

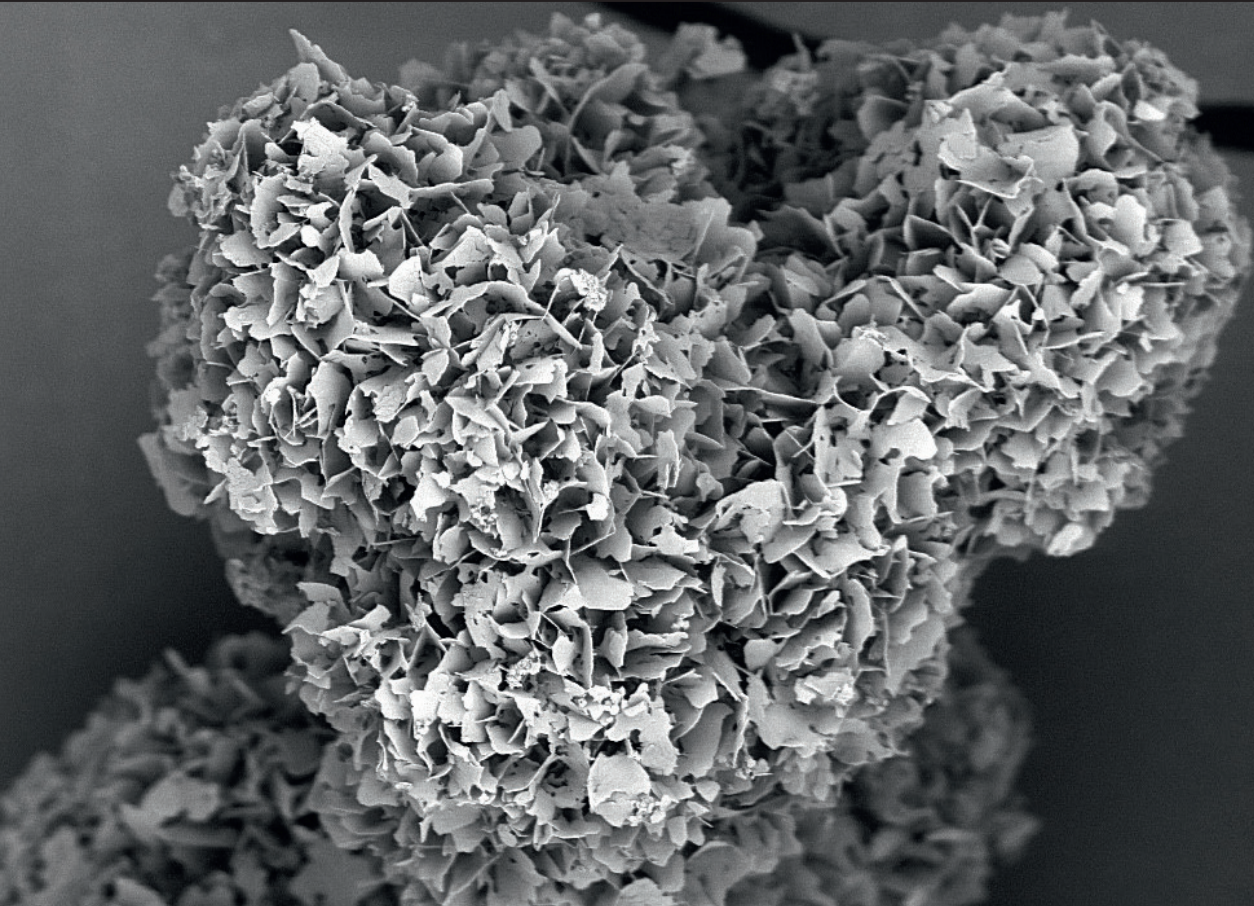


RĪGAS TEHNISKĀ
UNIVERSITĀTE

Ilijana Kovriļa

BIOMATERIĀLI UZ OKTAKALCIJA FOSFĀTA BĀZES: IEGŪŠANA, MODIFIKĀCIJA UN PIELIETOJUMS

Promocijas darba kopsavilkums



RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE

Dabaszinātņu un tehnoloģiju fakultāte
Biomateriālu un bioinženierijas institūts

ILIJANA KOVRLIJA

Doktora studiju programmas “Ķīmija, materiālzinātne un tehnoloģijas” doktorante

BIOMATERIĀLI UZ OKTAKALCIJA FOSFĀTA BĀZES: IEGŪŠANA, MODIFIKĀCIJA UN PIELIETOJUMS

Promocijas darba kopsavilkums

Zinātniskie vadītāji
profesore *Dr. sc. ing.* DAGNIJA LOČA
professors *Dr. sc. ing.* JĀNIS LOČS

RTU Izdevniecība
Rīga 2024

Kovrlija, I. Biomateriāli uz oktakalcija fosfāta bāzes: iegūšana, modifikācija un pielietojums. Promocijas darba kopsavilkums. Rīga: RTU Izdevniecība, 2024. 42 lpp.

Publicēts saskaņā ar promocijas padomes “RTU P-02” 2024. gada 5. jūnija lēmumu, protokols Nr. 04030-9.2.2/4.

Promocijas darbs izstrādāts Eiropas Savienības Apvārsnis 2020 projektā “Precīzijas medicīna muskuloskeletālai reģenerācijai, protezēšanai un aktīvām vecumdienām” [Nr. 860462, *PREMUROSA*], “Baltijas Biomateriālu ekselences centrs” [Nr. 857287, *BBCE*] un “Jauno pētnieku un pētniecības pārvaldības konkurētspējas paaugstināšana Latvijā” [Nr. 952347, *RISEus2*].



PREMUROSA



BBCE



Vāka attēla autore Ilijana Kovrlija

<https://doi.org/10.7250/9789934371059>

ISBN 978-9934-37-105-9 (pdf)

PROMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS ZINĀTNES DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ

Promocijas darbs zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2024. gada 6. septembrī plkst. 14 Rīgas Tehniskās universitātes Dabaszinātņu un tehnoloģiju fakultātē, Paula Valdena ielā 3, 272. auditorijā.

OFICIĀLIE RECENZENTI

Docente *Dr. sc. ing.* Agnese Brangule,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Profesors *Dr. chem.* Māris Turks,
Rīgas Tehniskā universitāte

Asociētā profesore *Dr. Sabine van Rijt*,
Institute for Technology-Inspired Regenerative Medicine (*MERLN*), Nīderlande

APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājusi 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.

Ilijana Kovriļa (paraksts)

Datums: 06.09.2024.

Promocijas darbs sagatavots kā tematiski vienota zinātnisko publikāciju kopa. Tajā ir kopsavilkums latviešu un angļu valodā un piecas *SCI* publikācijas. Publikācijas uzrakstītas angļu valodā, to kopējais apjoms ir 84 lpp.

ANOTĀCIJA

Promocijas darba izstrādes gaitā optimizēta oktakalcija fosfāta (OCP) sintēzes metodoloģija un mērogošana, kā izejvielu izmantojot zemitemperatūras α -trikalcijs fosfātu (α -TCP), kā arī izveidots visaptverošs iegūtā OCP analīzes profils. Izmantojot fizikāli ķīmiskās analīzes datus, tika izveidots *in silico* modelis, kas spēj identificēt OCP iegūšanas stadijas un starpproduktus. Iegūtais OCP tika izmantots divos veidos – kā doksorubicīna hidrohlorīda (DOX) zāļu piegādes sistēma un kā aizsargpārklājums pret koroziju titāna implantiem. Doksorubicīna-oktakalcija fosfāta (DOX-OCP) zāļu piegādes sistēmas ietekme uz MG63 (vēža šūnām) un MC3T3-E1 (preosteoblastu šūnām) novērtēta *in vitro* pētījumos, kā arī pētīta aktīvās vielas izdalīšanās kinētika. Izveidotajiem nātrija algināta/oktakalcija fosfāta (Alg/OCP) kompozītpārklājumiem novērtēta to elektroķīmiskā uzvedība titāna sakausējumos iekaisuma apstākļos.

Promocijas darbs uzrakstīts kā vienota zinātnisko publikāciju kopa ar kopsavilkumu latviešu un angļu valodā, kurā secīgi apkopoti dati par piecām *SCI* publikācijām. Kopsavilkums ietver 15 attēlus un vienu tabulu, tam seko pieci pielikumi, kopumā veidojot 173 lappuses, ieskaitot elektroniski pieejamo papildu informāciju.

SATURS

PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS.....	9
Ievads un literatūras apskats.....	9
Mērķis un uzdevumi.....	12
Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes.....	12
Zinātniskā novitāte.....	12
Praktiskā nozīme.....	12
Publikācijas un promocijas darba aprobācija.....	14
PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI.....	17
OCP sintēzes metodoloģijas optimizācija.....	17
Zemtemperatūras α -TCP hidrolīze līdz OCP.....	17
OCP sintēzes mērogošana, fāzes veidošanās kinētikas pētījumi un sintēzes attīstības gaitas (LT- α -TCP =>OCP) <i>in silico</i> modeļa izveide.....	21
OCP pielietojuma potenciāls.....	27
Oktakalcija fosfāts un doksorubicīna hidrohlorīds. Jauna zāļu piegādes sistēma vēža ārstēšanai.....	27
OCP saturoši hidroģēla pārklājumi metāla implantu pretkorozijas noturības uzlabošanai.....	33
SECINĀJUMI.....	36
ATSAUCES.....	37

PATEICĪBA

Pirmkārt, vēlos pateikties par iespēju piedalīties *PREMUROSA*, *BBCE* un *RISEus2* projektos, kas finansēja manu promocijas darbu un ļāva apmeklēt visus lieliskos institūtus, zinātniskās konferences un tīklošanās pasākumus.

Ir daudz detaļu un pieredzes, kas man bija svarīgas pēdējo četru gadu laikā, šeit minēšu tikai dažas no vissvarīgākajām.

Vispirms – paldies profesoriem Dagnijai un Jānim Ločiem, kuri bija man līdzās ne tikai kā darba vadītāji, bet arī kā draugi un atbalsts, kad vien tas bija nepieciešams! Vēlos pateikties par miljoniem “ātro jautājumu”, par daudzajiem apgūtajiem zinātniskajiem faktiem, par iespēju parādīt, ko es varu sasniegt, par uzticēšanos man, par daudzajām tikšanās reizēm un, pats galvenais, par to, ka parādījāt man, kas ir īsts mentors.

Vēlos pateikties savai ģimenei – mammai, tētim, Dankai, Savai, Danai un Vasilije – par jūsu beznosacījumu atbalstu, lai iestātos doktorantūrā, un par visu pirms studijām un studiju laikā, bez kura nekas no paveiktā nebūtu iespējams. Paldies manām labākajām draudzenēm Majai, Isidorai, Majai un Dakai, kuras vienmēr bija blakus ar savu atbalstu un sapratni! Milicai – par garajām sarunu stundām par visām jaunajām lietām, kultūrām un darba izaicinājumiem! Unai un Kīcai – par vislabāko un vissvarīgāko kompāniju, ko es tik ļoti novērtēju. Aertam – par atbalstu, mīlestību un smiekliem, kas visu padarīja vieglāku. Un, visbeidzot, vēlos pateikties visiem “maniem cilvēkiem”, kurus satiku šī ceļojuma laikā, kuri man iemācīja daudzas lietas un kurus tagad varu saukt par saviem draugiem (jūs atpazīsiet sevi).

Īpašs paldies Līgai un Janai, bez kuru nesavtīgās palīdzības nebūtu iespējama promocijas darba latviešu valodas kopsavilkuma tapšana zinātnes nozarei atbilstošā terminoloģijā!

SAĪSINĀJUMI

ACP	amorfs kalcija fosfāts
Alg	nātrija algināts
Alg/OCP	algināts/oktakalcija fosfāts
BET	<i>Brunauer–Emmett–Teller</i> metode
CaP(s)	kalcija fosfāts(-i)
CDHAp	hidroksilapatīts ar kalcija deficītu
CPE	konstantās fāzes elements
CPE _{dl}	robežvirsmas starp substrātu un šķīdumu
DCPD/Brushite	dikalcijs fosfāta dihidrāts
<i>DDS(s)</i>	zāļu piegādes sistēma(-as)
<i>DLC</i>	zāļu (aktīvās vielas) saturs
DOX	doksorubicīna hidrohlorīds
DOX-OCP	doksorubicīnu saturošs oktakalcija fosfāts
nDOX-OCP	n masas% aktīvās vielas (no sākotnējā zemtemperatūras α -trikalcijs fosfāta)
EIS	elektroķīmiskā impedances spektroskopija
Fer-1	ferostatīns-1
<i>FTIR</i>	Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija
HAp	hidroksilapatīts
hBMSC	cilvēka kaulu mezenhimālās cilmes šūnas
I	iekaisuma vide
ICDD	Starptautiskais difrakcijas datu centrs
LT- α -TCP	zemtemperatūras α -trikalcijs fosfāta
<i>ML</i>	mašīnmācīšanās
N	normāla ķermeņa vide
<i>NMR</i>	kodolmagnētiskā rezonanse
OCP	oktakalcija fosfāts
OS	osteosarkomas šūnas
PARP	poli (ADP-ribozes) polimerāze
PBS	fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums
PBT	polibutilēna tereftalāts
<i>PCD</i>	programmēta šūnu nāve
PEGT	polietilēna glikotereftalāts
Rc	pretestība
Rct	pretestība lādiņa pārnesei
SEM	skenējošā elektronu mikroskopija
SI	smaga iekaisuma vide
<i>SSA</i>	īpatnējais/specifiskais virsmas laukums
TCP (α , β)	trikalcijs fosfāts (α , β)
TEM	transmisijas elektronu mikroskopija

TGA	termogravimetriskā analīze
Ti Gr2	99.3 masas% no sākotnējā titāna
Ti Gr23	Al 5,4 masas%, V 3,8 masas%, Fe 0,2 masas%, C 0,009 masas% no sākotnējā titāna
<i>XRD</i>	rentgenstaru difraktometrija

PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

Ievads un literatūras apskats

Arvien pieaugošais cilvēku skaits, kas sirgst ar muskuloskeletālās sistēmas slimībām (2019. gadā reģistrēti 322,75 miljoni muskuloskeletālās sistēmas saslimšanas gadījumu) [1], tostarp ar kaulu vēzi (prognozēts, ka līdz 2040. gadam kaulu vēža gadījumu skaits pasaulē sasniegs 26 miljonus [2]) un nepilnīgu kaulu reģenerāciju, rada nepieciešamību meklēt efektīvus risinājumus kaulu defektu ārstēšanai un kaulaudu reģenerācijai. Reģeneratīvās medicīnas galvenais mērķis ir pēc iespējas precīzāk atdarināt dabiskā kaula īpašības, lai reģenerācijas process pacientiem būtu ātrāks un vieglāks. Ņemot vērā to, ka cīņā ar slimībām nereti ir nepieciešama dažādu medikamentu lietošana, papildu mērķis ir mazināt aktīvo vielu sistēmiskas lietošanas sekas, kas var būt pat letālas. Turklāt – neatkarīgi no plānotā pielietojuma – materiālam ir precīzi jāatbilst “zelta standartam”, proti, tam jābūt biosaderīgam, biorezorbējošam un osteoinduktīvam, t. i., jāstimulē šūnu diferenciācija par preosteoblastiem [3].

Pateicoties biosaderībai, osteokonduktivitātei un spējai struktūrā iekļaut dažādus medikamentus/jonus, kalcija fosfāti (CaP), kas sastopami arī cilvēka organismā kā kaulu un zobu neorganiskā komponente, ir perspektīvi biomateriāli izmantošanai kaulaudu reģenerācijā [4–8]. CaP var klasificēt pēc tādām fizikāli ķīmiskajām īpašībām kā Ca/P molārā attiecība, šķīdība, kristāliskums, daļiņu lielums, morfoloģija un īpatnējais virsmas laukums (*SSA*), kā arī pēc to pielietojuma veida (nanodaļiņas, pamatnes, pārklājumi utt.). Hidroksilapatīts (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), visbiežāk izmantotā CaP fāze, atrodams cietajos audos nestehiometriskā formā. Fizioloģiskos apstākļos HAp ir visstabilākā fāze, un tā galvenais trūkums ir lēna biorezorbcija [9, 10]. Otrs visbiežāk izmantotais CaP ir trikalcija fosfāts (TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Kaulaudu reģenerācijai galvenokārt izmanto α - un β -TCP polimorfās modifikācijas [11]. α -TCP plaši izmanto kaulu cementos un citos kaulu implantmateriālos, jo tam piemīt lieliska biosaderība, un tas uzrāda pozitīvus rezultātus *in vivo* [1]. Tomēr α -TCP raksturīga strauja biorezorbcija organismā, kas nesakrīt ar kaulaudu veidošanās ātrumu [12, 13]. Trīs CaP fāzes, t. i., amorfa kalcija fosfāts (ACP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), dikalcija fosfāta dihidrāts (brušīts jeb DCPD, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) un oktakalcija fosfāts (OCP, $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), tiek uzskatītas par kaulu minerālās komponentes jeb bioloģiskā apatīta prekursoriem [8, 14]. Pateicoties amorfai struktūrai, kā arī hidratētā slāņa un struktūras defektu klātbūtnei, ACP ir raksturīga augsta šķīdība un biorezorbcijas ātrums, kā arī augsta bioaktivitāte [15, 16]. DCPD raksturīga slāņveida struktūra, ko veido CO un PO_4^{3-} slāņi, kas izkārtoti paralēli *c* asij un savstarpēji saistīti ar ūdeņraža saitēm no struktūras ūdens molekulām [17, 18]. DCPD veidojas skābos ūdens šķīdumos pie pH 2–6, un viena no galvenajām DCPD priekšrocībām ir tā tieksme pārveidoties par OCP vai hidroksilapatītu ar kalcija deficītu (CDHAp), tāpēc to bieži izmanto pašcietējošu CaP kaulu cementu izstrādē.

Trešais prekursors, t. i., OCP, ir vislīdzīgākais HAp. Galvenokārt līdzība ir strukturāla, proti, apatīta slāņu izkārtojums paralēli (100) plaknei un hidratēto slāņu izkārtojums starp apatīta slāņiem [19, 20]. Šis specifiskais apatīta kristalogrāfisko plakņu (biezums $\sim 1,1$ nm)

izkārtojums un relatīvi tukšais hidratētais slānis (biezums ~ 0,8 nm) [21] nosaka OCP tieksmi gan *in vitro*, gan *in vivo* pārveidojoties par termodinamiski stabilāku CDHAp fāzi [2, 3]. OCP un HAp struktūras līdzības pakāpi ietekmē ūdens molekulu klātbūtne hidratētajā slānī. Analoga OCP pārvēršanās par apatītu notiek kaulu veidošanās procesā [8]. Turklāt hidratētā slāņa klātbūtne ievērojami atvieglo dažādu jonu un molekulu iekļaušanu OCP struktūrā [23]. No bioloģiskā viedokļa HPO_4^{2-} jonu izdalīšanās no OCP [24] stimulē kaulu šūnas (piemēram, osteoblastus, osteocītus, osteoklastus [25]) un veicina makrofāgu migrāciju uz implantācijas vietu [21]. Vairāki pētījumi liecina, ka OCP var samazināt tādu proiekaisuma citokīnu kā nekrozes faktora alfa un interleikīna-1 sekrēciju, tādējādi uzrādot pretiekaisuma īpašības [26, 27]. Turklāt vairākas zinātniskās grupas, piemēram, pētījumos par OCP pārklājumiem uz titāna [28] un polietilēna gliko-tereftalāta/polibutilēna tereftalāta (PEGT/PBT) [29] implantmateriāliem, ir pierādījušas OCP osteoinduktivitāti.

Pastāv divi galvenie OCP sintēzes ceļi – nogulsnešana [20, 30] un hidrolīze [17, 31]. OCP sintēzē izmantotās kalcija (Ca^{2+}) un fosfāta (PO_4^{3-}) jonus saturošās izejvielas var būt dažādas. Nogulsnešanas metodēs parasti tiek izmantotas kalcija acetāta, kalcija karbonāta, nātrija dihidrogēnortofosfāta un fosforskābes kombinācijas, savukārt hidrolīzē visbiežāk izmantotie prekursori ir DCPD vai α -TCP. Abi procesi ir sarežģīti un atkarīgi no pH, temperatūras, maisīšanas ātruma, jonu stipruma u. c. savstarpēji saistītiem tehnoloģiskajiem parametriem [23, 32]. Augstāka sintēzes temperatūra saīsina OCP iegūšanas laiku, jo pastāv kinētiski labvēlīgāki apstākļi šīs fāzes veidošanai. Savukārt paaugstināts pH var izraisīt citu fāžu (piemēram, CDHAp) nogulsnešanos. Iepriekšminētie faktori var ietekmēt arī OCP kristālu izmēru un morfoloģiju, kā arī to bioloģisko iedarbību [20, 33]. Nogulsnešanās rezultātā var veidoties plānas, iegarenas un šķiedrveida daļiņas, savukārt hidrolīzes rezultātā vienlaikus var veidoties gan plānas plāksņveida daļiņas, gan sīkākas spirālveida daļiņas. Līdz ar to ir svarīgi izvēlēties piemērotus sintēzes apstākļus, kas ļautu ne vien iegūt tīras fāzes OCP, bet arī kontrolēt daļiņu morfoloģiju specifiskiem pielietojumiem.

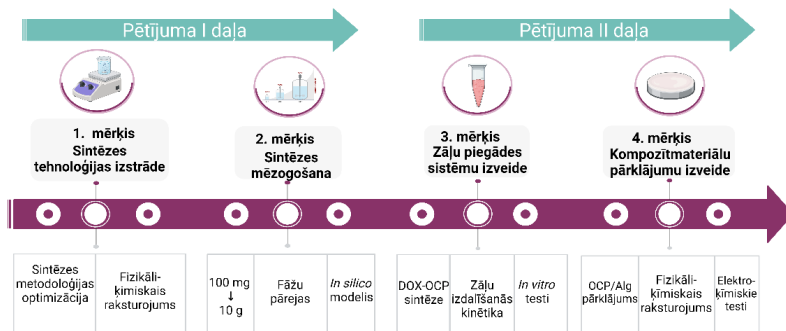
Lai identificētu iegūto CaP fāžu raksturīgās iezīmes un morfoloģiju, ir nepieciešams izmantot vairāku metožu pieeju. Lai apstiprinātu konkrētas fāzes klātbūtni, tiek izmantota rentgenstaru difraktometrija (*XRD*), Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija (*FTIR*), Ramana spektroskopija, skenējošā elektronu mikroskopija (*SEM*), kodolmagnētiskā rezonanse (*NMR*), termogravimetriskā analīze (*TGA*), transmisijas elektronu mikroskopija (*TEM*), *Brunauer-Emmett-Teller* metode (*BET*), lāzera granulometrija u. c. Tomēr OCP lielā līdzība ar CDHAp [23] apgrūtina kvantitatīvu fāžu analīzi, jo OCP un CDHAp raksturīgo *XRD* maksimumu pārklāšanās var traucēt Rītvelda analīzei. Citi šķēršļi, kas tika konstatēti, analizējot literatūru, ietver salīdzinoši nelielu tīras OCP fāzes iznākumu (~ 100 mg – 2 g), šauru OCP sintēzes pH diapazonu (pH no 5 līdz 7), piemērotu OCP sintēzes temperatūru, kā arī ierobežotās OCP apstrādes iespējas augstās temperatūrās (> 80 °C) [23].

Ņemot vērā OCP potenciālu, aizvien tiek meklēti inovatīvi veidi, kā šo CaP fāzi izmantot reģeneratīvajā medicīnā. Līdz šim OCP ir izmantots kaulu cementos [34], kompozītmateriālos ar polimēriem (alginātu, želatīnu, kolagēnu, PEGT u. c.) pamatņu izstrādei kaulu defektu rekonstrukcijai [35–37], kā arī pārklājumos uz titāna sakausējumu implantiem, lai uzlabotu metāla virsmu bioloģiskās īpašības [29, 38]. Ņemot vērā to, ka reģeneratīvās medicīnas mērķi

ietver arī tādu sistēmisku slimību kā osteoporozes novēršanu un zāļu lietošanas biežuma un toksicitātes samazināšanu vēža slimniekiem, bioaktīvo jonu un zāļu kombinēšana ar kalcija fosfātiem ir guvusi ievērojamu popularitāti. Piemēram, lai uzlabotu OCP bioaktivitāti, tas ticis modificēts ar tādiem bioaktīviem joniem kā karbonāts (CO_3^{2-}), magnijs (Mg^{2+}), cinks (Zn^{2+}) un stroncijs (Sr^{2+}) [23]. OCP izmantots arī zāļu piegādes sistēmu (*DDS*) izveidē, lai uzlabotu terapeitisko līdzekļu (bisfosfonātu, ibuprofēna, metotreksāta) biopieejamību, izmantojot lokālu aktīvo vielu piegādi [23]. Tradicionālās (sistēmiskās) zāļu piegādes metodes darbojas caur asinsrites sistēmu, kas var izraisīt dažādas blakusparādības, ieskaitot sistēmisku toksicitāti un suboptimālu piegādi mērķa vietā [39]. Lai novērstu šos trūkumus, lokālas aktīvo vielu piegādes mērķis ir samazināt sākotnējo straujo zāļu izdalīšanos un pielāgot aktīvo vielu izdalīšanās profilu defekta vietai un konkrētajai slimībai. Ņemot vērā to, ka ļaundabīgie kaulu audzēji (visbiežāk osteosarkoma (OS)) veido aptuveni 40 % no visiem kaulu audzējiem [2], daži no centieniem izmantot OCP kā aktīvo vielu nesēju vērsti uz metotreksātu saturoša OCP un OS šūnu līniju mijiedarbības novērtēšanu [40]. Pētījumi, kas saistīti ar OCP modificēšanu ar zālēm, galvenokārt vērsti uz bisfosfonātu pievienošanu OCP, tādēļ ir ļoti svarīgi izstrādāt jaunas *DDS*, kas spētu efektīvi kontrolēt pretvēža zāļu lokālu ievadīšanu un īstermiņa/ilgtermiņa iedarbību. Šādas *DDS* spētu mazināt ķīmijterapijas rezistenci un no devas atkarīgās toksicitātes attīstību. Ir izvirzīta hipotēze, ka, ja zāļu pievienošana tiek veikta *in situ* OCP sintēzes sākumposmā, rezultātā var iegūt OCP *DDS* ar īpaši augstu zāļu jeb aktīvās vielas saturu (*DLC*) [41]. Lai gan OCP ir uzrādījis augstu potenciālu kā bioloģiski aktīvu jonu/molekulu piegādes sistēma, ir maz datu par aktīvo vielu izdalīšanās mehānismiem no OCP, kā arī par zāļu/jonu pievienošanas ietekmi uz OCP fāzes veidošanos.

Pētījuma pamatojums

Veicot rūpīgu literatūras analīzi un paturot prātā pierādīto OCP nozīmīgumu, šajā promocijas darbā galvenā uzmanība tika vērsta uz zinātniskajā literatūrā iztrūkstošu sistemātisku pētījumu veikšanu par OCP iegūšanu un izmantošanu, tādējādi zināmā mērā aizpildot konstatēto zināšanu trūkumu. Promocijas darba izstrādes gaitā optimizēta OCP sintēzes metode un veikta sintēzes mērogošana, izstrādātas un raksturotas pretvēža *DDS* uz OCP bāzes, kā arī pārbaudīta OCP pielietojamība kompozītmateriālu pārklājumu izveidē. Promocijas darba shēma redzama 1. attēlā.



1. att. Promocijas darba shēma (OCP – oktakalcija fosfāts; Alg – algināts; DOX – dokсорubicīns; DOX-OCP – dokсорubicīnu saturošs oktakalcija fosfāts).

Mērķis un uzdevumi

Promocijas darba mērķis bija optimizēt OCP sintēzes metodi, lai iegūtu stabilu OCP ar augstu fāžu tīrību, pētīt iegūtā OCP pielietojamību zāļu piegādes sistēmu izveidē, kā arī izveidot OCP saturošu kompozītpārklājumu. Lai sasniegtu mērķi, definēti vairāki uzdevumi.

1. Optimizēt OCP sintēzes metodi, izmantojot zemtemperatūras α -trikalcija fosfāta (LT- α -TCP) hidrolīzi, un raksturot iegūtā OCP fizikāli ķīmiskās īpašības.
2. Optimizēt sintēzes metodes mērogošanu, noteikt OCP veidošanās starpproduktus un izstrādāt *in silico* modeli OCP sintēzes beigu punkta noteikšanai, pamatojoties uz XRD un FTIR rezultātiem.
3. Izveidot zāļu piegādes sistēmu vēža ārstēšanai, kombinējot OCP ar antineoplastisku aktīvo vielu – doksorubicīna hidrohlorīdu (DOX-OCP).
4. Izveidot OCP saturošus hidrogēla pārklājumus metāla implantiem, kas spēj uzlabot metāla implantu noturību pret koroziju.

Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes

1. Simtkārtēja OCP sintēzes mērogošana izmantojot LT- α -TCP hidrolīzi istabas temperatūrā neietekmē gala produkta fizikāli ķīmiskās īpašības (fāžu sastāvu, molekulāro struktūru un morfoloģiju).
2. Doksorubicīnu OCP daļiņās var iekļaut līdz 10 masas% no sākotnējā OCP prekursora daudzuma. Lielāka doksorubicīna satura izmantošana novērš OCP fāzes veidošanos. Sintezētais produkts var tikt izmantots kā palēninātas izdalīšanās pretvēža zāļu piegādes sistēma.
3. OCP izmantošana pārklājumos uz 3D drukātiem Ti bāzes metāliskiem implantiem ietekmē elektrisko lādiņu pārnesei pretestību uz substrāta un pārklājuma robežvirsmas.

Zinātniskā novitāte

1. Nosakot fāžu pārvērtības reakcijas laikā no LT- α -TCP uz OCP, ar ķīmisko vienādojumu palīdzību aprakstīta pakāpeniska pāreja no LT- α -TCP fāzes uz OCP fāzi caur DCPD kā starpproduktu.
2. Doksorubicīna hidrohlorīda saturam DOX-OCP sistēmā pārsniedzot 10 masas% (no sākotnējā LT- α -TCP daudzuma), tiek kavēta OCP fāzes veidošanās. Pierādīts, ka DOX-OCP daļiņas izraisa osteosarkomas šūnu nāvi apoptozes ceļā.

Praktiskā nozīme

Promocijas darba gaitā optimizēta OCP iegūšanas metodika, izvēloties LT- α -TCP kā vienīgo izejmateriālu, kura ražošanai nepieciešams mazāks enerģijas patēriņš, kas atbilst Eiropas Zaļā kursa izvirzītajiem mērķiem. OCP sintēzes metodes mērogošanas rezultātā iegūti ievērojami

OCP fāzes apjomi, kas padara šo procesu potenciāli pievilcīgu ražošanai. Iegūto OCP var tālāk izmantot kā izejmateriālu:

- 1) inovatīvu zāļu piegādes sistēmu izveidei lokālai osteosarkomas ārstēšanai;
- 2) OCP saturošu pārklājumu izveidei, kas uzlabotu 3D drukātu titāna sakausējumu izturību pret koroziju.

Publikācijas un promocijas darba aprobācija

SCI zinātniskās publikācijās

1. **Kovrlija I.**, Locs, J., Loca D. Octacalcium phosphate: Innovative vehicle for the local biologically active substance delivery in bone regeneration, *Acta Biomaterialia*, 135, 2021, pp. 27–47. doi: 10.1016/j.actbio.2021.08.021 (Scopus, Open Access, IF 9,4, Q1, CiteScore 16,8).
 - Kovrlijas I. ieguldījums publikācijā: rakstīšana – melnraksta rakstīšana, pārskatīšana un rediģēšana, vizualizāciju veidošana (kopā 85/100 %).
2. **Kovrlija I.**, Menshikh K., Marsan O, Rey C., Combes C., Locs, J., Loca D. Exploring the Formation Kinetics of Octacalcium Phosphate from Alpha-Tricalcium Phosphate: Synthesis Scale-Up, Determination of Transient Phases, Their Morphology and Biocompatibility, *Biomolecules*, 13, 2023, 462. doi:10.3390/biom13030462 (Scopus, Open Access, IF 4,8, Q1, CiteScore 9,4).
 - Kovrlijas I. ieguldījums publikācijā: rakstīšana – melnraksta rakstīšana, pārskatīšana un rediģēšana, konceptualizācija, vizualizāciju veidošana, formālā analīze, izpēte (kopā 80/100 %).
3. Nascimben M., **Kovrlija I.**, Locs, J., Loca D., L. Rimondini. Fusion and classification algorithm of octacalcium phosphate production based on XRD and FTIR data, *Scientific Reports*, 14:1489, 2024, 1–11. doi: 10.1038/s41598-024-51795-0 (Scopus, Open Access, IF 3,8, Q1, CiteScore 6,9).
 - Kovrlijas I. ieguldījums publikācijā: laboratorijas eksperimenti, datu ievākšana un organizēšana, rezultātu apspriešana, melnraksta rakstīšana un rediģēšana (kopā 50/100 %).
4. **Kovrlija I.**, Pańczyszyn E., Demir O., Laizane M., Corazzari M., Locs J., Loca D. Doxorubicin-loaded octacalcium phosphate particles as controlled release drug delivery systems: physico-chemical characterization, in vitro drug release and evaluation of cell death pathway, *International Journal of Pharmaceutics*, 653, 2024, 123932. doi: 10.1016/j.ijpharm.2024.123932 (Scopus, Open Access, IF 5,3, Q1, CiteScore 10,7).
 - Kovrlijas I. ieguldījums publikācijā: rakstīšana – melnraksta rakstīšana, pārskatīšana un rediģēšana, konceptualizācija, vizualizāciju veidošana, formālā analīze, izpēte (kopā 75/100 %).
5. Bordbar Khiabani A., **Kovrlija I.**, Locs J., Loca D., Gasik, M. Octacalcium Phosphate-Laden Hydrogels on 3D-Printed Titanium Biomaterials Improve Corrosion Resistance in Simulated Biological Media, *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24, 13135. doi: 10.3390/ijms241713135 (Scopus, Open Access, IF 4,9, Q1, CiteScore 8,1).
 - Kovrlijas I. ieguldījums publikācijā: rakstīšana – melnraksta rakstīšana, vizualizāciju veidošana, formālā analīze un izpēte (kopā 50/100 %).

Zinātniskās konferences, kurās prezentēti promocijas darba rezultāti

1. **Kovrlija I.**, Nascimben M., Bordbar-Khiabani A., Menshikh K., Gasik M., Combes C., Rimondini L., Locs J., Loca D. Tailoring the production technology and utilization of octacalcium phosphate for precise patient-centred applications in musculoskeletal field. *12th World Biomaterials Congress*, 2024. gada 26.–31. maijs 2024, Degu, Dienvidkoreja; (I. K. stenda referāts).
2. **Kovrlija I.**, Demir O., Laizane M., Locs J., Loca D. Novel drug delivery vehicle: doxorubicin-loaded octacalcium phosphate. *33rd Annual Conference of the European Society of Biomaterials*, 2023. gada 4.–8. septembris, Davosa, Šveice. (I. K. stenda referāts).
3. **Kovrlija I.**, Menshikh. K., Demir O., Locs J., Loca D., Octacalcium phosphate: journey of creating a unique drug delivery vehicle. *The XVIIIth Conference of the European Ceramic Society*, 2023. gada 2.–6. jūlijs, Liona, Francija. (I. K. mutiskais referāts, studentu runas konkurss).
4. **Kovrlija I.**, Menshikh K., Marsan O., Rey C., Combes C., Locs J., Loca D. Scale-Up of Octacalcium Phosphate via Hydrolysis Route: Effect on Physico-Chemical Characteristics and In-Vitro Cytocompatibility with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society European Chapter Meeting*, 2023. gada 28.–31. marts, Mančestera, Lielbritānija. (I. K. mutiskais referāts).
5. **Kovrlija I.**, Menshikh K., Marsan O., Rey C., Combes C., Locs J., Loca D. Phase transformation from α -tricalcium phosphate to octacalcium phosphate via hydrolysis route. *Scandinavian Society for Biomaterials 16th annual meeting*, 2023. gada 12.–14. marts, Roros, Norvēģija. (I. K. stenda referāts).
6. **Kovrlija I.**, Barbut C., Locs J., Loca D. Incorporation and effect of lidocaine hydrochloride on octacalcium phosphate. *32nd Annual Conference of the European Society of Biomaterials*, 2022. gada 4.–8. septembris, Bordo, Francija. (I. K. stenda referāts).
7. **Kovrlija I.**, Locs J., Loca D. Unravelling the Behaviour of Octacalcium Phosphate in Various Model Solutions. *Scandinavian Society for Biomaterials 15th annual meeting*, 2022. gada 13.–15. jūnijs, Jūrmala, Latvija. (I. K. stenda referāts).
8. **Kovrlija I.**, Barbut C., Locs J., Loca D. Effects of the synthesis conditions on the hydrolysis of α -tricalcium phosphate to octacalcium phosphate. *31st Annual Conference of the European Society for Biomaterials*, 2021 (tiešsaistē). (I. K. stenda referāts).
9. **Kovrlija I.**, Locs J., Loca D. Octacalcium phosphate: a contemporary drug delivery system for local biologically active substances – a review. *Scandinavian Society for Biomaterials 14th Annual Meeting*, 2021 (tiešsaistē). (I. K. stenda referāts).

Citi zinātniskie pasākumi, kuros prezentēti promocijas darba rezultāti

1. Locs J., **Kovrlija I.**, Choudhary R., Loca D. Roadmap from upscaling and rapid synthesis towards first-ever consolidation of OCP. *33rd Conference and annual meeting of the International Society for Ceramics in Medicine*, 2023. gada 17.–20. oktobris, Solotuma, Šveice. (J. L. uzaicināta runa).
2. Bordbar Khiabani A., **Kovrlija I.**, Locs J., Loca D., Gasik M. Octacalcium Phosphate Embedded Hydrogels on 3D Printed Titanium Improve the Corrosion Performance in

- Simulated Biological Media. *31st Annual Meeting of European Orthopaedic research Society*, 2023. gada 27.–29. septembris, Porto, Portugāle. (A. B. K. mutiskais referāts).
3. Loca D., **Kovrlija I.**, Pylostomou A., Locs J., Can Octacalcium Phosphate Be Used As a Doxorubicin Delivery Platform? *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society – Americas Chapter Annual Meeting*, 2023. gada 11.–14. aprīlis, Bostona, ASV. (D. L. stenda referāts).
 4. Menshikh K., **Kovrlija I.**, Miola M., Cochis A., Rimondini L. Synthetic pre-vascularized porous scaffold as an engineered environment for the in vitro osteosarcoma model. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society European Chapter Meeting*, 2022. gada 28. jūnijs–1. jūlijs, Krakova, Polija. (K. M. stenda referāts).
 5. Menshikh K., **Kovrlija I.**, Miola M., Cochis A., Rimondini L. Freeze-dried Composition of Alginate and Bioglass as an Engineered Environment for the Osteosarcoma Model. *Scandinavian Society for Biomaterials 15th annual meeting*, 2022. gada 13.–15. jūnijs, Jūrmala, Latvija. (K. M. stenda referāts).
 6. **Kovrlija I.**, Locs J., Loca D. Octacalcium phosphate: synthesis, characterization and functionalization. *4th Premurosa Summer School*, 2023. gada 15.–19. maijs, Rīga, Latvija. (I. K. mutiskais referāts).
 7. **Kovrlija I.**, Locs J., Loca D. Unravelling the Behaviour of Octacalcium Phosphate in Various Model Solutions. *3rd Premurosa Summer School*, 2022. gada 20.–24. jūnijs, Belgrada, Serbija. (I. K. stenda referāts).
 8. **Kovrlija I.**, Locs J., Loca D. Smart personalized degradable biomaterials for bone tissue regeneration. *2nd Premurosa Summer School*, 2021. gada 19.–24. oktobris, Porto, Portugāle. (I. K. mutiskais referāts).
 9. **Kovrlija I.**, Loca D. Octacalcium phosphates: promising instruments for local drug delivery in bone regeneration. *Baltic Biomaterials Centre of Excellence Summer School on “Scientific writing”*, 2020. gada 23.–27. novembris, tiešsaistē. (I. K. mutiskais referāts).

Citas zinātniskās publikācijas, kas publicētas promocijas darba izstrādes laikā

1. **Kovrlija I.**, K. Menshikh, H. Abreu, A. Cochis, L. Rimondini, O. Marsan, C. Rey, C. Combes, J. Locs, D. Loca, Challenging Applicability of ISO 10993-5 for Calcium Phosphate Biomaterials Evaluation: Towards More Accurate In Vitro Cytotoxicity Assessment, *Biomaterials Advances*, 160, 213866, 2024. doi: 10.1016/j.bioadv.2024.213866 (Scopus, Open Access).
2. Aunina K., Ramata-Stunda A., **Kovrlija I.**, Tracuma E., Merijs-Meri R., Nikolajeva V., Loca D., Exploring the Interplay of Antimicrobial Properties and Cellular Response in Physically Crosslinked Hyaluronic Acid/ε-Polylysine Hydrogels. *Polymers*, 15 (8): 1915, 2023. doi: 10.3390/polym15081915 (Scopus, Open Access).
3. Mosina M., **Kovrlija I.**, Stipniece L., Locs J. Gallium containing calcium phosphates: Potential antibacterial agents or fictitious truth. *Acta Biomaterialia*, 150, 48–57, 2022. doi: 10.1016/j.actbio.2022.07.063 (Scopus, Open Access).
4. **Kovrlija I.**, Locs, J., Loca D. Incorporation of Barium Ions into Biomaterials: Dangerous Liaison or Potential Revolution? *Materials*, 14 (19), 2021, pp. 5772. doi: 10.3390/ma14195772 (Scopus, Open Access).

PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI

OCp sintēzes metodoloģijas optimizācija

Neraugoties uz to, ka OCP piemīt augstāks potenciāls stimulēt kaulaudu reģenerāciju, salīdzinot ar HAp [21,42,43], samērā ierobežotās iegūšanas iespējas un sarežģītais sintēzes process kavē tā attīstību gan zinātniskā, gan rūpnieciskā līmenī [23, 32]. Abām galvenajām OCP sintēzes metodēm ir priekšrocības un trūkumi, kas apkopoti 1. tabulā.

1. tabula

OCp nogulsnešanas un hidrolīzes sintēžu metožu priekšrocības un trūkumi [31, 44–47]

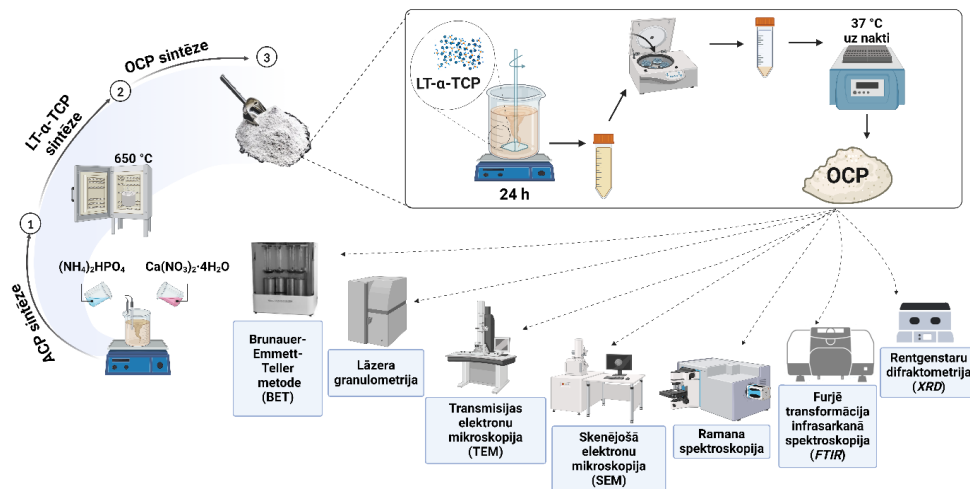
Nogulsnešana		Hidrolīze	
Priekšrocības	Trūkumi	Priekšrocības	Trūkumi
Ātrāka reakcija	Vismaz divi prekursori	Tikai viens prekursors	Lēnāka reakcija
Augstāka ražība	Dozēšanas ātruma regulēšana	Nav dozēšanas ātruma ierobežojumu	Ražība ierobežota līdz sākotnējam prekursora daudzumam
/	Augstākas temperatūras (60–80 °C)	Zemākas temperatūras (25–60 °C)	/
/	Nepieciešama nogulšņu attīrīšana	Nav attīrīšanas posma	/
/	Vienmēr nepieciešama pH regulēšana	Iespējams izvairīties no pH regulēšanas	/

Zemtemperatūras α -TCP hidrolīze līdz OCP

Apsverot sintēzes ceļu priekšrocības un trūkumus, tika secināts, ka hidrolīzes metode precīzāk atbilst promocijas darba mērķiem. Saskaņā ar literatūras datiem kā prekursors hidrolīzē tiek izmantots gan DCPD, gan α -TCP, tomēr DCPD ir augstāka šķīdība nekā α -TCP, to vieglāk ietekmē atmosfēras CO₂, kā arī zemākās temperatūrās (< 30 °C) tā pārveidošanai par OCP ir nepieciešami vairāki mēneši [21]. Tādējādi par prekursoru OCP sintēzē tika izvēlēts α -TCP.

Parasti α -TCP sintēze ietver ilgstošu (~ 2–3 h) kalciju un fosfātu saturošu materiālu, piemēram, β -TCP, karsēšanu 1300 °C vai augstākā temperatūrā. Šādā veidā sintezēts α -TCP parasti ir rupjgraudains pulveris, kam nepieciešama turpmāka malšana, kuras rezultātā rodas daļiņas ar plašu izmēru sadalījumu un veidojas amorfa fāze [48]. Lai no tā izvairītos un lai samazinātu enerģijas patēriņu, zemtemperatūras α -TCP (LT- α -TCP) tika iegūts, karsējot ACP ar augstu īpatnējās virsmas laukumu ($SSA > 70 \text{ m}^2/\text{g}$; izgulsnēts no diamonija fosfāta un kalcija nitrāta tetrahidrāta šķīdumiem) 650 °C (2. att.) [48].

OCP tika sintezēts no LT- α -TCP skābā vidē (0,0016 M ortofosforskābē (H_3PO_4)) istabas temperatūrā (22 °C), uzturot konstantus maisīšanas apstākļus [46]. Pēc sintēzes paraugi tika žāvēti 37 °C (uz nakti), un, lai novērtētu iegūtā OCP tīrību, iegūtie produkti tika analizēti, izmantojot vairākas metodes (2. att.).

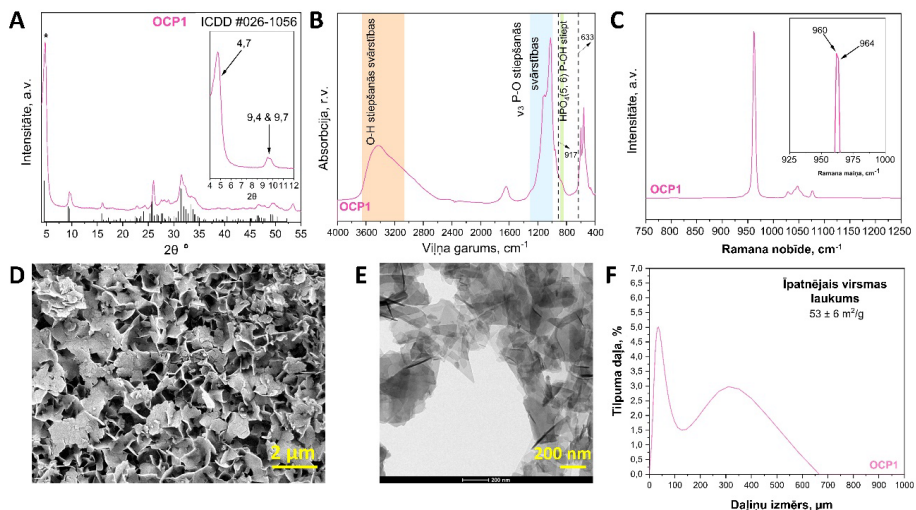


2. att. OCP sintēzes metodoloģijas vispārējā shēma un OCP fāzes noteikšanā izmantotās analizēs metodes.

OCP paraugi (apzīmēti ar OCP1) pēc sintēzes tika analizēti, izmantojot iepriekš izvēlētu metožu kopumu, kas ļauj raksturot OCP dažādos līmeņos. Fāžu sastāva analīzei izmantota rentgenstaru difraktoģometrija (*XRD*, *PANalytical Aeris*, Nīderlande), kristālisko fāžu identifikācija veikta, izmantojot Starptautiskā difrakcijas datu centra (*ICDD*) PDF-2 datubāzi. Lai iegūtu informāciju par mijiedarbībām molekulārā līmenī, izmantota Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija (*FTIR*, *Nicolet iS 50*, *Thermo Scientific*, ASV) un Ramana spektroskopija (*LabRAM HR 800*, *Horiba Jobin Yvon*, Japāna). Pulverveida materiālu morfoloģijas raksturošanai izmantota skenējošā elektronu mikroskopija (*SEM*, *Tescan Mira/LMU*, *Tescan*, Čehija) un transmisijas elektronu mikroskopija (*TEM*, *Tecnai F20*, *FEI*), daļiņu izmēra sadalījums noteikts ar lāzera granulometriju (*Malvern Mastersizer 3000*), īpatnējais virsmas laukums mērīts ar *Brunnauer-Emmet-Teller* metodi (*BET*, *QUADRASORB SI* un *Quadra Win*).

OCP rentgendifrakcijas aina ir ļoti specifiska, kas ļauj OCP atšķirt no citām CaP fāzēm. OCP1 rentgendifrakcijas ainā novērojams raksturīgais zema leņķa maksimums (100) pie $2\theta=4,72^\circ$ un difrakcijas maksimumu dublets – maksimums (200) pie $2\theta = 9,44^\circ$ un maksimums (010) pie $2\theta = 9,77^\circ$ (3. A att.) [49]. Lai gan šie OCP raksturīgie *XRD* maksimumi atšķir to no citām CaP fāzēm, tomēr apgabalā $2\theta = 25\text{--}35^\circ$ OCP *XRD* maksimumi pārklājas ar HAP fāzes *XRD* maksimumiem abu fāžu strukturālās līdzības dēļ (3. A att.) [49–51]. Tomēr HAP raksturīgā maksimuma pie $2\theta = 10,8^\circ$ trūkums liecina par HAP fāzes neesamību vai tās minimālu klātbūtni pētāmajā paraugā. Otrs svarīgs rādītājs, kas jānovēro, ir iepriekšminētais maksimumu dublets pie $2\theta = 9,4^\circ$ un $2\theta = 9,7^\circ$, jo intensīvākais OCP maksimums, kas atrodas

zemo leņķu reģionā (pie $2\theta = 4,7^\circ$), ir grūti pieejams un pārklājas ar fona troksni, kas var traucēt kvantitatīvai fāžu sastāva noteikšanai, izmantojot Rītvelda metodi, kā arī to ietekmē OCP plākšņveida morfoloģija.



3. att. Analīžu kopums, kas apstiprina iegūtā OCP tīrību: A – XRD difraktogramma (* – XRD maksimums pie $2\theta = 4,7^\circ$); B – $FTIR$ spektri; C – Ramana spektri; D – SEM mikrofotogrāfija; E – TEM mikrofotogrāfija; F – daļiņu izmēru sadalījums un SSA .

OCP elementāršūnas īpatnība ir divas HPO_4^{2-} kristalogrāfiskās vietas, kas apzīmētas ar $HPO_4(5)$ un $HPO_4(6)$, kuru P-(OH) stiepšanos un OH liekšanos plaknē nav iespējams detektēt, izmantojot XRD metodi. $HPO_4(5)$ grupa atrodas hidratētajā slānī, $HPO_4(6)$ grupa atrodas uz apatīta un hidratētā slāņa robežvirsmas, turklāt abas grupas atšķiras, proti, $HPO_4(6)$ grupai ir īsāka stiprāka starpmolekulārā udeņraža saite nekā $HPO_4(5)$ grupai [52]. HPO_4 grupas nav sastopamas HAp, un to klātbūtne ir vēl viena iezīme, kas atšķir šīs divas fāzes. Tādēļ, lai noteiktu paraugu molekulāro struktūru un apstiprinātu OCP fāzes tīrību, tika izmantota $FTIR$ un Ramana spektroskopija (3. B, C att.) [52]. OCP1 spektros atzīmētas OCP raksturīgākās absorbcijas joslas, kas to atšķir no citām CaP fāzēm, t. i., HPO_4^{2-} liekšanās un O-H saišu stiepšanās vibrācijas (3. B att., oranžais un zaļais tonējums). Nozīmīgākās OCP raksturīgās HPO_4 grupu joslas detektētas pie 1295 cm^{-1} (OH deformācija plaknē) un pie 917 cm^{-1} (P(6)-(OH) saišu stiepšanās vibrācijas HPO_4^{2-} jonus, kas saistīti ar stiprām udeņraža saitēm), kā arī PO_4^{3-} ν_3 un HPO_4^{2-} vibrācijas pie 1077 cm^{-1} , 1093 cm^{-1} un 1121 cm^{-1} . HAp raksturīgās OH^- absorbcijas joslas pie 3572 cm^{-1} trūkums spektros ir viens no fīras fāzes OCP veidošanās rādītājiem (vai liecina par nenozīmīgu HAp daudzumu [46]). OH^- absorbcijas josla pie 633 cm^{-1} , ko parasti attiecina uz HAp OH^- vibrācijām, tika detektēta kā plecs (627 cm^{-1}), tomēr saskaņā ar Fowler *et al.* [52] to var attiecināt arī uz $H_2O(4)$ svārstībām OCP ūdens molekulās. Ramana spektros visintensīvākās joslas atrodas starp $900\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$, kas atbilst trīskārtēji deģenerētām P-O ν_3 asimetriskām stiepšanās vibrācijām un daļēji P-O ν_1 simetriskām stiepšanās vibrācijām. OCP raksturīgā Ramana josla atrodas pie 958 cm^{-1} (3. C att., visintensīvākais maksimums) [52]. Tomēr tās augstā intensitāte var būt saistīta arī ar vairāku kristālisko fāžu

konvolūciju, ko veido galvenā josla pie 960 cm^{-1} un plecs pie 964 cm^{-1} , kas attiecināms uz PO_4 ν_1 vibrācijām, un tas varētu liecināt par zema kristāliskuma OCP fāzes veidošanos.

OCP kristāliem raksturīga plākšņveida morfoloģija, un kristālu izmēri ir atkarīgi no sintēzes metodes. Tiek uzskatīts, ka specifisko OCP kristālu veidošanās ir saistīta ar Hartmana-Perdoka teoriju par periodiskām saišu ķēdēm, kas nosaka, ka kristāliskajā struktūrā pastāvīgs stipro saišu ceļš ir tāda režģa daļa, kuru sadala noteikta (hkl) plakne [50]. OCP plāksnītes aug [001] virzienā, veidojoties lielākajai virsmai (100), un tās, savstarpēji saistoties, veido sfēriskus agregātus, kas atgādina smilšu rozes. SEM mikrofotogrāfijā (3. D att.) redzama OCP1 virsmas morfoloģija – mazas, brīvi agregētas plākšņveida daļiņas (platums 2–5 μm , biezums nanometru diapazonā), kas savstarpēji savienotas rozes formā. Analizējot OCP iekšējo struktūru ar TEM (3. E att.), tika novēroti dažāda lieluma (aptuveni 50–300 nm) plākšņveida kristāli. Kā arī tika novērots, ka kristāli pārklājas un ir savstarpēji savijušies, kā rezultātā tie veido dažāda lieluma aglomerātus, kas tika novēroti arī SEM. BET mērījumi parādīja, ka OCP1 ir liels SSA – $53 \pm 6\text{ m}^2/\text{g}$. Lielais SSA savukārt var liecināt par augstāku materiāla fizikāli ķīmisko un bioloģisko reaktivitāti, kas var būtiski ietekmēt materiāla mijiedarbību ar šūnām. Bimodāls daļiņu izmēru sadalījums (3. F att.) liecina, ka vismazākais primāro daļiņu izmērs 5–25 μm robežās veido ~5% kopējā tilpuma. Sekundārais sadalījums 150–500 μm diapazonā liecina, ka daļiņas ir nevienmērīgi aglomerētas.

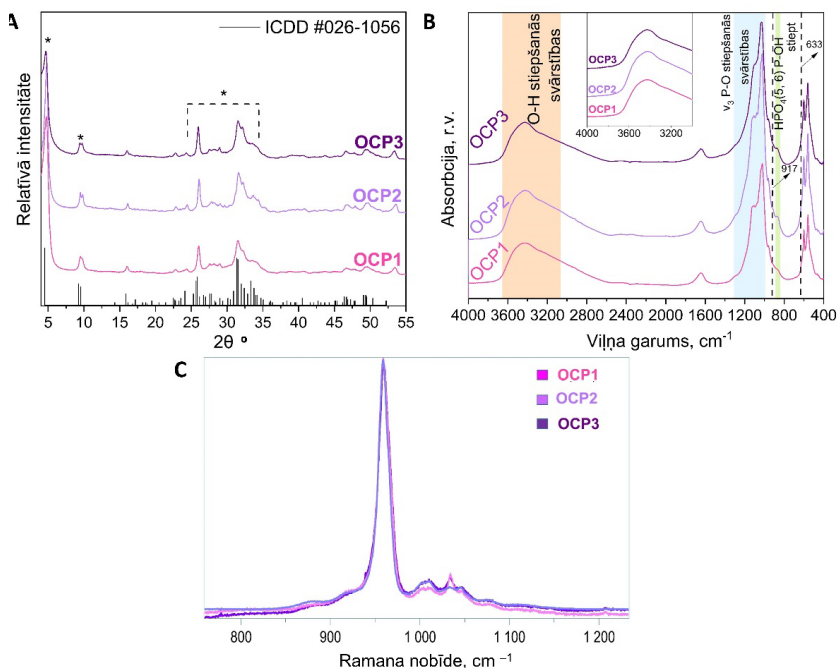
Iegūtie rezultāti uzskatāmi parāda, ka no LT- α -TCP ir iespējams iegūt tīru OCP fāzi, tādējādi veiksmīgi sasniedzot pirmo pētījuma mērķi. Taču, ņemot vērā to, ka produkta iznākums bija tikai ~100 mg, kas nav pietiekams daudzums OCP potenciālās izmantošanas pētījumiem un tiem sekojošajiem *in vitro/in vivo* pētījumiem, tika sākta OCP sintēzes mērogošana, lai palielinātu produkta iznākumu.

OCP sintēzes mērogošana, fāzes veidošanās kinētikas pētījumi un sintēzes attīstības gaitas (LT- α -TCP \Rightarrow OCP) *in silico* modeļa izveide

Pēc tīras fāzes OCP iegūšanas no LT- α -TCP (OCP1, istabas temperatūrā, 24 h laikā) nākamais solis bija optimizēt sintēzes parametrus un iegūt lielāku produkta iznākumu. LT- α -TCP hidrolīzes sintēzes metode tika palielināta simtkārtēji (100 mg \rightarrow 1g \rightarrow 10 g). Sintēzes tehnoloģijas mērogošanas optimizācijas procesā tika sekots līdz diviem papildu aspektiem – fāzes veidošanās kinētikai no LT- α -TCP līdz OCP un *in silico* modeļa izstrādei OCP sintēzes posmu raksturošanai.

OCP sintēzes mērogošana

Iegūtie rezultāti parādīja, ka pie nemainīgas prekursoru šķidrās/cietās fāzes attiecības OCP sintēzes laiks palielinās līdz ar izejas LT- α -TCP daudzumu. Desmitkārtējā palielinājumā OCP fāze tika iegūta pēc 72 h (OCP2, 1 g), savukārt simtkārtējā palielinājumā – pēc 180 h (OCP3, 10 g). *XRD* difrakcijas ainās detektēti raksturīgie OCP triklīnās struktūras maksimumi: zema leņķa maksimums (100) pie $2\theta = 4,7^\circ$ un maksimumu ((200) un (010)) dublets pie $2\theta = 9,4^\circ$ un $2\theta = 9,7^\circ$ (4. A att.) [23, 53]. Tāpat kā sākotnējā (OCP1, 100 mg) sintēzes līmenī, *XRD* maksimumi apgabalā no $2\theta = 25$ līdz $2\theta = 35^\circ$ nav labi izšķirami [20]. OCP2 un OCP3 *FTIR* spektros (4. B att.) P-O ν_3 stiepšanās vibrācijām, kas liecina par OCP fāzi, atbilst visintensīvākās absorbcijas joslas pie 1300–1000 cm^{-1} .

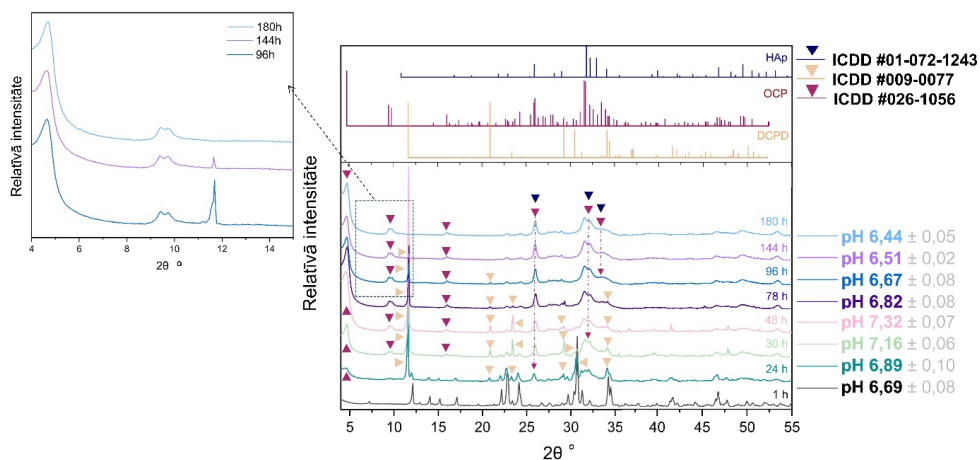


4. att. OCP fāžu, kas iegūtas trīs mērogošanas līmeņos: A – *XRD* ainās (* apzīmē galvenos maksimumus, kas minēti tekstā; references aina (ICDD ieraksts Nr. 026-1056) atbilst OCP triklīnās fāzes galvenajiem maksimumiem); B – *FTIR* spektri; C – Ramana spektri.

Ramana spektrā izceltas P-O ν_1 stiepšanās vibrācijas (4. C att.). Specifiskākās OCP spektru joslas tika apspriestas iepriekšējā nodaļā. Lai novērtētu iespējamo sastāva neviendabīgumu viena parauga ietvaros, tika veikti Ramana mikro- un makromērījumi [46]. Iegūtie rezultāti liecina, ka fāžu veidošanās un/vai šķīšana ir cieši saistīta ar izejas pulvera graudu (vai agregātu) izmēru. Saskaņā ar lāzergranulometrijas mērījumu rezultātiem gan OCP2, gan OCP3 ir ar līdzīgu daļiņu izmēru kā OCP1, tomēr OCP2 un OCP3 SSA (attiecīgi $66 \pm 5 \text{ m}^2/\text{g}$ un $63 \pm 8 \text{ m}^2/\text{g}$) ir nedaudz lielāks par OCP1 SSA.

OCP fāzes veidošanās kinētika

OCP3 (10 g) sintēzē tika novērota detalizēta OCP fāzes veidošanās gaita atkarībā no laika. Kopējais sintēzes laiks bija 180 h, un visu sintēzes laiku tika kontrolēts pH. Sintēzes monitoringa laikā uzmanība tika pievērsta visu klātesošo fāžu XRD maksimumiem un reakcijas vides pH svārstībām. Lai vizualizētu pakāpenisku kristālisko fāžu pāreju no LT- α -TCP kā sākotnējās fāzes uz LT- α -TCP, DCPD un OCP maisījumu un visbeidzot – tīru OCP fāzi, tika izmantotas XRD ainas (5. att.) [54, 55]. XRD ainās atzīmēti maksimumi pie $2\theta = 4,7^\circ$, $2\theta = 9,4^\circ$ un $2\theta = 9,7^\circ$ 2θ , kas atbilst OCP trikļinai struktūrai, $2\theta = 11,7^\circ$, $2\theta = 20,9^\circ$ un $2\theta = 29,2^\circ$, kas atbilst DCPD monokļinai struktūrai, un $2\theta = 12,1^\circ$, $2\theta = 22,1^\circ$ un $2\theta = 22,9^\circ$, kas atbilst LT- α -TCP monokļinai struktūrai.



5. att. OCP3 sintēze: XRD ainas, kas parāda pāreju no LT- α -TCP caur DCPD uz OCP fāzi, ko papildina pH izmaiņas. References ainas (ICDD) atbilst HAp, OCP un DCPD galvenajiem maksimumiem [46].

Reakcijas vides pH izmaiņas palīdz noteikt fāžu pārejas pamatā esošo ķīmisko fonu (izmantojot ķīmiskos vienādojumus), jo jonu (piemēram, OH^- , H^+) izdalīšanās tieši ietekmē šķīduma pH. Vispārējais ķīmiskais vienādojums, kas attēlo LT- α -TCP hidrolīzi par OCP, ir šāds:



Šis vienādojums liecina par šķīduma pH palielināšanos, kas ir saistīta ar tiešu PO_4^{3-} iekļaušanos OCP fāzē un līdzvērtīgu šķīstošā kalcija hidroksīda ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) izdalīšanos. Kā redzams no *XRD* ainām, hidrolīzes laikā kā starpfāze veidojās DCPD, kas šajā vienādojumā nav parādīts, tāpēc vispārējā ķīmiskā reakcija nav atbilstoša. Ņemot vērā novērotās pH izmaiņas (5. att.), sadarbībā ar Tulūzas Universitātes profesoru Kristianu Reju (*Christian Rey*) pāreja no LT- α -TCP uz OCP tika sadalīta vairākos atsevišķos posmos, kā izklāstīts turpmāk.

1. Šķīšanas posms

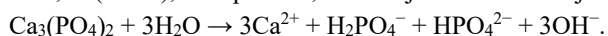
Pirms LT- α -TCP pievienošanas ortofosforskābes šķīduma pH bija $2,80 \pm 0,15$, bet pēc prekursora pievienošanas šķīduma pH strauji pieauga un stundas laikā nostabilizējās pie pH $6,69 \pm 0,08$. Šis sākotnējais etaps atbilst LT- α -TCP straujai šķīšanai, un to var attēlot ar vienādojumu: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{Ca}^{2+} + \text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{HPO}_4^{2-} + 3\text{OH}^-$. Turklāt šķīšanas laikā notiek OH^- izdalīšanās, kā rezultātā reakcijas vides pH tuvojas neitrālam pH, kas saistīts ar ortofosfāta anjonu buferēšanas diapazonu. Izmantojot SEM, novērotas izteiktas fāžu izmaiņas. Redzami plāni pavedienveida LT- α -TCP kristāli, un šķīšanas rezultātā LT- α -TCP aglomerātos veidojas nelieli adatveida vai plākšņveida kristāli (6. att., 1 h).

2. Nogulsšanās posms

Ņemot vērā LT- α -TCP šķīdību un tā sākotnējo šķīšanu skābē, kas tuvina šķīduma pH bāziskam, iegūtais šķīdums ir pārsātināts attiecībā pret OCP, DCPD un pat HAp. Tomēr HAp veidošanās ir maz iespējama, salīdzinot ar abām pārējām fāzēm, to labākas nukleācijas un augšanas spējas (straujākas kristalizācijas) dēļ [56, 57].

3. DCPD un OCP fāžu veidošanās posms

Pateicoties piemērotākam DCPD kristālu augšanas ātrumam, LT- α -TCP pārvēršanās par DCPD notiek ātrāk nekā LT- α -TCP pārvēršanās par OCP. Procesu, kā rezultātā pH pieaug līdz $7,32 \pm 0,07$ (5. att.), var aprakstīt, izmantojot šādu vienādojumu:



XRD ainas atbilst ķīmiskajam vienādojumam, un pie augstākās pH vērtības (48 h, OCP3 sintēze) maksimuma (020) pie $2\theta = 11,7^\circ$, intensitāte ievērojami pieaug, salīdzinot ar jebkuru citu difrakcijas maksimumu, liecinot par DCPD klātbūtni (5. att.). Nepārtrauktā hidrolīzes procesā sistēmā veidojās OCP un DCPD maisījums. SEM rezultāti apstiprina, ka, palielinoties DCPD daudzumam, notiek pakāpeniska pāreja no pavedienveidīgām daļiņām uz lielākām un biežākām plākšņveida daļiņām (6. att., 24 h, 30 h, 48 h). Lielāki un ievērojami masīvāki plākšņveida kristāli attiecināmi uz DCPD (6. att., 30 h, dzeltenā bultiņa), savukārt mazāki un plānāki plākšņveida kristāli – uz OCP (6. att., 30 h, dzeltenais aplis). Tomēr abu fāžu augstās morfoloģiskās līdzības dēļ tās ir grūti atšķirt.

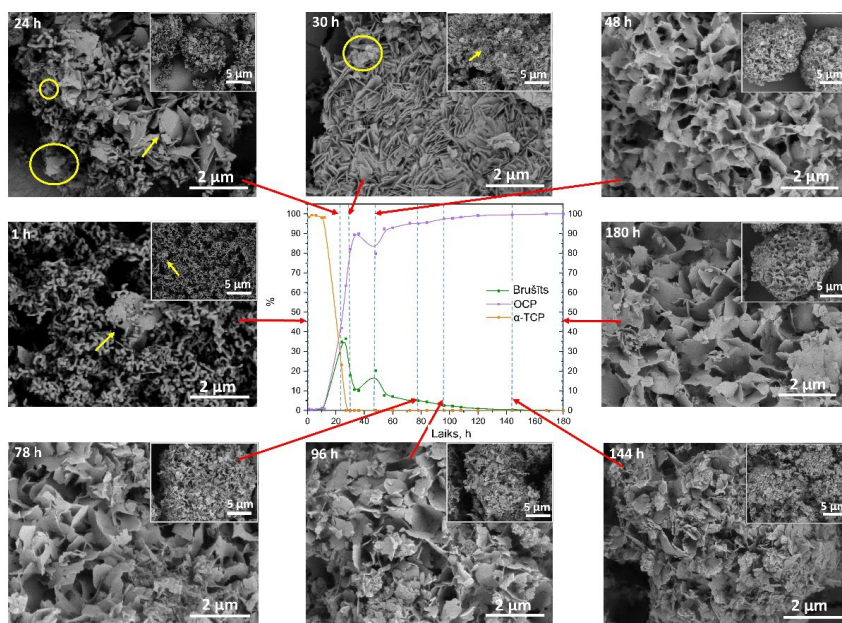
4. Fāžu pārejas posms no DCPD uz OCP

Pēc LT- α -TCP pilnīgas izšķīšanas DCPD kļūst par sistēmas vislabāk šķīstošo fāzi un OCP prekursoru, kā parādīts vienādojumā



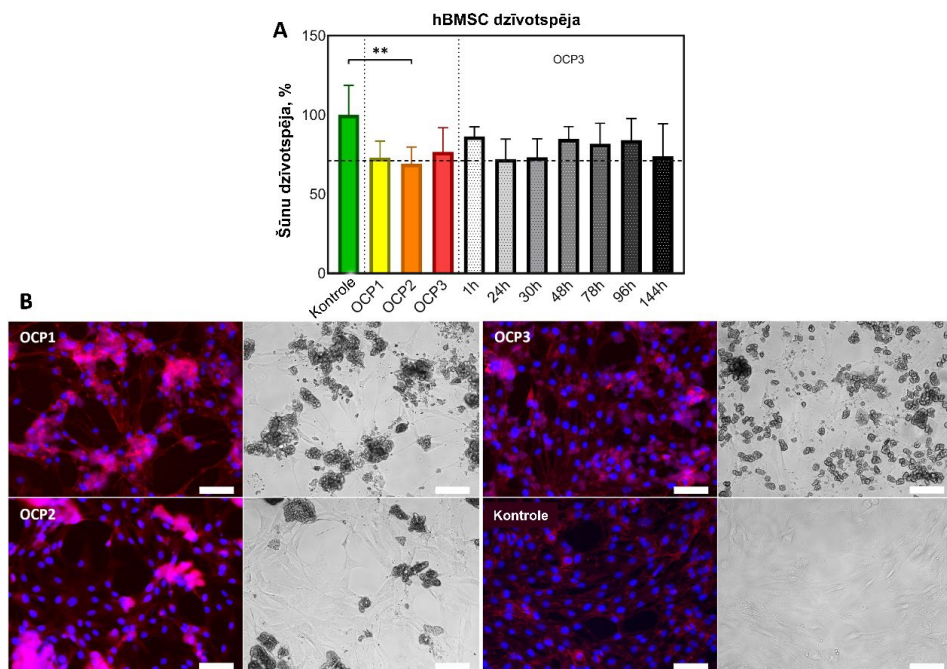
Šī reakcija izraisa protonu izdalīšanos šķīdumā, kas kopā ar fosfātu vides buferējošajām īpašībām pazemina pH līdz $6,44 \pm 0,05$. Sintēzes beigās tika konstatēta OCP raksturīgā plāksņveida morfoloģija, lielāko daļu fragmentācija un sfērisku agregātu klātbūtne (6. att., 180 h).

OCP un starpfāžu veidošanās tika mērīta kvantitatīvi, izmantojot Rītvelda metodi, un rezultāti kopā ar morfoloģijas izmaiņām atspoguļoti 6. attēlā [55]. Fāžu pāreja sākas no 100 % LT- α -TCP (1 h) līdz ~ 37 % DCPD/~ 63 % OCP (27 h) un beidzas ar ~ 100 % OCP.



6. att. OCP sintēzes procesā iegūto produktu SEM mikrofotogrāfijas (mērogs ir 5 μ m un 2 μ m), kas savienotas (sarkanā bultiņa) ar attiecīgo laika punktu (pārtrauktā līnija) fāžu saturu diagrammā, kas konstruēta pēc *XRD* kvantitatīvajiem datiem. Dzeltenā bultiņa norāda uz potenciālajām DCPD daļiņām, dzeltenais aplis marķē potenciālās OCP plāksnītes [46].

Lai pārbaudītu, vai mērogotā tehnoloģija ietekmē OCP citosaderību, OCP3 sintēzes starpprodukti un galaprodukti tika pakļauti tiešam kontaktam ar cilvēka kaulu mezenhimālajām cilmes šūnām (hBMSC), un rezultāti tika salīdzināti ar OCP1 un OCP2 (7. A att.). Kontrollei tika izmantotas šūnas, kas kultivētas uz polistirola šūnu kultivēšanas plātes bez CaP pulvera paraugiem. Rezultāti liecina, ka šūnu metaboliskā aktivitāte ir $> 80\%$. Tas apliecina, ka gadījumā, ja tehnoloģija tiktu mērogota uz vēl lielākiem apjomiem, nelieli starpproduktu piemaisījumi, kā arī galaprodukti būtu droši kaulaudu šūnām. Vizuālā analīze, izmantojot imūnfluorescences krāsošanu, kuras mērķis ir parādīt šūnu morfoloģiju, liecina par iespējamu CaP daļiņu internalizāciju hBMSC šūnās, kas pakļautas tiešam kontaktam ar pulveriem (7. B att.).

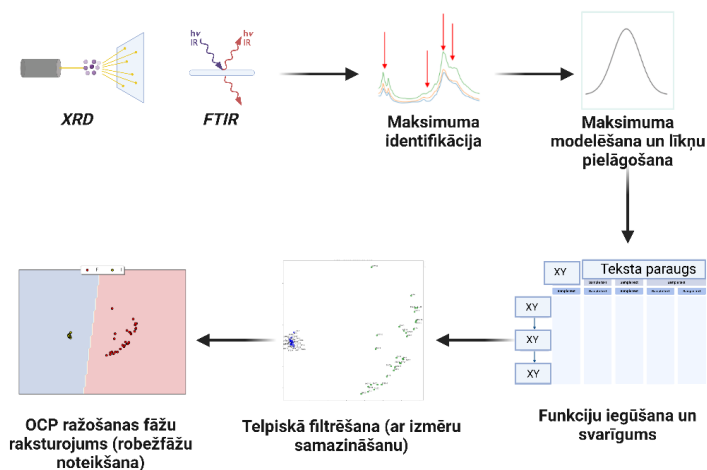


7. att. A – *In vitro* šūnu dzīvotspēja tiešā kontaktā ar OCP1, OCP2, OCP3 un OCP3 sintēzes starpfāzēm (pamatojoties uz vienfaktora dispersiju analīzi ANOVA Tukeja (*Tukey*) korekciju, būtiskas atšķirības starp paraugu grupām tika atzīmētas $** p \leq 0,01$); B – hBMSCs morfoloģija trešajā kultivēšanas dienā tiešā kontaktā ar OCP paraugiem (OCP1, OCP2, OCP3 pulveru koncentrācija 0,5 mg/mL). Kontrolē tika izmantotas šūnas, kas kultivētas uz polistirola šūnu kultivēšanas plates. Imunofluorescences (kreisās puses kolonnas) un gaišā lauka (labās puses kolonnas) mikroskopija. Mērogs – 125 μ m.

Sintēzes attīstības gaitas (LT- α -TCP \Rightarrow OCP) *in silico* modeļa izveide

Visaptverošu laboratorijas eksperimentu veikšana ir būtiska biomateriālu ražošanā un novērtēšanā. Šādi eksperimenti ietver sintēzi un raksturošanu, kā arī virsmas fizikāli ķīmisko īpašību un bioloģiskās mikrovides biosaderības izpēti. Tomēr CaP ķīmiskais sastāvs ir ārkārtīgi daudzveidīgs, un atkarībā no konkrētiem eksperimenta apstākļiem var veidoties daudzas fāzes. Turklāt faktiskie eksperimenta apstākļi var nedaudz atšķirties no plānotajiem, un to var izskaidrot ar tādiem faktoriem kā eksperimentālās kļūdas un tuvinājumi. Lai virzītos uz jauno mākslīgā intelekta (*AI*) laikmetu un stiprinātu sadarbību ar Austrumu Pjemonas Universitāti, kopā ar *M. Nascimben et al.* [58] promocijas darba gaitā izstrādāta automatizēta analīzes secība, kas paredzēta, lai izveidotu lēmumu atbalsta sistēmu sintēzes progresa uzraudzībai no LT- α -TCP uz OCP.

Mērķis bija apvienot skaitļošanas protokolus, kas ļauj noteikt sintēzes stadiju (vai tās iespējamās beigas), un datus, kas iegūti no OCP3 sintēzes (10 g iznākums, 180 h) *XRD* ainām un *FTIR* spektriem. Analīzes secība ietvēra mašīnmācīšanās (*ML*) paņēmienus funkciju ranžēšanai, telpiskajai filtrēšanai un dimensionalitātes samazināšanai, kas nepieciešams, lai precizētu sintēzes posmu automātisko atpazīšanu (8. att.).



8. att. Mašīnmācīšanās metodes izveides procesa shēma, lai noteiktu OCP veidošanās posmus, pamatojoties uz iegūtajām *XRD* ainām un *FTIR* spektriem [58].

Sintēzes norise tika raksturota, izmantojot *XRD* un *FTIR* datus (sk. iepriekšējo nodaļu). Pirmie divi sintēzes laika punkti (t. i., 1 h un 24 h) tika izvēlēti kā sintēzes sākumposma, pēdējie divi laika punkti (144 h un 180 h) – kā sintēzes beigu posma raksturotāji. Pēc tam šie dati tika pakļauti priekšapstrādei, ko izmanto *ML* (saukta par telpisko filtrēšanu), kas uzlabo dažādu *XRD/FTIR* grupu atdalīšanu. Iegūtā datu apakškopa tika izmantota, lai atpazītu OCP veidošanās posmus.

OCP sintēzes un raksturošanas pieredzes apvienojums ar izstrādātu algoritmu, kas spēj noteikt, kādā stadijā ir OCP veidošanās, ir devis daudzsološu pamatu lēmumu atbalsta sistēmai, kas īpaši pielāgota OCP sintēzes uzraudzībai. *XRD/FTIR* datu kopu un mākslīgā intelekta integrācija ļautu pētniekiem izveidot stabilāku un informatīvāku pazīmju kopu *ML* modeļa apgūšanai, kas ļautu izveidot līdzsvarotāku un precīzāku modeli ar samazinātu novirzi un dispersiju.

OCP pielietojuma potenciāls

OCP kā vienai no svarīgākajām kaulaudu neorganiskās fāzes sastāvdaļām ir plašas pielietošanas iespējas kaulaudu inženierijā. Tā nozīme ir saistīta ar spēju izdalīt cilvēka organismam svarīgos kalcija un fosfāta jonus, kas ir būtiski, lai regulētu jaunu kaulu veidošanos. Līdz šim OCP ir izmantots kā kaulu cements [34], kompozītmateriāla pamatne ar dažādiem polimēriem (algināts, želatīns, kolagēns, PEGT u. c.) [35–37], kā pārklājums uz titāna vai titāna sakausējuma implantiem [29, 38] un kā zāļu/jonu piegādes sistēma [23], taču biomateriālu uz OCP bāzes klīniskais pielietojums patlaban ir tikai sākuma stadijā.

Lai pārliecinātos par OCP bioloģisko potenciālu un tuvinātu to klīniskam pielietojumam, promocijas darba otrajā daļā OCP tika izmantots divu kompozītbiomateriālu izstrādē biomedicīnas jomai. Pirmkārt, OCP tika modificēts ar doksorubicīna hidrohlorīdu, lai izveidotu efektīvu zāļu piegādes sistēmu kaulu vēža ārstēšanai. Otrkārt, OCP tika sajaukts ar alginātu, lai iegūtu kompozītmateriāla pārklājumu uz 3D drukātiem titāna sakausējumiem un pārbaudītu, vai tas var uzlabot to izturību pret koroziju.

Oktakalcija fosfāts un doksorubicīna hidrohlorīds. Jauna zāļu piegādes sistēma vēža ārstēšanai

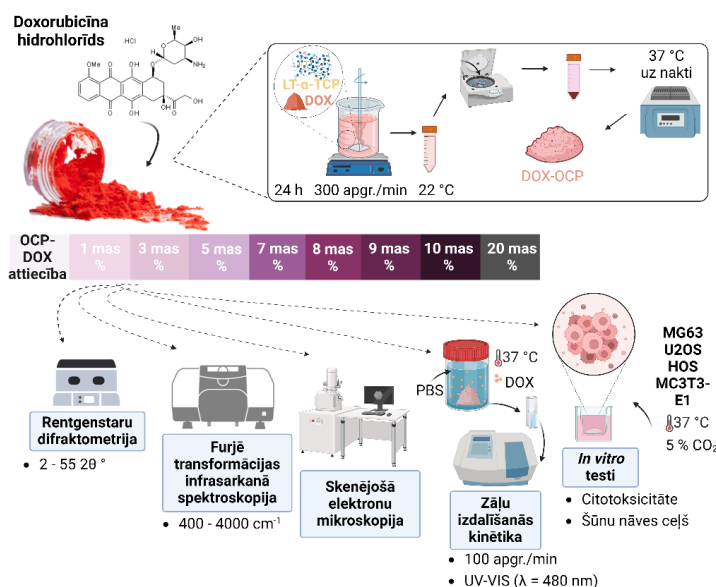
Doksorubicīna hidrohlorīds (DOX, doksorubicīns), kas tiek iegūts no *Streptomyces peucetius var. caesius*, kas šķīst ūdenī un ir gaismjutīgs, ir viens no plašāk izmantotajiem pretvēža zāļu pārstāvjiem [59]. Neskatoties uz to, ka DOX ir efektīvs antineoplastisks līdzeklis, tas var izraisīt sistēmisku toksicitāti, sākot ar sliktu dūšu un beidzot ar palielinātu doksorubicīna izraisītas kardiomiopātijas risku [60, 61]. Turklāt tikai neliela daļa no jebkuras sistēmiski ievadītas devas sasniedz ķirurģiskās operācijas vietu, tāpēc lokālu pretvēža piegādes sistēmu izmantošana varētu būt risinājums, lai sasniegtu augstas aktīvo vielu koncentrācijas vēža skartajā vietā. Programmētas šūnu nāves (*PCD*) raksturīgo ceļu, piemēram, apoptozes, nekrozes vai ferroptozes, izpēte ir ļoti svarīga audu inženierijā (lai imitētu dabisko audu attīstību), zāļu izstrādē (zāles iedarbojas, inducējot vai inhibējot *PCD*), terapeitiskajās stratēģijās un normālā šūnu attīstībā (nevēlamo vai bojāto šūnu likvidēšanā) [62, 63]. Ņemot vērā, ka iekššūnu ceļu darbības traucējumi ir arī potenciāls vēža ierosinātājs cilvēka organismā, izpratne par to, vai *PCD* ir saistīta ar apoptozi (šūnu bojāeja, kas notiek kā normāla un kontrolēta šūnu attīstības daļa) vai ferroptozi (šūnu bojāeja, ko izraisa ģenētiskas izmaiņas dzelzs homeostāzē), var palīdzēt izstrādāt inovatīvas zāļu piegādes sistēmas vēža ārstēšanai nākotnē.

OCP sintēze tiek veikta istabas temperatūrā, savukārt vairākums zāļu ir jutīgas pret paaugstinātām temperatūrām, tāpēc OCP modificēšana ar aktīvajām vielām *in situ* OCP sintēzes laikā varētu būt potenciāla metode doksorubicīnu saturoša oktakalcija fosfāta (OCP-DOX) iegūšanai. Turklāt, izvēloties šādu stratēģiju, varētu panākt, ka aktīvā viela OCP struktūrā tiek iekļauta jau no paša OCP sintēzes sākuma, tādējādi nodrošinot augstu aktīvās vielas saturu OCP daļiņās [41]. Ņemot vērā to, ka α -TCP pārveidošanās gaitā par OCP notiek OH^- un HPO_4^{2-} izdalīšanās un šiem izdalītajiem joniem ir nozīme OCP hidratētā slāņa

veidošanās procesā, iespējams, ka, pievienojot DOX jau OCP sintēzes sākuma posmā, tiku panākta aktīvās vielas iekļaušanās OCP hidratētajā slānī. Papildus minētajam, OCP lielais īpatnējais virsmas laukums un tā plāksņveida daļiņu morfoloģija potenciāli padara OCP efektīvāku un labvēlīgāku šūnu atbildes reakcijās. Tādējādi, promocijas darbā izstrādājot inovatīvas DDS, uzsvars tika likts uz trīs galvenajiem iegūtā DOX-OCP īpašību raksturošanas posmiem.

1. **Iegūtā DOX-OCP fizikāli ķīmiso īpašību novērtējums** pēc tam, kad tas tika funkcionalizēts ar DOX plašā koncentrāciju diapazonā (no 1 masas% līdz 20 masas% no LT- α -TCP satura).
2. **In vitro doksorubicīna izdalīšanās kinētikas novērtējums** sešu nedēļu periodā.
3. **DOX-OCP in vitro biosaderības un PCD mehānisma novērtējums**.

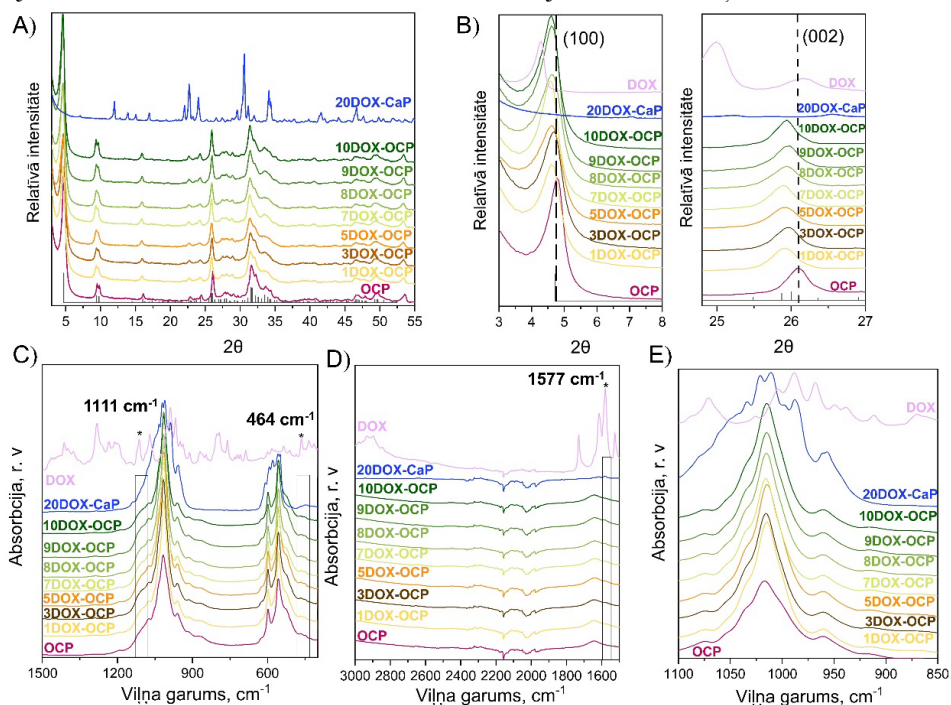
Shematiskais attēlojums DOX-OCP kā zāļu piegādes sistēmas izstrādei redzams 9. attēlā [64].



9. att. Doksorubicīnu saturoša okta-kalcija fosfāta izstrādes un raksturošanas pieejas shematiskais attēlojums.

Lai pārbaudītu kā DOX saturs ietekmē OCP fāzes veidošanos, OCP sintēzes vidē tika pievienoti 1 masas%, 3 masas%, 5 masas%, 7 masas%, 8 masas%, 9 masas%, 10 masas% un 20 masas% aktīvās vielas (no sākotnējā LT- α -TCP daudzuma, 1DOX-OCP, 3DOX-OCP, 5DOX-OCP, 7DOX-OCP, 8DOX-OCP, 9DOX-OCP, 10DOX-OCP, 20DOX-CaP), un sintēze ilga 24 stundas. Izmantojot XRD analīzi, detektēti raksturīgie OCP difrakcijas maksimumi (zema leņķa (100) maksimums pie $2\theta = 4,7^\circ$ un dublets (200) un (010) pie $2\theta = 9,4^\circ$ un $2\theta = 9,7^\circ$) sintēžu produktos, kam tika pievienots līdz 10 masas% DOX (10. A, B att.). Salīdzinot ar tīru OCP, DOX-OCP difraktogrammās bija vērojama neliela maksimumu, pie $2\theta = 4,7^\circ$ un $2\theta = 26,1^\circ$, nobīde uz zemākiem 2θ grādiem un difrakcijas maksimumu intensitātes izmaiņas, liecinot par kristāliskā režģa izplešanos DOX-OCP sistēmā, kas savukārt liecina par aktīvās

vielas iekļaušanos OCP kristāliskajā struktūrā. Turklāt tika novērots, ka OCP struktūras stabilizācija ir atkarīga no DOX daudzuma, kas izmantots OCP-DOX sintēzē. Iegūtie rezultāti parādīja, ka, ja pievienotā DOX daudzums pārsniedz 10 masas% (no sākotnējā LT- α -TCP daudzuma), tas kavē c as augšanu OCP struktūrā un destabilizē kopējo transformācijas procesu no LT- α -TCP uz OCP. Pēc rūpīgas *XRD* ainu analīzes secināts, ka, DOX daudzumam pārsniedzot 10 masas% (no sākotnējā LT- α -TCP daudzuma), saglabājas LT- α -TCP raksturīgie maksimumi pie 12,1 un 30,7 2 θ grādiem ar dubultiem maksimumiem pie aptuveni 2 θ = 22,8° un 2 θ = 34° (10. A, B att.) [64]. Šie rezultāti liecina, ka DOX tika adsorbēts uz LT- α -TCP daļiņu virsmas jau OCP sintēzes sākumā, kavējot LT- α -TCP šķīšanas procesu, tādējādi sintēzes gaitā veidojot LT- α -TCP-DOX DDS, nevis DOX-OCP, kas bija definētais mērķis.

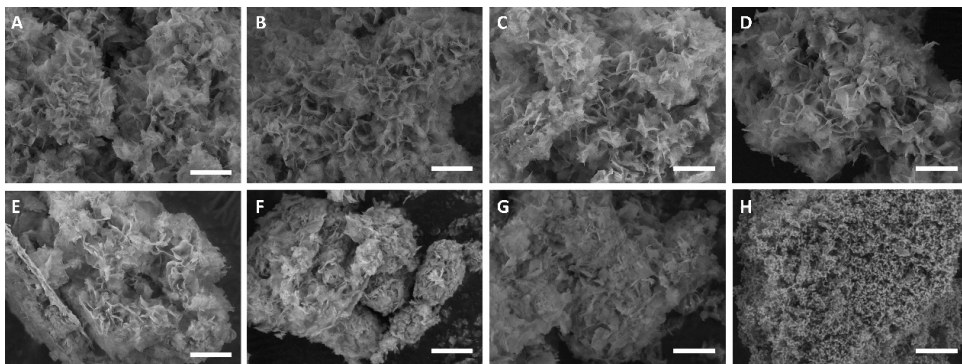


10. att. DOX-OCP fizikāli-ķīmisko īpašību profils: A – *XRD* ainās, kur *ICDD* ieraksts Nr. 026-1056 atbilst OCP triklīnajai fāzei; B – OCP un DOX-OCP *XRD* ainās. Maksimumi pie 2 θ = 4,7° un 2 θ = 26,1° atbilst attiecīgi (100) un (002) plaknēm; C, D – DOX-OCP *FTIR* spektri. Zvaigznīte un apvienojošās iekavas (C un D attēlos) apzīmē joslas, kas ir izmainījušās DOX iekļaušanas dēļ.

FTIR rezultātu analīze parādīja, ka visiem iegūtajiem DOX saturošajiem produktiem (izņemot 20DOX-CaP) ir novērojamas tipiskas OCP fāzei raksturīgas absorbcijas joslas (10. C, D att.): PO₄³⁻ ν_3 svārstības pie 1077 cm⁻¹, 1296 cm⁻¹ un 1120 cm⁻¹, PO₄³⁻ ν_4 svārstības pie 524 cm⁻¹, 560 cm⁻¹, 601 cm⁻¹ un 627 cm⁻¹, kā arī P-OH svārstības pie 917 cm⁻¹ un 861 cm⁻¹. Papildus DOX-OCP *FTIR* spektros tika novērotas salīdzinoši nelielas absorbcijas joslu izmaiņas, kas saistītas ar DOX klātbūtni izveidotajās zāļu piegādes sistēmās. Šīs izmaiņas redzamas kā pieaugoša absorbcijas joslas intensitāte 1570 cm⁻¹ apgabalā, kas liecina par

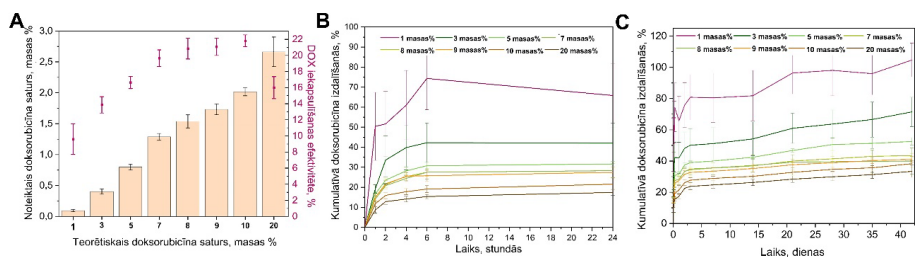
antisimetriskām COO^- saišu svārstībām. Turklāt konstatēts, ka DOX izteiktais maksimums pie $\sim 1111 \text{ cm}^{-1}$ palielina PO_4^{3-} ν_3 absorbcijas joslas platumu, līdz ar to DOX-OCP *FTIR* spektros, palielinoties DOX saturam OCP, var novērot aizvien izteiktāku pleca joslu (10. C att.). Analizējot ar $\text{HPO}_4(5)$ saistītās svārstības pie 1193 cm^{-1} , secināts, ka, palielinoties DOX saturam OCP, to intensitāte samazinās, kas liecina par būtisku $\text{HPO}_4(5)$ grupu samazināšanos, liecinot par OCP hidrolīzes sākumu par CDHAp.

Analizējot skenējošās elektronu mikroskopijas datus, secināts, ka, palielinoties DOX daudzumam paraugos, OCP plākšņveida daļiņām ir tendence vairāk pārkļāties citai ar citu, veidojot aglomerātus izmēru $1\text{--}20 \text{ }\mu\text{m}$ diapozonā (11. A–G att.). Arī SEM mikrografijas apstiprināja *XRD* un *FTIR* datu analīzē konstatēto, ka paraugos, kas sintezēti, izmantojot 20 masas% DOX (no sākotnējā LT- α -TCP daudzuma), novērojama OCP fāzes inhibīcija, par ko liecina LT- α -TCP raksturīgo iegareno graudaino daļiņu saglabāšanās gala produktā (11. H att.) [64].



11. att. DOX-OCP (1-10 masas%) un DOX-CaP (20 masas%) SEM mikrografijas: A – 1 masas%; B – 3 masas%; C – 5 masas%; D – 7 masas%; E – 8 masas%; F – 9 masas%; G – 10 masas% un H – 20 masas%; mērogs – $5 \text{ }\mu\text{m}$.

Analizējot DOX saturu DOX-OCP *DDS*, secināts, ka, ja teorētiskais sintēzē izmantotais DOX daudzums (no sākotnējā LT- α -TCP daudzuma) bija 1, 5 un 10 masas%, tad attiecīgi DOX saturs DOX-OCP *DDS* sasniedza $0,093 \pm 0,01$ masas% ar iekļaušanas efektivitāti $9,6 \pm 1,9 \%$, $1,54 \pm 0,1$ masas% ar iekļaušanas efektivitāti $20,85 \pm 1,29 \%$ un $2,02 \pm 0,06$ masas% ar iekļaušanas efektivitāti $21,8 \pm 0,73 \%$ (12. A att.). Ja OCP sintēzē tika izmantoti 20 masas% DOX, kas inhibēja OCP fāzes veidošanos, izveidotajā DOX-CaP sistēmā tika konstatēts vislielākais DOX saturs – $2,66 \pm 0,24$ masas%. Tai pat laikā DOX iekļaušanas efektivitāte bija salīdzinoši zema – $15,99 \pm 1,36 \%$. Iespējams, uz LT- α -TCP virsmas adsorbētais DOX kavē OCP veidošanos, vienlaikus uzrādot lielāku detektēto zāļu saturu [64].



12. att. A – kopējais DOX saturs un DOX iekļaušanas efektivitāte DOX saturošos CaP paraugos; B – DOX sākotnējā straujā izdalīšanās pirmajās 24 stundās (%) un C – kopējais izdalītais DOX daudzums sešu nedēļu periodā (%).

Analizējot DOX izdalīšanos no pagatavotajām DOX-OCP piegādes sistēmām, tika novērots, ka pirmajās 24 stundās notiek strauja DOX izdalīšanās (~ 17–75 % no kopējā DOX daudzuma DDS; 12. B att.), kam seko ilgstoša un vinnērīga aktīvās vielas izdalīšanās (12. C att.). Doksorubicīna molekulu sākotnējo straujo izdalīšanos no OCP virsmas var saistīt ar aktīvās vielas fizikālo adsorbciju, ko izraisa elektrostatiskie spēki vai ūdeņraža saites. Tas notiek starp pozitīvi lādētām DOX molekulām un negatīvi lādēto OCP. Turpretī DOX turpmāku izdalīšanos var izskaidrot ar spēcīgu ķīmisko mijiedarbību (Ca-O), kas kavē zāļu izdalīšanos no DOX-OCP zāļu piegādes sistēmas [64]. Turklāt pētījumā tika konstatēts, ka kumulatīvās izdalīšanās procentuālais plato ir apgriezti proporcionāls teorētiskajam doksorubicīna saturam. Piemēram, 5DOX-OCP gadījumā $23,6 \pm 1,6$ % ($28,00 \pm 3,68$ μg) DOX izdalījās pēc divām stundām, $38,9 \pm 1,3$ % ($46,3 \pm 4,2$ μg) DOX pēc 72 stundām un $52,5 \pm 2,3$ % ($62,3 \pm 5,8$ μg) DOX pēc 42 dienām. Savukārt 10DOX-OCP gadījumā pēc divām stundām izdalījās $15,9 \pm 1,3$ % DOX, pēc 72 stundām – $27,7 \pm 1,7$ % DOX un pēc 42 dienām – $38,3 \pm 2,0$ % DOX.

Papildus tika novērots – jo mazāks ir doksorubicīna saturs DOX-OCP, jo ātrāk aktīvā viela izdalās. Šo novērojumu var izskaidrot ar OCP fāzes pārveidošanos par kalcija deficīta hidroksilapatītu [64, 65], kas novērots 1DOX-OCP zāļu piegādes sistēmām. Tika arī noteikts, ka visu DOX-OCP gadījumā aktīvā viela no DDS izdalās pakāpeniski un izdalīšanās profils atbilst Froindliha izotermi [65].

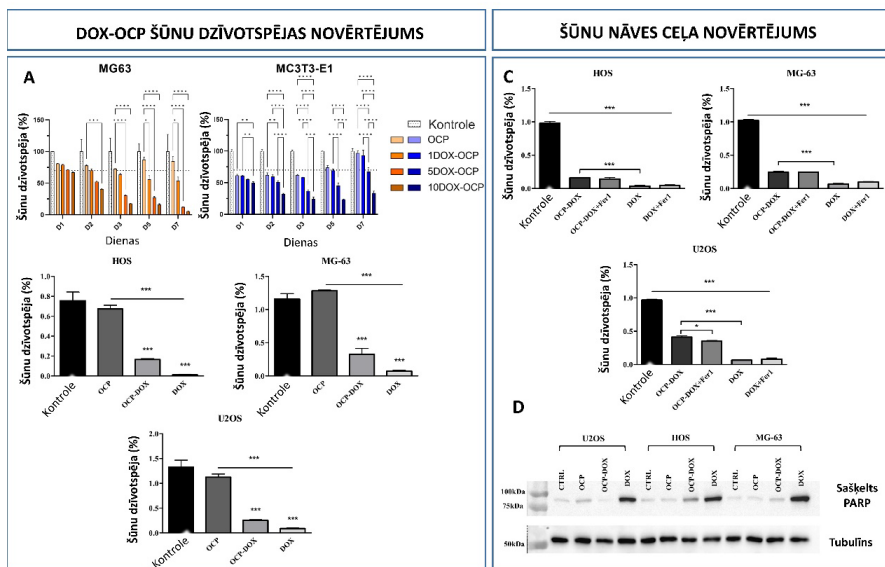
In vitro testi

Lai salīdzinātu šūnu atbildes reakciju uz izveidotajām DOX-OCP zāļu piegādes sistēmām, tika pētīta to ietekme uz MG63 (vēža šūnas) un MC3T3-E1 (preosteoblastiskas šūnas) šūnām. Abu šūnu līniju izmantošana pētījumā ļauj visaptveroši analizēt sistēmas efektivitāti kaulu vēža ārstēšanā, sniedzot ieskatu par tās potenciālu metastāžu samazināšanā, kā arī ļauj spriest par DOX-OCP ietekmi uz veselajām kaula šūnām.

DOX ietekme uz MG63 un MC3T3-E1 šūnu dzīvotspēju novērtēta, analizējot OCP un DOX-OCP pulverus netiešā kontaktā ar abām šūnu līnijām (13. A att.). Iegūtie rezultāti parādīja, ka šūnu vide, kas apstrādāta ar 1DOX-OCP, 5DOX-OCP un 10DOX-OCP, septiņu dienu laikā nomāca MG63 šūnu dzīvotspēju (attiecīgi samazinot to līdz 54,1 %, 12,4 % un 5,7 %). Tai pat laikā, analizējot paraugu ietekmi uz MC3T3-E1 šūnu līniju, secināts, ka starp trešo un septīto MC3T3-E1 šūnu kultivēšanas dienu tīrs OCP, 1DOX-OCP un 5DOX-OCP uzrādīja šūnu

stimulējošu iedarbību (šūnu dzīvotspēja pieauga no 58,5 % līdz 93,4 % 1DOX-OCP un no 36,9 % līdz 67,4 % 5DOX-OCP gadījumā). Dzīvotspējas pieaugums varētu būt saistīts ar šūnu lēno pielāgošanos pārmaiņu izraisītajam stresam vai ar paaugstinātu Ca^{2+} jonu koncentrāciju šūnu vidē, kas izdalās no OCP, aktivizējot ārpusšūnu kalcija jutīgos receptorus un pastiprinot šūnu vairošanos [64, 66, 67]. 10DOX-OCP inhibējošā ietekme uz šūnu dzīvotspēju bija ievērojami lielāka nekā 5DOX-OCP un 1DOX-OCP, kas ir papildu pierādījums tā izteiktajai inhibējošajai ietekmei uz MG63 šūnām (13. A att.).

Sākotnējie dzīvotspējas testi parādīja, ka DOX-OCP sistēma ir letāla MG63 šūnām visās koncentrācijās, tāpēc tālākai analīzei tika izvēlēta DOX-OCP kompozīcija ar zemāko DOX saturu. Lai mērķtiecīgi novērtētu PCD osteosarkomas šūnās (OS), bija nepieciešama lielāka izmantoto šūnu līniju daudzveidība, jo OS raksturīga augsta ģenētiskā heterogenitāte. Dažādām osteosarkomas šūnu līnijām ir atšķirīgi fenotipi, tāpēc tās var būt ar atšķirīgām diferenciacijas un audzēju veidošanas spējām, līdz ar to ar atšķirīgu reakciju uz noteiktu ārstēšanas veidu. Tāpēc 1DOX-OCP tika atkārtoti testēts, izmantojot U2OS, MG63 un HOS cilvēka vēža šūnu līnijas. Visas trīs izvēlētās šūnu līnijas bieži izmanto zinātniskajos pētījumos, tomēr tām ir ģenētiskas un fenotipiskas atšķirības, kas ir vēlamas daudzpusīgam pirmsklīniskam biomateriāla novērtējumam. Līdzīgi kā iepriekš, iegūtie rezultāti liecināja par ievērojamu visu pētīto osteosarkomas šūnu dzīvotspējas samazināšanos 1DOX-OCP iedarbības rezultātā (MG63 – $0,32 \pm 0,2$ %, HOS – $0,17 \pm 0,02$ % un U2OS – $0,25 \pm 0,02$ % no šūnu dzīvotspējas) (13. B att.). Šūnu dzīvotspējas atšķirības starp 1DOX-OCP un DOX var būt saistītas ar tūlītēju zāļu pieejamību to galīgajā koncentrācijā pozitīvās kontroles grupā (DOX), savukārt doksorubicīns no 1DOX-OCP laika gaitā izdalījās pakāpeniski, kas atbilst *in vitro* zāļu izdalīšanās pētījuma rezultātiem (12. B, C att.). Lai noskaidrotu, vai OS šūnu jutība pret ferroptozī palielināsies, DOX-OCP tika pievienots ferroptozes inhibitors Ferrostatīns-1 (Fer-1) [68]. Iegūtie rezultāti neuzrādīja būtiskas OS šūnu dzīvotspējas izmaiņas (13. C att.) 1DOX-OCP+Fer-1 klātbūtnē, salīdzinot ar 1DOX-OCP (13. C att.), tāpēc secināts, ka ferroptoze nav saistīta ar DOX-OCP izraisīto šūnu nāvi. Ņemot vērā to, ka ferroptoze tika izslēgta, nākamais solis bija apoptozes pārbaude, pārbaudot šķeltās poli (ADP-ribozes) polimerāzes (PARP) līmeni [69, 70], ko uzskata par apoptozes pierādījumu, izmantojot Vesternblota metodi. Rezultāti uzrādīja palielinātu šķeltās PARP ekspresiju HOS un MG-63 šūnās, kas tika pakļautas 1DOX-OCP iedarbībai, apstiprinot apoptotiskās šūnu nāves indukciju (13. D att.) [64]. *In vitro* testi tika veikti sadarbībā ar Dr. E. Panczišinu (E. Panczyszyn) no Austrumu Pjemontas universitātes Itālijā (University of Eastern Piedmont) un Dr. O. Demiru no Rīgas Tehniskās universitātes.



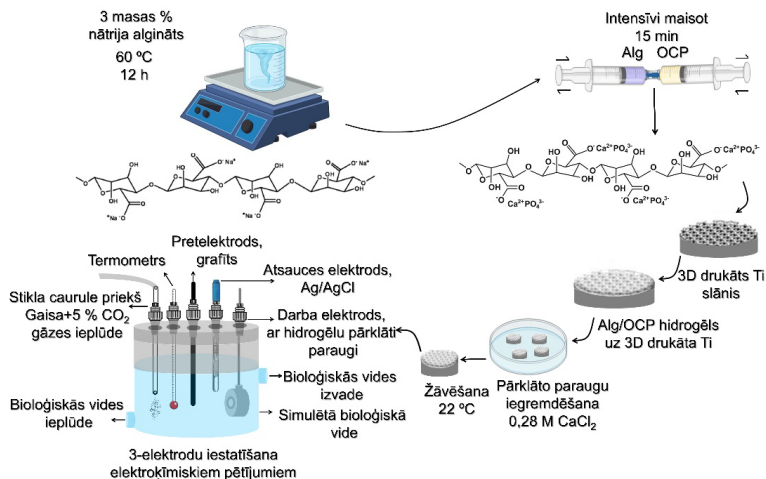
13. att. Šūnu dzīvotspējas pētījumi DOX-OCF klātbūtnē: A – MG63 šūnu un MC3T3-E1 šūnu dzīvotspējas pārbaude OCP, 1DOX-OCF, 5DOX-OCF un 10DOX-OCF pulveru klātbūtnē; B – OS šūnu jutība pret 1 masas% DOX saturošu OCP pulveri, OCP un DOX; C – U2OS, HOS un MG63 šūnu dzīvotspēja kombinācijā ar 10 μ M Fer1 (OCP-DOX+Fer-1, DOX+Fer-1); D – sašķeltā PARP proteīnu līmenis. Histogrammās attēlota vidējā vērtība \pm standartnovirze; n = 3; statistiski nozīmīgas atšķirības: * pie $p < 0,05$, ** pie $p < 0,005$, *** pie $p < 0,001$, **** pie $p < 0,0001$.

OCF saturoši hidrogēla pārklājumi metāla implantu pretkorozijas noturības uzlabošanai

Titāna sakausējumus (Ti) plaši izmanto kā biomateriālus zobu un ortopēdisko implantu izgatavošanai, galvenokārt to izcilo mehānisko īpašību un biosaderības dēļ. Šiem sakausējumiem fizioloģiskos apstākļos (pH \approx 7) piemīt mērena izturība pret koroziju, jo to virsmas dabiski pārklāj blīvi aizsargājoši oksīdu slāņi. Tomēr iekaisuma apstākļos, kas pazemina vides pH, mijiedarbības ar reaktīvajām skābekļa formām, pienskābi, hidroperoksilradikāļiem un hipohlorskābi (ko leikocīti izdala ārpusšūnu vidē) ietekmē Ti virsmu izturību pret koroziju. Kā vienu no stratēģijām, lai efektīvi uzlabotu metāla implantu izturību pret koroziju, var izmantot Ti virsmas modificēšanu ar hidrogēla pārklājumiem. Lai pārbaudītu, vai OCF daļiņas spēj vēl vairāk uzlabo Ti virsmu pretkorozijas īpašības, tika izveidota sadarbība ar Alto Universitāti. Kopā ar *A. Bordbar-Khiabani et al.* [38] nātrija algināts (Alg) un OCF tika apvienoti kompozītpārklājumā, pārbaudot to elektroķīmiskos raksturlielumus attiecībā uz Ti sakausējumiem.

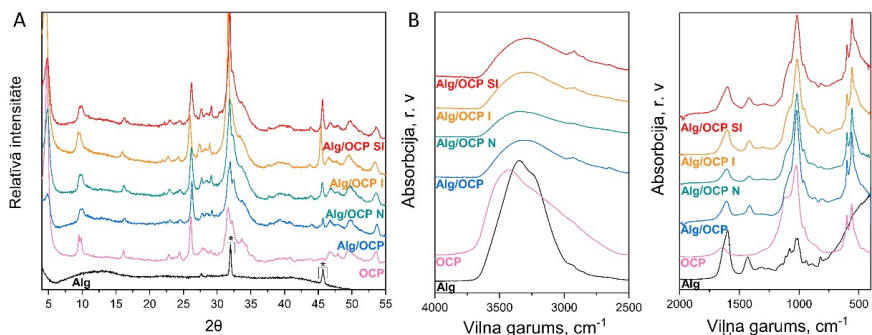
Eksperimentālās gaitas shematiskais attēlojums redzams 14. attēlā. Proti, izmantojot Alg šķīdumu ūdenī (3 masas%) un OCF, tika izveidoti kompozītmateriāli ar neorganiskās/organiskās fāzes attiecību 70 : 30 masas% (turpmāk apzīmēts kā Alg/OCF) un

izmantoti, lai pārklātu 3D drukātu titāna substrātu virsmu. Titāna sakausējuma diski ($d = 10$ mm) – Ti Gr2 un Ti Gr23 sakausējums – tika pārklāti ar aptuveni 10 mg pārklājuma (Alg un Alg/OCP) un salīdzināta to pretkorozijas noturība $37 \pm 0,5$ °C temperatūrā viegli anaerobos apstākļos trīs simulācijas vidēs ar dažādiem pH: pH $7,4 \pm 0,1$ (normāla ķermeņa vide – N), pH $5,2 \pm 0,1$ (iekaisuma vide – I) un pH $3,0 \pm 0,2$ (smaga iekaisuma vide – SI).



14. att. Ar Alg/OCP pārklātu 3D drukātu Ti sakausējumu iegūšana un elektroķīmiskā raksturošana [38].

Pārklājumu fizikāli ķīmiskās īpašības tika raksturotas pirms (apzīmēti kā Alg/OCP) un pēc vienas stundas ilgas iegremdēšanas attiecīgajā vidē – apzīmēti kā Alg/OCP N, I, SI (15. att.). Tika novēroti OCP raksturīgie *XRD* difrakcijas maksimumi, un amorfais platais difrakcijas maksimums, kas bija redzams *XRD* ainā, atbilda nātrija algināta biopolimēram (15. A att.). *FTIR* uzrādīja HPO_4^{2-} svārstības pie 917 cm^{-1} , 875 cm^{-1} , 1007 cm^{-1} un 1295 cm^{-1} , kā arī plašu joslu, kas iecentrēta pie aptuveni 3500 cm^{-1} un kas atbilst hidroksilgrupu svārstībām (15. B att.).



15. att. Alg/OCP pārklājuma fizikāli ķīmiskais raksturojums pirms un pēc iegremdēšanas attiecīgajā vidē (normāla ķermeņa vide – N, iekaisuma vide – I un smaga iekaisuma vide – SI). A – *XRD* ainās; B – *FTIR* spektri dažādos viļņa skaitļa reģionos [38].

Elektroķīmisko impedances spektroskopiju (EIS) parasti izmanto elektroķīmisko procesu raksturošanai, piemēram, metālu aizsargpārklājumu veiktspējas novērtēšanai. Nikvista grafiks tika izmantots kā frekvences raksturlīkne, un Bodes modulis tika izmantots, lai reprezentētu sistēmas pieaugumu un fāzi kā frekvences funkciju. Iegūtie EIS dati un konstantās fāzes elementa (*CPE*) [71] (pārklājuma kapacitātes mērījums, kas parādīts, izmantojot CPE_{dl} (robežvirsmas starp substrātu un šķīdumu) un R_{ct} (pretestība lādiņa pārnesei)) rezultāti ir parādīti un detalizēti izskaidroti *A. Bordbar-Khiabani et al.* zinātniskajā publikācijā [38].

Nikvista grafikos gan iekaisuma, gan smaga iekaisuma apstākļos novērojama kapacitatīvo cilpu diametru samazināšanās, kas liecina par korozijas pretestības samazināšanos [71, 72]. Šo tendenci apstiprina arī Bodes amplitūdas grafiks, kas parādīts impedances moduļa zemo frekvenču diapazonā [38]. R_{ct} vērtības paraugiem ar Alg/OCP pārklājumiem bija ievērojami lielākas ($23,09 \pm 0,10 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ un $25,12 \pm 0,39 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$, kas attiecas uz TiGr2 un TiGr23) nekā 3D drukāta Ti paraugiem bez pārklājumiem ($17,63 \pm 0,33 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ un $20,66 \pm 0,73 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$, kas attiecas uz TiGr2 un TiGr23). Tas liecina, ka Alg/OCP pārklājums efektīvi veido izturīgu barjeru, kavējot korozīvo jonu iekļūšanu substrātā. Turklāt OCP klātbūtne vēl vairāk palielina Alg hidroģēla pretestību (R_c) (piemēram, $12,33 \pm 0,83 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ Alg un $18,84 \pm 0,75 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ Alg/OCP pārklājumam uz TiGr2), kas liecina, ka normālos apstākļos OCP daļiņas var pastiprināt Alg hidroģēla pārklājuma šķērssaistītšanās pakāpi, palielinot pārklājuma blīvumu un sasaistītšanās spēku robežvirsmā starp pārklājumu un substrātu. Tas arīdzan izskaidro lielākas R_c vērtības paraugiem, kas bija pārklāti ar Alg/OCP, salīdzinot ar paraugiem, kas pārklāti ar tīru Alg. Savukārt R_c vērtību samazināšanos, kas novērota pārklātajos paraugos iekaisuma un spēcīga iekaisuma apstākļos (piemēram, I: $7,15 \pm 0,91 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ Alg/OCP un SI: $3,01 \pm 0,53 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ Alg/OCP TiGr2 gadījumā), var skaidrot ar hidroģēlu šķīšanu sālsskābē un ūdeņraža peroksīdā [38, 71].

SECINĀJUMI

1. Desmitkārtējās un simtkārtējās LT- α -TCP hidrolīzes mērogošanas rezultātā var iegūt 1 g un 10 g tīra OCP, tomēr sintēzes iznākuma palielināšanai nepieciešams ilgāks sintēzes laiks – 72 h (1 g OCP) un 180 h (10 g OCP).
2. LT- α -TCP pārveidošanās par OCP notiek caur brušītu kā starpprodukta fāzi.
3. DOX-OCP zāļu piegādes sistēmas sintēzes laikā pievienojot vairāk nekā 10 masas% doksorubicīna no sākotnējā LT- α -TCP daudzuma, tiek kavēta OCP fāzes veidošanās.
4. DOX-OCP ietekmē mainās MG63 un MC3T3 šūnu vairošanās profils, ko ietekmē gan DOX koncentrācijas šūnu vidē, gan DOX-OCP/šūnu vides kontakta laiks.
5. DOX-OCP daļiņas izraisa osteosarkomas šūnu nāvi apoptozes ceļā.
6. OCP daļiņas algināta hidrogeļa matricā palielina elektriskā lādiņa pārneses pretestību pie Ti substrāta un algināta/OCP pārklājuma robežvirsmas.

ATSAUCES

- [1] W. Habraken, P. Habibovic, M. Epple, M. Bohner, Calcium phosphates in biomedical applications: Materials for the future?, *Mater. Today*. 19 (2016) 69–87. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.10.008>.
- [2] S. Ban, J. Hasegawa, T. Jinde, Phase Transformation of Octacalcium Phosphate in vivo and in vitro, *Dent. Mater. J.* 11 (1992) 130–140217. <https://doi.org/10.4012/dmj.11.130>.
- [3] O. Suzuki, G. Insley, *Octacalcium Phosphate Biomaterials*, Woodhead Publishing Series in Biomaterials, 2020.
- [4] S. Liu, B. Wang, S. Fan, Y. Wang, Y. Zhan, D. Ye, Global burden of musculoskeletal disorders and attributable factors in 204 countries and territories : a secondary analysis of the Global Burden of Disease 2019 study, *BMJ Open*. 12 (2022). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2022-062183>.
- [5] B. E. Wilson, S. Jacob, M. L. Yap, J. Ferlay, F. Bray, M. B. Barton, Estimates of global chemotherapy demands and corresponding physician workforce requirements for 2018 and 2040: a population-based study, *Lancet Oncol.* 20 (2019) 769–780. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30163-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30163-9).
- [6] T. Albrektsson, C. Johansson, Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration, *Eur Spine J.* 10 (2001) 96–101.
- [7] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, M. J. Glimcher, Bone mineral: Update on chemical composition and structure, *Osteoporos. Int.* 20 (2009) 1013–1021. <https://doi.org/10.1007/s00198-009-0860-y>.
- [8] H. Yuan, H. Fernandes, P. Habibovic, J. De Boer, A. M. C. Barradas, A. De Ruiter, W. R. Walsh, C. A. Van Blitterswijk, J. D. De Bruijn, Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 13614–13619. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003600107>.
- [9] T. Ariizumi, H. Kawashima, H. Hatano, T. Yamagishi, N. Oike, Osteoinduction and Osteoconduction with Porous Beta-Tricalcium Phosphate Implanted after Fibular Resection in Humans, *J. Biomater. Nanobiotechnol.* 10 (2019) 159–173. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2019.103009>.
- [10] R. Z. LeGeros, Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates, *Clin. Orthop. Relat. Res.* (2002) 81–98. <https://doi.org/10.1097/00003086-200202000-00009>.
- [11] S. V Dorozhkin, M. Epple, Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 3130–3146.
- [12] T. Wach, M. Kozakiewicz, Fast-Versus Slow-Resorbable Calcium Phosphate Bone Substitute Materials — Texture Analysis after 12 Months of Observation, *Materials (Basel)*. 13 (2020) 3854.
- [13] T. J. Brunner, R. N. Grass, M. Bohner, W. J. Stark, Effect of particle size, crystal phase and crystallinity on the reactivity of tricalcium phosphate cements for bone reconstruction, *J. Mater. Chem.* 17 (2007) 4072–4078. <https://doi.org/10.1039/b707171j>.
- [14] V. Uskokovic, T. A. Desai, Phase composition control of calcium phosphate nanoparticles for tunable drug delivery kinetics and treatment of osteomyelitis. I.

- Preparation and drug release, *J. Biomed. Mater. Res. – Part A*. 101 A (2013) 1416–1426. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34426>.
- [15] G. Daculsi, R. Z. LeGeros, E. Nery, K. Lynch, B. Kerebel, Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: Ultrastructural and physicochemical characterization, *J. Biomed. Mater. Res.* 23 (1989) 883–894.
- [16] M. S. Johnsson, G. H. Nancollas, The Role of Brushite and Octacalcium Phosphate in Apatite Formation, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 3 (1992) 61–82. <https://doi.org/10.1177/10454411920030010601>.
- [17] J. Vecstaudza, M. Gasik, J. Locs, Amorphous calcium phosphate materials: Formation, structure and thermal behaviour, *J. Eur. Ceram. Soc.* 39 (2019) 1642–1649. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2018.11.003>.
- [18] M. Mosina, J. Locs, Synthesis of amorphous calcium phosphate: A review, *Key Eng. Mater.* 850 KEM (2020) 199–206. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.850.199>.
- [19] N. Temizel, G. Giriskan, A. C. Tas, Accelerated transformation of brushite to octacalcium phosphate in new biomineralization media between 36.5 °C and 80 °C, *Mater. Sci. Eng. C*. 31 (2011) 1136–1143. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.04.009>.
- [20] A. Dosen, R. F. Giese, Thermal decomposition of brushite, CaHPO₄·2H₂O to monetite CaHPO₄ and the formation of an amorphous phase, *Am. Mineral.* 96 (2011) 368–373. <https://doi.org/10.2138/am.2011.3544>.
- [21] L. C. Chow, E. D. Eanes, Octacalcium phosphate, 2001. https://doi.org/10.1007/springerreference_39293.
- [22] C. C. Rey, C. Combes, C. Drouet, Synthesis and physical chemical characterizations of octacalcium phosphate-based biomaterials for hard-tissue regeneration, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102511-6.00008-X>.
- [23] I. Kovrljija, J. Locs, D. Loca, Octacalcium phosphate: Innovative vehicle for the local biologically active substance delivery in bone regeneration, *Acta Biomater.* 135 (2021) 27–47. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.08.021>.
- [24] T. Anada, A. Araseki, S. Matsukawa, T. Yamasaki, S. Kamakura, O. Suzuki, Effect of octacalcium phosphate ionic dissolution products on osteoblastic cell differentiation, *Key Eng. Mater.* 361-363 I (2008) 31–34. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/kem.361-363.31>.
- [25] Y. Sai, Y. Shiwaku, T. Anada, K. Tsuchiya, T. Takahashi, O. Suzuki, Capacity of octacalcium phosphate to promote osteoblastic differentiation toward osteocytes in vitro, *Acta Biomater.* 69 (2018) 362–371. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.01.026>.
- [26] Y. Shiwaku, K. Tsuchiya, L. Xiao, O. Suzuki, Effect of calcium phosphate phases affecting the crosstalk between osteoblasts and osteoclasts in vitro, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 107 (2019) 1001–1013. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36626>.
- [27] N. Miyatake, K. N. Kishimoto, T. Anada, H. Imaizumi, E. Itoi, O. Suzuki, Effect of partial hydrolysis of octacalcium phosphate on its osteoconductive characteristics, *Biomaterials*. 30 (2009) 1005–1014. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.058>.
- [28] F. Barrère, C. M. Van Der Valk, R. A. J. Dalmeijer, G. Meijer, C. A. Van Blitterswijk,

- K. De Groot, P. Layrolle, Osteogenicity of octacalcium phosphate coatings applied on porous metal implants, *J. Biomed. Mater. Res. – Part A.* 66 (2003) 779–788. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10454>.
- [29] P. Habibovic, C. M. Van Der Valk, C. A. Van Blitterswijk, K. De Groot, G. Meijer, Influence of octacalcium phosphate coating on osteoinductive properties of biomaterials, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 15 (2004) 373–380. <https://doi.org/10.1023/B:JMSM.0000021104.42685.9f>.
- [30] R.Z. LeGeros, Preparation of Octacalcium Phosphate (OCP): A Direct Fast Method, *Calcif. Tissue Int.* (1985) 194–197.
- [31] S. Graham, P. W. Brown, The low temperature formation of octacalcium phosphate, *J. Cryst. Growth.* 132 (1993) 215–225. [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(93\)90265-X](https://doi.org/10.1016/0022-0248(93)90265-X).
- [32] C. Drouet, Apatite formation: why it may not work as planned, and how to conclusively identify apatite compounds, *Biomed Res. Int.* 2013 (2013) Article ID 490946. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/490946>.
- [33] O. Suzuki, Octacalcium phosphate (OCP)-based bone substitute materials, *Jpn. Dent. Sci. Rev.* 49 (2013) 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2013.01.001>.
- [34] O. Demir, A. Pylostomou, D. Loca, Octacalcium phosphate phase forming cements as an injectable bone substitute materials: Preparation and in vitro structural study, *Biomater. Adv. J.* 157 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213731>.
- [35] Y. Tanuma, T. Anada, Y. Honda, T. Kawai, S. Kamakura, S. Echigo, O. Suzuki, Granule size-dependent bone regenerative capacity of octacalcium phosphate in collagen matrix, *Tissue Eng. – Part A.* 18 (2012) 546–557. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0349>.
- [36] T. Fuji, T. Anada, Y. Honda, Y. Shiwaku, H. Koike, S. Kamakura, K. Sasaki, O. Suzuki, Octacalcium phosphate-precipitated alginate scaffold for bone regeneration, *Tissue Eng. – Part A.* 15 (2009) 3525–3535. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0048>.
- [37] O. Suzuki, Y. Shiwaku, R. Hamai, Octacalcium phosphate bone substitute materials: Comparison between properties of biomaterials and other calcium phosphate materials, *Dent. Mater. J.* 39 (2020) 187–199. <https://doi.org/10.4012/dmj.2020-001>.
- [38] A. Bordbar-Khiabani, I. Kovrlija, J. Locs, D. Loca, M. Gasik, Octacalcium Phosphate-Laden Hydrogels on 3D-Printed Titanium Biomaterials Improve Corrosion Resistance in Simulated Biological Media, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023). <https://doi.org/10.3390/ijms241713135>.
- [39] M. R. Newman, D. S. W. Benoit, Local and targeted drug delivery for bone regeneration, *Curr. Opin. Biotechnol.* 40 (2016) 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.029>.
- [40] A. Lebugle, A. Rodrigues, P. Bonneville, J. J. Voigt, P. Canal, F. Rodriguez, Study of implantable calcium phosphate systems for the slow release of methotrexate, *Biomaterials.* 23 (2002) 3517–3522.
- [41] Q. L. Tang, Y. J. Zhu, J. Wu, F. Chen, S. W. Cao, Calcium phosphate drug nanocarriers with ultrahigh and adjustable drug-loading capacity: One-step synthesis, in situ drug loading and prolonged drug release, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 7 (2011) 428–434. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.12.005>.

- [42] O. Suzuki, S. Kamakura, T. Katagiri, M. Nakamura, B. Zhao, Y. Honda, R. Kamijo, Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite, *Biomaterials*. 27 (2006) 2671–2681. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.12.004>.
- [43] Y. Murakami, Y. Honda, T. Anada, H. Shimauchi, O. Suzuki, Comparative study on bone regeneration by synthetic octacalcium phosphate with various granule sizes, *Acta Biomater.* 6 (2010) 1542–1548. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.10.023>.
- [44] X. Yang, X. Gao, Y. Gan, C. Gao, X. Zhang, K. Ting, B. M. Wu, Z. Gou, Facile synthesis of octacalcium phosphate nanobelts: Growth mechanism and surface adsorption properties, *J. Phys. Chem. C*. 114 (2010) 6265–6271. <https://doi.org/10.1021/jp911576f>.
- [45] E. Boanini, M. Gazzano, K. Rubini, A. Bigi, Collapsed Octacalcium Phosphate Stabilized by Ionic Substitutions, *Cryst. Growth Des.* (2010). <https://doi.org/10.1021/cg100494f>.
- [46] I. Kovrljija, K. Menshikh, O. Marsan, C. Rey, C. Combes, J. Locs, D. Loca, Exploring the Formation Kinetics of Octacalcium Phosphate from Alpha-Tricalcium Phosphate: Synthesis Scale-Up, Determination of Transient Phases, Their Morphology and Biocompatibility, *Biomolecules*. 13 (2023).
- [47] A. Ressler, I. Ivanišević, A. Žužić, N. Somers, The ionic substituted octacalcium phosphate for biomedical applications: A new pathway to follow ?, *Ceram. Int.* (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.12.126>.
- [48] Z. Irbe, D. Loca, A. Pura, L. Berzina-Cimdina, Synthesis and properties of α -tricalcium phosphate from amorphous calcium phosphate as component for bone cements, *Key Eng. Mater.* 721 KEM (2017) 182–186. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.721.182>.
- [49] W. E. Brown, M. Mathew, M. S. Tung, Crystal chemistry of octacalcium phosphate, *Prog. Cryst. Growth Charact.* 4 (1981) 59–87. [https://doi.org/10.1016/0146-3535\(81\)90048-4](https://doi.org/10.1016/0146-3535(81)90048-4).
- [50] R. A. Terpstra, P. Bennema, Crystal morphology of octacalcium phosphate: Theory and observation, *J. Cryst. Growth*. 82 (1987) 416–426. [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(87\)90333-2](https://doi.org/10.1016/0022-0248(87)90333-2).
- [51] W. E. Brown, J. R. Lehr, J. P. Smith, A. William Frazier, Crystallography of octacalcium phosphate [5], *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957) 5318–5319. <https://doi.org/10.1021/ja01576a068>.
- [52] B. O. Fowler, M. Marković, W. E. Brown, Octacalcium Phosphate. 3. Infrared and Raman Vibrational Spectra, *Chem. Mater.* 5 (1993) 1417–1423. <https://doi.org/10.1021/cm00034a009>.
- [53] M. Robin, S. Von Euw, G. Renaudin, S. Gomes, J. M. Krafft, N. Nassif, T. Azaïs, G. Costentin, Insights into OCP identification and quantification in the context of apatite biomineralization, *CrystEngComm*. 22 (2020) 2728–2742. <https://doi.org/10.1039/c9ce01972c>.
- [54] N. Döbelin, Validation of XRD phase quantification using semi-synthetic data, *Powder Diffr.* 35 (2020) 262–275. <https://doi.org/10.1017/S0885715620000573>.
- [55] N. Döbelin, Interlaboratory study on the quantification of calcium phosphate phases by

- Rietveld refinement, Powder Diffr. 30 (2015) 231–241. <https://doi.org/10.1017/S088571561500038X>.
- [56] J. C. Heughebaert, G. H. Nancollas, Kinetics of crystallization of octacalcium phosphate, *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 2478–2481. <https://doi.org/10.1021/j150656a012>.
- [57] J. P. Barone, G. H. Nancollas, The Seeded Growth of Calcium Phosphates. The Kinetics of Growth of Dicalcium Phosphate Dihydrate on Enamel, Dentin, and Calculus, *J. Dent. Res.* 57 (1978) 153–161. <https://doi.org/10.1177/00220345780570010901>.
- [58] M. Nascimben, I. Kovrlija, J. Locs, D. Loca, L. Rimondini, Fusion and classification algorithm of octacalcium phosphate production based on XRD and FTIR data, *Sci. Rep.* (2024) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51795-0>.
- [59] S. Sritharan, N. Sivalingam, A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin, *Life Sci.* 278 (2021) 119527. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119527>.
- [60] S. Y. van der Zanden, X. Qiao, J. Neefjes, New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin, *FEBS J.* 288 (2021) 6095–6111. <https://doi.org/10.1111/febs.15583>.
- [61] R. D. Olson, P. S. Mushlin, Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses, *FASEB J.* 4 (1990).
- [62] X. Liu, S. Du, S. Wang, K. Ye, Ferroptosis in osteosarcoma: A promising future, *Front. Oncol.* 12 (2022) 1–9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1031779>.
- [63] C. M. Pfeffer, A. T. K. Singh, Apoptosis: A target for anticancer therapy, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19020448>.
- [64] I. Kovrlija, E. Pańczyszyn, O. Demir, M. Laizane, M. Corazzari, J. Locs, D. Loca, Doxorubicin loaded octacalcium phosphate particles as controlled release drug delivery systems: Physico-chemical characterization, in vitro drug release and evaluation of cell death pathway, *Int. J. Pharm.* 653 (2024) 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.123932>.
- [65] N. Ito, M. Kamitakahara, K. Ioku, Preparation and evaluation of spherical porous granules of octacalcium phosphate/hydroxyapatite as drug carriers in bone cancer treatment, *Mater. Lett.* 120 (2014) 94–96. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.01.040>.
- [66] M. Parent, H. Baradari, E. Champion, C. Damia, M. Viana-Trecant, Design of calcium phosphate ceramics for drug delivery applications in bone diseases: A review of the parameters affecting the loading and release of the therapeutic substance, *J. Control. Release.* 252 (2017) 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.02.012>.
- [67] M. Akutsu, Y. Kano, S. Tsunoda, K. Suzuki, Y. Yazawa, Y. Miura, Schedule-dependent interaction between paclitaxel and doxorubicin in human cancer cell lines in vitro, *Eur. J. Cancer.* 31 (1995) 2341–2346. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(95\)00448-3](https://doi.org/10.1016/0959-8049(95)00448-3).
- [68] J. Wang, J. de Boer, K. de Groot, Proliferation and differentiation of osteoblast-like MC3T3-E1 cells on biomimetically and electrolytically deposited calcium phosphate coatings, *J. Biomed. Mater. Res. A.* 90 (2009) 664–670. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32128>.
- [69] G. Miotto, M. Rossetto, M. L. Di Paolo, L. Orian, R. Venerando, A. Roveri, A. M. Vučković, V. Bosello Travain, M. Zaccarin, L. Zennaro, M. Maiorino, S. Toppo,

- F. Ursini, G. Cozza, Insight into the mechanism of ferroptosis inhibition by ferrostatin-1, *Redox Biol.* 28 (2020) 101328. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101328>.
- [70] S. Wang, E. A. Konorev, S. Kotamraju, J. Joseph, S. Kalivendi, B. Kalyanaraman, Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms: Intermediacy of H₂O₂- and p53-dependent pathways, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 25535–25543. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400944200>.
- [71] G. V. Chaitanya, J. S. Alexander, P. P. Babu, PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration, *Cell Commun. Signal.* 8 (2010) 1–11. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-31>.
- [72] N. Yoshimoto, I. Wahyudhin, A. Yabuki, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects Self-healing polymer coating with efficient delivery for alginates and calcium nitrite to provide corrosion protection for carbon steel, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 662 (2023) 130970. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2023.130970>.
- [73] A. Bordbar-Khiabani, M. Gasik, Electrochemical behavior of additively manufactured patterned titanium alloys under simulated normal, inflammatory, and severe inflammatory conditions, *J. Mater. Res. Technol.* 26 (2023) 356–370. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2023.07.113>.



Ilijana Kovrlija dzimusi 1994. gadā Prijedorā (Bosnija un Hercegovina). Belgradas Universitātē ieguvusi bakalaura (2017) un maģistra (2018) grādu bioķīmijas inženierijā un biotehnoloģijā. 2020. gadā pievienojās Rīgas Tehniskās universitātes (RTU) Biomateriālu un bioinženierijas institūta komandai kā doktora grāda kandidāte Marijas Sklodovskas-Kirī ITN programmā *PREMUROSA*, promocijas darbu izstrādājot profesoru Dagnijas Ločas un Jāņa Loča vadībā. Patlaban ir RTU Biomateriālu un bioinženierijas institūta zinātniskā asistente. Doktora studiju laikā devās četrās zinātniskās vizītēs uz *CAAD* – Austrumpjemontas Universitāti (Novara, Itālija), *CIRIMAT* – Tulūzas Universitāti (Tulūza, Francija) un Ālto Universitāti (Helsinki, Somija), kur guva pieredzi *in vitro* pētījumu veikšanā, apguva kalciju fosfātu raksturošanas metodes un guva ieskatu kompozītmateriālu izveidē un analīzē. Zinātniskās intereses saistītas ar biomateriālu sintēzi, apstrādi un raksturošanu, kā arī zāļu piegādes sistēmu izstrādi.