
- [31] C. Combes and C. Rey, “Amorphous calcium phosphates: synthesis, properties and uses in biomaterials,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 9, pp. 3362–3378, 2010, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2010.02.017.
- [32] A. L. Boskey and A. S. Posner, “Conversion of amorphous calcium phosphate to microcrystalline hydroxyapatite. A pH-dependent, solution-mediated, solid-solid conversion,” *J. Phys. Chem.*, vol. 77, no. 19, pp. 2313–2317, 1973, doi: 10.1021/J100638A011/SUPPL_FILE/J100638A011_SI_001.PDF.
- [33] L. N. Niu *et al.*, “Biomimetic remineralization of dentin,” *Dent. Mater.*, vol. 30, no. 1, pp. 77–96, Jan. 2014, doi: 10.1016/J.DENTAL.2013.07.013.
- [34] A. J. Hoehner, S. T. Mergelsberg, O. J. Borkiewicz, and F. M. Michel, “Impacts of Initial Ca/P on Amorphous Calcium Phosphate,” 2023, doi: 10.1021/acs.cgd.1c00058.
- [35] M. Iafisco *et al.*, “Fluoride-doped amorphous calcium phosphate nanoparticles as a promising biomimetic material for dental remineralization,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/S41598-018-35258-X.
- [36] J. M. Ten Cate and J. D. B. Featherstone, “Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel,” *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, vol. 2, no. 3, pp. 283–296, 1991, doi: 10.1177/10454411910020030101.
- [37] K. Chatzipanagis *et al.*, “Crystallization of citrate-stabilized amorphous calcium phosphate to nanocrystalline apatite: a surface-mediated transformation,” *CrystEngComm*, vol. 18, no. 18, pp. 3170–3173, May 2016, doi: 10.1039/C6CE00521G.
- [38] S. Dominguez-Medina, S. McDonough, P. Swanglap, C. F. Landes, and S. Link, “In situ measurement of bovine serum albumin interaction with gold nanospheres,” *Langmuir*, vol. 28, no. 24, pp. 9131–9139, Jun. 2012, doi: 10.1021/LA3005213.
- [39] G. P. Szekeres and J. Kneipp, “Different binding sites of serum albumins in the protein corona of gold nanoparticles,” *Analyst*, vol. 143, no. 24, pp. 6061–6068, Dec. 2018, doi: 10.1039/C8AN01321G.

- [40] D. Schubert and D. Piasecki, "Oxidative Glutamate Toxicity Can Be a Component of the Excitotoxicity Cascade," *J. Neurosci.*, vol. 21, no. 19, p. 7455, Oct. 2001, doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-19-07455.2001.
- [41] A. A. Kritis, E. G. Stamoula, K. A. Paniskaki, and T. D. Vavilis, "Researching glutamate – induced cytotoxicity in different cell lines: A comparative/collective analysis/study," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 9, p. 131867, Mar. 2015, doi: 10.3389/FNCEL.2015.00091/BIBTEX.
- [42] P. W. Hwang and J. A. Horton, "Variable osteogenic performance of MC3T3-E1 subclones impacts their utility as models of osteoblast biology," *Sci. Reports 2019 91*, vol. 9, no. 1, pp. 1–9, Jun. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-44575-8.
- [43] S. N. Hadzir *et al.*, "Ascorbic acid induces osteoblast differentiation of human suspension mononuclear cells," *Cytotherapy*, vol. 16, no. 5, pp. 674–682, May 2014, doi: 10.1016/J.JCYT.2013.07.013.
- [44] T. Fukunishi, T. Shoji, and T. Shinoka, "Nanofiber composites in vascular tissue engineering," *Nanofiber Compos. Biomed. Appl.*, pp. 455–481, Jan. 2017, doi: 10.1016/B978-0-08-100173-8.00018-1.
- [45] M. B. Łabowska, K. Cierluk, A. M. Jankowska, J. Kulbacka, J. Detyna, and I. Michalak, "A Review on the Adaption of Alginate-Gelatin Hydrogels for 3D Cultures and Bioprinting," *Materials (Basel)*, vol. 14, no. 4, pp. 1–28, Feb. 2021, doi: 10.3390/MA14040858.
- [46] S. Heid *et al.*, "Bioprinting with bioactive alginate dialdehyde-gelatin (ADA-GEL) composite bioinks: Time-dependent in-situ crosslinking via addition of calcium-silicate particles tunes in vitro stability of 3D bioprinted constructs," *Bioprinting*, vol. 26, p. e00200, Jun. 2022, doi: 10.1016/J.BPRINT.2022.E00200.
- [47] A. Indurkar, P. Bangde, M. Gore, P. Reddy, R. Jain, and P. Dandekar, "Optimization of guar gum-gelatin bioink for 3D printing of mammalian cells," *Bioprinting*, vol. 20, p. e00101, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.BPRINT.2020.E00101.
- [48] H. Jongprasitkul, S. Turunen, V. S. Parihar, and M. Kellomäki, "Two-step crosslinking to enhance the printability of methacrylated gellan gum biomaterial ink for extrusion-based 3D bioprinting," *Bioprinting*, vol. 25, Mar. 2022, doi: 10.1016/J.BPRINT.2021.E00185.
- [49] S. Kyle, Z. M. Jessop, A. Al-Sabah, and I. S. Whitaker, "'Printability' of Candidate Biomaterials for Extrusion Based 3D Printing: State-of-the-Art," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 6, no. 16, Aug. 2017, doi: 10.1002/ADHM.201700264.
- [50] L. Ouyang, "3D Bioprinting of Thermal-Sensitive Bioink," pp. 63–80, 2019, doi: 10.1007/978-981-13-9455-3_5.
- [51] W. Rasband, "ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA," 2011.
- [52] X. Niu, S. Chen, F. Tian, L. Wang, Q. Feng, and Y. Fan, "Hydrolytic conversion of amorphous calcium phosphate into apatite accompanied by sustained calcium and orthophosphate ions release," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 70, pp. 1120–1124, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.MSEC.2016.04.095.
- [53] X. Niu *et al.*, "Sustained delivery of calcium and orthophosphate ions from amorphous calcium phosphate and poly(L-lactic acid)-based electrospinning nanofibrous scaffold," *Sci. Reports 2017 71*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, Mar. 2017, doi: 10.1038/srep45655.
- [54] Y. Cai, S. Y. Chang, S. W. Gan, S. Ma, W. F. Lu, and C. C. Yen, "Nanocomposite bioinks for 3D bioprinting," *Acta Biomater.*, vol. 151, pp. 45–69, Oct. 2022, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2022.08.014.
- [55] M. Inoue, M. Sasaki, A. Nakasu, M. Takayanagi, and T. Taguchi, "An antithrombogenic citric acid-crosslinked gelatin with endothelialization activity," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 1, no. 5, pp. 573–581, Sep. 2012, doi: 10.1002/ADHM.201200001.
- [56] S. Bupphathong, C. Quiroz, W. Huang, P. F. Chung, H. Y. Tao, and C. H. Lin, "Gelatin Methacrylate Hydrogel for Tissue Engineering Applications—A Review on Material Modifications," *Pharmaceuticals*, vol. 15, no. 2, Feb. 2022, doi: 10.3390/PH15020171.
- [57] J. Zhang *et al.*, "Injectable In Situ Photocrosslinked Hydrogel Dressing for Infected Wound Healing," *ACS Appl. Bio Mater.*, vol. 6, no. 5, pp. 1992–2002, May 2023, doi: 10.1021/ACSABM.3C00205/SUPPL_FILE/MT3C00205_SI_001.PDF.

- [58] Q. Ma, Y. Zhang, V. Launay, M. Le Dot, S. Liu, and J. Lalevée, “How to overcome the light penetration issue in photopolymerization? An example for the preparation of high content iron-containing opaque composites and application in 3D printing,” *Eur. Polym. J.*, vol. 165, p. 111011, Feb. 2022, doi: 10.1016/J.EURPOLYMJ.2022.111011.
- [59] Y. Stuart, F. Lauren, and A. Brian, “A mechanically robust injectable hydrogel scaffold for adipose-derived stem cell delivery for the treatment of peripheral arterial disease,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 4, 2016, doi: 10.3389/CONF.FBIOE.2016.01.00861/EVENT_ABSTRACT.
- [60] H. Chen, S. Hou, H. Ma, X. Li, and Y. Tan, “Controlled gelation kinetics of cucurbit[7]uril-adamantane cross-linked supramolecular hydrogels with competing guest molecules,” *Sci. Reports 2016 61*, vol. 6, no. 1, pp. 1–10, Feb. 2016, doi: 10.1038/srep20722.
- [61] J. Zaragoza, S. Fukuoka, M. Kraus, J. Thomin, and P. Asuri, “Exploring the Role of Nanoparticles in Enhancing Mechanical Properties of Hydrogel Nanocomposites,” *Nanomater. 2018, Vol. 8, Page 882*, vol. 8, no. 11, p. 882, Oct. 2018, doi: 10.3390/NANO8110882.
- [62] M. Levin, A. Sonn-Segev, and Y. Roichman, “Structural changes in nanoparticle-hydrogel composites at very low filler concentrations,” *J. Chem. Phys.*, vol. 150, no. 6, Feb. 2019, doi: 10.1063/1.5053171/198966.
- [63] G. Kaya and F. Oytun, “Rheological properties of Injectable hyaluronic acid hydrogels for soft tissue engineering applications,” *Biointerface Res. Appl. Chem.*, vol. 11, no. 1, pp. 8424–8430, 2021, doi: 10.33263/BRIAC111.84248430.
- [64] S. Shojaei, M. Nikuei, V. Goodarzi, M. Hakani, H. A. Khonakdar, and M. R. Saeb, “Disclosing the role of surface and bulk erosion on the viscoelastic behavior of biodegradable poly(ϵ -caprolactone)/poly(lactic acid)/hydroxyapatite nanocomposites,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 136, no. 10, p. 47151, Mar. 2019, doi: 10.1002/APP.47151.
- [65] B. Y. S. Kumar, A. M. Isloor, G. C. M. Kumar, Inamuddin, and A. M. Asiri, “Nanohydroxyapatite Reinforced Chitosan Composite Hydrogel with Tunable Mechanical and Biological Properties for Cartilage Regeneration,” *Sci. Reports 2019 91*, vol. 9, no. 1, pp. 1–13, Nov. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-52042-7.
- [66] B. Maiti *et al.*, “Thermoresponsive Shape-Memory Hydrogel Actuators Made by Phototriggered Click Chemistry,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 30, no. 24, p. 2001683, Jun. 2020, doi: 10.1002/ADFM.202001683.



Abhishek Rajesh Indurkar dzimis 1994. gadā Busavalā (Indija). Ieguvis bakalaura grādu biotehnoloģiju inženierijā (2017) un maģistra grādu farmācijas biotehnoloģijā (2019). 2020. gadā sācis doktora studijas Rīgas Tehniskajā universitātē (RTU), promocijas darbu izstrādājot Baltijas Biomateriālu ekselences centrā profesora Jāņa Loča un vadošā pētnieka Kristapa Rubeņa vadībā. Paralēli studijām doktorantūrā strādājis norīkojumā Fridriha Aleksandra Erlangenas-Nirnbergas universitātē (Vācija) profesora Aldo R. Bokačīni (*Aldo R. Boccaccini*) vadībā. Zinātniskās intereses saistītas ar biodrukāšanu, biotintes preparātiem un nanokompozītu materiālu izstrādi, lai radītu mākslīgos audus un cilvēka orgānus.