

Jolanta Vamze-Liepiņa

REAKTOGENITĀTES RAKSTUROJUMS
ATTĀLINĀTOS LAIKA PERIODOS
PĒC KAULAUDU AIZVIETOJOŠO
BIOMATERIĀLU IMPLANTĀCIJAS

Promocijas darbs

medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – morfoloģija

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. med., Dr. habil. med. profesore **Māra Pilmane**

Dr. med., Dr. habil. med. profesors **Andrejs Skaģers**

ANOTĀCIJA

Patoloģiju un traumu izraisītu mutes dobuma funkcionālu un estētisku defektu novēršana ir joprojām aktuāla stomatoloģijas prakses daļa Latvijā un arī citās pasaules valstīs. Šīs problēmas risināšanā kā vieni no pamatlīdzekļiem tiek izmantoti dažāda veida implantāti, bet, lielākoties, tie ir kalcija fosfātu saturoši materiāli. Paralēli tam norit arī pētniecības darbs, galvenokārt, implantātu kvalitatīvo īpašību uzlabošanā. Neskatoties uz to, kaulaudus aizvietojošo biomateriālu izmantošanas iespēju pētniecība stomatoloģijā un ortopēdijā joprojām ir aktuāla pasaulē un arī Latvijā.

Darba mērķis bija analizēt eksperimentālo dzīvnieku audu lokālo reakciju morfoloģiskos faktorus un to izmaiņas dažādā laikā pēc kaulaudu aizvietojošo biomateriālu implantācijas.

Pētījumā tika iekļauti 19 dzīvnieki, kopumā iegūti 33 eksperimentālie paraugi no biomateriālu implantācijas zonas un 12 kontroles paraugi. Dzīvniekiem tika implantēti nekomerciālie – RTU Rūdolfa Cimdiņa Rīgas biomateriālu inovāciju un attīstības centrā izveidotie biomateriālu implantāti un komerciālais materiāls un pēc 3, 4,5, 6 un 8 mēnešiem tika veikta dzīvnieku eitanāzija un kaulaudu paraugu izņemšana.

Audu paraugu morfoloģiskā rutīnā izmeklēšanā tika konstatēta jauna kaula veidošanās trīs mēnešus pēc nepārklātas hidroksiapatīta (HAP) tabletes, ar polikaprolaktonu (PCL) pārklātas hidroksiapatīta tabletes, polimetilmetakrilāta (PMMA) cementa un neapdedzinātu HAP granulu implantācijas bez plašām kaula resorbcijas zonām, kas liecina par minēto materiālu izteiktāku osteoinduktivitāti salīdzinājumā ar dažādiem trikalcija fosfāta cementiem. Kaulaudu paraugos tika noteikti antimikrobo proteīnu β -Defensīnu-2 (β Def-2), proinflammatoros citokīnus – interleikīnus (IL)-1, IL-6, IL-8, antiinflammatoro citokīnu IL-10, kaula pamatvielas proteīnu – osteopontīnu (OP) un osteokalcīnu (OC), kaula morfoģenētisko proteīnu (BMP-2/4) un šūnu funkcionālās aktivitātes rādītāju – osteoproteģerīnu (OPG) ekspresējošie osteocīti, kā arī apoptotiskie osteocīti, kuru daudzums 3, 4,5, 6 un 8 mēnešos bija variabls. Datu analīze uzrādīja statistiski ticamu BMP-2/4 ekspresiju trīs mēnešus pēc HAP un to saturošu materiālu implantācijas, kas liecina par ekspresijas selektivitāti atkarībā no biomateriāla veida. Apoptoze aktīvāk izpaužas 3 mēnešus pēc implantācijas, kad implantātu apvidū tika konstatēts arī statistiski ticami lielāks apoptotisko osteocītu un proinflammatorā citokīna IL-1 saturošo osteocītu skaits un prevalējoša selektivitāte ir raksturīga HAP biomateriālam.

ANNOTATION

Prevention of functional and esthetic oral defects as a result of pathologies and trauma is still a topical practice in stomatology in Latvia, as well as in other countries of the world. Various type of implants are used, being the basic means in solution of this problem, but mostly these are calcium phosphate-containing materials. Alongside with it, research work is going on too, mainly for the improvement of implants' qualitative properties. Despite it, research in investigating the use of bone tissue substituting biomaterials in stomatology and orthopaedics is a topical issue in the world and also in Latvia.

The aim of the study was to analyze morphological factors of local reactions in experimental animals' tissues at different periods of time after the implantation of bone tissue substituting biomaterials.

19 animals were included into the study, altogether 33 experimental samples were obtained from biomaterials implantation zone, and 12 control samples. Animals were implanted noncommercial – Riga Tehnical university Rudolfs Cimdins Riga Biomaterials Innovation and Development Centre developed biomaterials implants and commercial material, and in 3, 4.5, 6 and 8 months there was done the animal euthanasia and removal of bone tissue samples.

In morphological routine examination of tissue samples there was found the formation of a new bone three months after the implantation of uncoated hydroxyapatite (HAP) tablet, with polycaprolactone coated HAP tablet (HAP/PCL), polymethylmethacrylate (PMMA) cement and unsintered HAP granule implantation without extensive resorbtion zones which indicate to the more expressed osteoinductivity of the materials mentioned in comparison to different tricalcium phophate cements. In bone tissue samples there were determined antimicrobial protein β -Defensin-2 (β Def-2), proinflammatory cytokins – interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, antiinflammatory cytokin IL-10, bone matrix protein osteopontin (OP) and osteocalcin (OC), bone morphogenetic factor (BMP-2/4) and cell functional activity parameter osteoprotegerin (OPG) expressing osteocytes, as well as apoptotic osteocytes, their amount in 3, 4.5, 6 and 8 months being variable. Data analysis showed statistically significant BMP-2/4 expression for three months after implantation of HAP and their containing materials, indicating to the selectivity of expression, depending on the type of biomaterial. Apoptosis is more active within 3 months after implantation, during which one can find a statistically significantly greater number of apoptotic osteocytes and proinflammatory cytokin IL-1 containing osteocytes and selectivity being prevalent, which is characteristic for HAP biomaterial.

SATURS

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI	7
1. IEVADS	9
1.1. Darba aktualitāte	9
1.2. Darba mērķis.....	11
1.3. Darba uzdevumi	12
1.4. Darba hipotēzes	12
1.5. Pētījuma novitāte	13
2. LITERATŪRAS APSKATS	14
2.1. Audu reaktogenitāte un to ietekmējošie faktori.....	14
2.2. Biosaderība un tās morfoloģiskā izpratne.....	17
2.3. Apoptoze, tās raksturojums saistībā ar biomateriālu implantāciju	18
2.4. Proinflammatoro citokīnu interleikīna-1; interleikīna-6; interleikīna-8 un antiinflamatorā citokīna interleikīna-10 raksturojums.....	20
2.5. Antimikrobās aizsardzības proteīnu – β defensīna-2; β defensīna-3 un β defensīna-4 raksturojums.....	22
2.6. Augšanas faktora – kaula morfoģenētiskā proteīna (BMP)-2/4 raksturojums	23
2.7. Šūnu funkcionālās aktivitātes rādītāja – osteoproteģerīna raksturojums.....	24
2.8. Kaula pamatvielas proteīnu osteopontīna un osteokalcīna raksturojums	25
2.9. Kalcija fosfāta tipa un sintētiskie biomateriāli	27
3. MATERIĀLS UN METODEDES	30
3.1. Pētījuma materiāls	30
1. eksperimentālā grupa.....	31
2. eksperimentālā grupa.....	31
3. eksperimentālā grupa.....	33
4. eksperimentālā grupa.....	34
3.2. Pētījuma metodes.....	35
3.2.1. Morfoloģiskā pētījuma metodes	35
3.2.2. Iegūto datu vizualizācija un to statistiskās apstrādes metodes	39
4. REZULTĀTI.....	41
4.1. Morfoloģiskā pētījuma un datu statistiskās analīzes rezultāti	
1. eksperimentālajā grupā	41
4.1.1. Morfoloģiskās rutīnās izmeklēšanas rezultāti	41
4.1.2. Imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas rezultāti un to statistiskās apstrādes dati	41

4.1.3. Apoptozes izmeklēšanas rezultāti un statistiskās apstrādes dati	
1. eksperimentālajā grupā	46
4.2. Morfoloģiskā pētījuma un statistiskās datu analīzes rezultāti	
2. eksperimentālajā grupā	47
4.2.1. Morfoloģiskās rutīnās izmeklēšanas rezultāti	47
4.2.2. Imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas rezultāti un to statistiskās apstrādes dati	47
4.2.3. Apoptozes izmeklēšanas rezultāti un to statistiskās apstrādes dati	
2. eksperimentālajā grupā	56
4.3. Morfoloģiskā pētījuma un statistiskās datu analīzes rezultāti	
3. eksperimentālajā grupā	58
4.3.1. Morfoloģiskās rutīnās izmeklēšanas rezultāti	58
4.3.2. Imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas rezultāti un to statistiskās apstrādes dati	58
4.3.3. Programmētā šūnu nāve – apoptoze kaulaudos implantācijas un kontroles rajonos 3. eksperimentālajā grupā	65
4.4. Morfoloģiskā pētījuma un statistiskās datu analīzes rezultāti	
4. eksperimentālajā grupā	66
4.4.1. Morfoloģiskās rutīnās izmeklēšanas rezultāti	66
4.4.2. Imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas rezultāti un to statistiskās apstrādes dati	66
4.4.3. Programmētā šūnu nāve – apoptoze kaulaudos implantācijas un kontroles rajonos 4. eksperimentālajā grupā	70
4.5. Ar imūnhistoķīmijas metodēm analizēto faktoru saturošo šūnu un apoptotisko šūnu savstarpējās korelācijas kaulaudos implantācijas un kontroles rajonos	72
5. DISKUSIJA	80
5.1. Rutīnās izmeklēšanas morfoloģiskā atrade dažādos laika periodos pēc biomateriālu implantācijas	80
5.2. Imūnhistoķīmiskās atrades dati dažādos pēcimplantācijas periodos pēc dažādu biomateriālu implantācijas	83
5.2.1. Kaula morfoģenētiskais proteīns-2/4 (BMP-2/4)	83
5.2.2. Osteoproteģerīns (OPG)	84
5.2.3. Osteopontīns (OP)	86
5.2.4. Osteokalcīns (OC)	88
5.2.5. Proinflatatorie (iekaisumu veicinošie) citokīni interleikīns-1 (IL-1), interleikīns-6 (IL-6) un interleikīns-8 (IL-8)	90
5.2.6. Antiinflatatorais (pretiekaisuma) citokīns interleikīns-10 (IL-10)	93

5.2.7. β Defensīns-2 (β Def-2)	95
5.2.8. Apoptozes atrade	96
8. PUBLIKĀCIJAS UN PREZENTĀCIJAS PAR PĒTĪJUMA TĒMU	113
Zinātniskie raksti	113
Starptautisko zinātnisko konferenču tēzes	113
Vietējo zinātnisko konferenču tēzes	114
Prezentācijas starptautiskās un vietējās konferencēs	115
PATEICĪBAS	117
PIELIKUMI	118

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

Saīsinājums	Nosaukums angļu valodā	Tulkojums latviešu valodā
IL-1	<i>interleukin-1</i>	interleikīns-1
IL-1 β	<i>interleukin-1-β</i>	interleikīns-1- β
IL-6	<i>interleukin-6</i>	interleikīns-6
IL-8	<i>interleukin-8</i>	interleikīns-8
IL-10	<i>interleukin-10</i>	interleikīns-10
TNF- α	<i>tumor necrotic factor-α</i>	audzēja nekrotiskais faktors- α
β Def-2	<i>β-defensin-2</i>	β -defensīns-2
β Def-3	<i>β-defensin-3</i>	β -defensīns-3
β Def-4	<i>β-defensin-4</i>	β -defensīns-4
BMP-2/4	<i>bone morphogenetic protein-2/4</i>	kaula morfoģenētiskais proteīns-2/4
OPG	<i>osteoprotegerin</i>	osteoproteģerīns
OP	<i>osteopontin</i>	osteopontīns
OC	<i>osteocalcin</i>	osteokalcīns
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labelling</i>	gala deoksinukleotidiltransferāzes un digoksigēna marķēti nukleotīdi
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule-1</i>	intracelulārā adhēzijas molekula-1
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>	asinsvadu šūnu adhēzijas molekula-1
HAP-1	<i>hydroxyapatite-1, sintered at 1000 °C</i>	hidroksiapatīts, apdedzināts 1000 °C
HAP-2	<i>hydroxyapatite-2, sintered at 1150 °C</i>	hidroksiapatīts, apdedzināts 1150 °C
β -TCP-1	<i>β-tricalcium phosphate-1, sintered at 1000 °C</i>	β -trikalcijs fosfāts-1, apdedzināts 1000 °C
β -TCP-2	<i>β-tricalcium phosphate-2, sintered at 1150 °C</i>	β -trikalcijs fosfāts-2, apdedzināts 1150 °C
α -TCP cements I	<i>α-tricalcium phosphate cement I with pH 6.0</i>	α -trikalcijs fosfāta cements I ar šķidro fāzi pH 6,0
α -TCP cements II	<i>α-tricalcium phosphate cement II with pH 7.0</i>	α -trikalcijs fosfāta cements II ar šķidro fāzi pH 7,0
α -TCP-pH 6,0	<i>α-tricalcium phosphate cement with pH 6.0</i>	α -trikalcijs fosfāta cements ar šķidro fāzi pH 6,0
α -TCP-pH 7,0	<i>α-tricalcium phosphate cement with pH 7.0</i>	α -trikalcijs fosfāta cements ar šķidro fāzi pH 7,0
α -TCP-pH 8,0	<i>α-tricalcium phosphate cement with pH 8.0</i>	α -trikalcijs fosfāta cements ar šķidro fāzi pH 8,0

HAP/ β -TCP-1	<i>biphasic hydroxyapatite/ β-tricalcium phosphate-1, sintered at 1000 °C</i>	bifāzisks hidroksiapatīts/ β -trikalcija fosfāts-1, apdedzināts 1000 °C
HAP/ β -TCP-2	<i>biphasic hydroxyapatite/ β-tricalcium phosphate-2, sintered at 1150 °C</i>	bifāzisks hidroksiapatīts/ β -trikalcija fosfāts-2, apdedzināts 1150 °C
HAP/PCL	<i>hydroxyapatite covered by polycaprolactone</i>	ar polikaprolaktonu pārklāts hidroksiapatīts
PMMA	<i>polymethylmethacrylate</i>	polimetilmetakrilāts
Bcl-2 gēns	<i>B cell lymphoma-2 gene</i>	B šūnu limfomas-2 gēns
RTU Rūdolfa Cimdiņa RBIAC	<i>Rīga Technical university Rudolfs Cimdins Riga Biomaterials Innovation and Development Centre</i>	Rīgas Tehniskās universitātes Rūdolfa Cimdiņa Rīgas biomateriālu inovāciju un attīstības centrs

* paskaidrojums, atšifrējums

1. IEVADS

1.1. Darba aktualitāte

Kopš pagājušā gadsimta 50. gadiem pasaulē ir sākusies aktīva ķirurģisko implantātu izmantošana stomatoloģijas un ortopēdijas praksē un paralēli tai ir noritējis arī pētniecības darbs, galvenokārt, to kvalitatīvo īpašību uzlabošanā (*Ratner, 2013; Schminke et al., 2015*). Neskatoties uz to, kaulaudus aizvietojošo biomateriālu izmantošanas iespēju pētniecība stomatoloģijā un ortopēdijā noris joprojām, ir aktuāla pasaulē un arī Latvijā.

Autogēnie kaula transplantāti, kas satur minerālo komponenti un daudz imūnkompetento šūnu osteogēnēzei, būtu labākais kaulaudu aizvietošanas materiāls (*Leite and Ramalho, 2008; Nienhuijs et al., 2008*). Tomēr šis materiāls var inficēties un resorbēties, kā arī tam ir ierobežota pieeja (*Leite and Ramalho, 2008*). Tādēļ liela uzmanība tiek pievērsta inertu metālu, keramisko materiālu (visbiežāk – hidroksiapatīts) un polimēru (poliesteri, silikons, polietilēns, u.c.) pētniecībai (*Henning et al., 1989*). Materiālu izveidošanas sarežģītību nosaka tam izvirzītās prasības, proti, tam jābūt ar minimālām atlieku parādībām un jā saglabā inertums, kontaktējoties ar audiem (*Leite and Ramalho, 2008*).

Dažāda veida kaulu defektu labošanai kaulu cementus izmanto kā kaula transplantātu aizstājējmateriālus locītavu protēžu nostiprināšanai, kaula masas palielināšanai, arī kā lokālas medikamentu piegādes sistēmas un šūnu pamatņu pagatavošanai kaulaudu inženierijā (*Shi, 2006; Talmadge, 2006; Habraken et al., 2007; Kokubo, 2008; Ratner et al., 2013*). ASV Nacionālā veselības dienesta dati liecina, ka ASV ik gadu tiek veiktas 2 500 500 locītavu aizvietošanas operācijas, bet dentālo implantātu pielietojumam tiek izlietoti aptuveni 4 miljardi ASV dolāru (*Ratner et al., 2013*). Latvijas Republikā analoga statistika līdz šim nav veikta, taču stomatoloģija ir viena no medicīnas nozarēm, kurā arī Latvijā ir aktuāla implantātu izmantošana dažādu mutes dobuma patoloģiju un traumu izraisītu funkcionālu un estētisku defektu novēršanā.

Stomatoloģijas praksē potenciāli izmantojamo biomateriālu pētījumos lieto dažāda veida materiālus. Lielākoties tie ir kalcija fosfātu saturoši materiāli – hidroksiapatīts (HAP), kas var būt gan tīrā veidā, gan pārklāts ar medikamentiem, poliesteriem polikaprolaktonu (PCL) vai polilaktātskābi (PLA), vai arī tīrs kalcija fosfāta cements, trikalcijs fosfāts (TCP). Kā kaula cementa sastāvdaļu izmanto arī metilmetakrilāta un/vai polimetilmetakrilāta (PMMA) pulveri, vai HAP-hitozāna-PMMA savienojumus un citus materiālus. Medicīnas zinātnisko rakstu pārskatos minēts, ka pēdējos gadu desmitos liels daudzums biomateriālu tiek rekomendēti kā šūnu augšanu veicinoši implantāti. Vieni no tiem ir kalcija fosfāta keramika

(*Le Geros, 2002*) un bioaktīvais stikls, kas jau ir uzrādījuši arī klīnisku efektivitāti stomatoloģijas un ortopēdijas praksē, bet, neskatoties uz to, pašreizējie šīs grupas materiāli nespēj nodrošināt dabīgā kaula osteoindukciju (*El-Ghannam, 2005*).

Arī Latvijas Republikas ģimijas zinātnē veic kaulaudu aizvietojošu materiālu izpēti. Tā, Rīgas Tehniskās universitātes Rūdolfa Cimdiņa Rīgas biomateriālu inovāciju un attīstības centrā (RTU Rūdolfa Cimdiņa RBIAC) darbs norisinās pie hidroksiapatīta, bifāzisku kalcija fosfātu izstrādes, PMMA cementu, stikla-jonomēra cementu un kalcija fosfāta kaulu cementu sintezēšanas un to rakstura īpašību pētniecības. No tiem, PMMA un dažāda veida kalcija fosfāta savienojumu keramiskie materiāli tika izmantoti arī autores pētījumā ar eksperimenta dzīvniekiem.

Jebkuras substances implantācija bioloģiskos audos noris ar audu mehānisku bojājumu un tam sekojošu atbildes reakciju, audu dziļšanos un reģenerācijas procesu, kura ilgumu ietekmē individuālās imūnās aizsardzības sistēmas mehānismi un kas var variēt arī atkarībā no skarto audu lokalizācijas (*Konig et al., 1999; Leite and Ramalho, 2008*). Jebkura biomateriāla implantācija izsauc atbildes reakciju arī iekaisuma veidā. Ķirurģiskas operācijas, ko veic arī implantācijas gadījumā, saistība ar iekaisuma attīstību literatūrā atzīmēta jau pirms vairākiem gadu desmitiem un arī pēdējos gados ir pievērsta uzmanība pētījumiem par imūnsistēmas atbildes reakcijām uz biomateriālu (*Brown et al., 2012*). Imūnsistēmas šūnu, galvenokārt makrofāgu reakcijai uz biomateriālu, tiek piešķirta prognostiska nozīme granulācijas audu un svešķermeņa tipa reakcijas veidošanās procesam un līdz ar to arī biomateriāla funkcionalitātei (*Brown et al., 2012; Laurencin and Khan, 2013*). Līdz ar to ir būtiski noteikt arī citokīnu – interleikīnu (IL)-10 un arī IL-1, IL-6 un IL-8 ekspresija saistībā ar biomateriālu implantāciju. Iekaisuma mediatoru – gan proinflatōro interleikīnu IL-1, IL-6 un IL-8, gan antiinflamatorā interleikīna IL-10 darbības rezultātā iekaisums parasti noris sākotnējā periodā un izsauc arī šūnu apoptozi – šūnu nāvi.

Audu reģenerācijas procesā būtiska loma ir arī izvēlētā implantāta materiālam, kas, kā apraksta *Yamaguchi et al. (1997)* un *Anderson (2001)*, savukārt ir viena no tā biosaderību veidojošām komponentēm. Tā, *Yamaguchi et al. (1997)* un *Andersen (2001)* piedāvā arī sekojošu biosaderības ģenēzes mehānismu, proti, tādi organisma molekulārie mehānismi kā imūnsistēmas reakcijas, brūču sadzīšanas process un svešķermeņa tipa reakcijas individuāla ietekme un savstarpēja mijiedarbība ar biomateriālu, atkarībā no pēcimplantācijas perioda un biomateriāla īpašībām, veido biosaderību. Tādēļ notiek arvien jauni meklējumi biosaderīgu materiālu radīšanā, kas likumsakarīgi nosaka nepieciešamību veikt paralēlus pētījumus par audu reaktogenitāti. *Slutski un Vetra (1996)* izstrādāja reaktogenitātes teoriju, dalot audu

reakciju uz implantāciju nespecifiskā un specifiskā, kas kopā veido biosaderību. Audu reaktogenitāte ir organisma lokālā reakcija, kas ietver sevī adaptīvos mehānismus, un imūnās sistēmas reakcija tiek uzskatīta par šī procesa sastāvdaļu (Szebeni, 2012). Audu reaktogenitātes rādītājiem, t. i., audu reakcijām un izdalītajām vielām implantāta rajonā, tostarp arī augšanas faktoriem, šūnu nāves rādītājiem un iekaisuma mediatoriem, ir būtiska loma šajā organisma atbildes reakcijā. Augšanas faktora kaula morfoģenētiskā proteīna (BMP) loma reaktogenitātes procesā *in vivo* un *in vitro* izpaužas ar tādām aprakstītajām īpašībām kā stimulējošā ietekme uz kaulaudu augšanu, kolagēna sintēzi un audu sadzīšanas procesu (El-Ghannam, 2005; Lavery et al, 2008).

Audu nespecifiskā un specifiskā reaktogenitāte tiek izdalīta arī imūnhistoķīmiska izmeklējuma līmenī. Tā, audu nespecifiskās reaktogenitātes marķieri ir citokīni IL-1; IL-6; IL-8; IL-10, antimikrobās aktivitātes rādītāji – β -Defensīni (β Def)-2; β Def-3; β Def-4, bet kaulaudu specifiskās reaktogenitātes marķieri ir BMP, osteoproteģerīns (OPG), osteopontīns (OP) un osteokalcīns (OC) (Lee, 2000; Sarfati, 2004; El-Ghannam, 2005). Joprojām literatūrā ir maz aprakstīti dati par audu nespecifiskās un specifiskās reaktogenitātes marķieru ekspresijas pētījumiem implantāta zonā un to lomu implantācijas materiāla biosaderības noteikšanā attālinātos laika periodos. Būtiski ir noteikt, kad beidzas nespecifiskā reaktogenitāte un kāda dinamika ir bioaktivitātei jeb specifiskajai reaktogenitātei. β Def-1, β Def-2, β Def-3 loma imūnsistēmas reakcijās aizsardzībā infekcijai biomateriālu implantācijas gadījumos nav pilnībā definēta un literatūrā nav atrodami precīzi dati par citokīnu un defensīnu ekspresiju kaulaudos ap dažāda veida biokeramikas implantātiem. Tādējādi, morfoloģiskās pārmaiņas implantācijas rajonā joprojām ir neskaidras un nav arī noteikti morfoloģiski – diagnostiskie prognostiskie kritēriji audu deģenerācijas un reģenerācijas noteikšanai implantoloģijā.

1.2. Darba mērķis

Darba mērķis bija analizēt eksperimentālo dzīvnieku audu lokālo reakciju morfoloģiskos faktorus un to izmaiņas dažādā laikā pēc kaulaudu aizvietojošo biomateriālu implantācijas.

1.3. Darba uzdevumi

1. Pārskata griezumos analizēt audu biosaderību cietajos un mīkstajos audos ap dažāda veida biomateriāliem eksperimentālo dzīvnieku audos un kontroles gadījumā.
2. Analizēt proinflaturo un antiinflaturo marķieru citokīnu – IL-1; IL-6; IL-8 un IL-10 ekspresiju cietajos audos attālinātos laika periodos (3, 4,5, 6 un 8 mēneši) pēc dažādu biomateriālu implantācijas.
3. Analizēt antimikrobā proteīna – β Def-2 ekspresiju cietajos audos attālinātos laika periodos pēc dažādu biomateriālu implantācijas.
4. Analizēt kaula augšanas faktora BMP-2/4 un šūnu funkcionālās aktivitātes rādītāja OPG ekspresiju cietajos audos attālinātos laika periodos pēc dažādu biomateriālu implantācijas.
5. Analizēt kaula pamatvielas proteīnu – OP un OC ekspresiju cietajos audos attālinātos laika periodos pēc dažādu biomateriālu implantācijas.
6. Noteikt proinflaturo, antiinflaturo, antimikrobo un kaula augšanas faktoru, šūnu funkcionālās aktivitātes rādītāja un kaula pamatvielas proteīnu sadalījumu eksperimenta dzīvnieku cietajos audos.
7. Noteikt apoptozes rādītāju sadalījumu eksperimenta dzīvnieku cietajos audos attālinātos laika periodos pēc dažādu biomateriālu implantācijas.
8. Pētīt audu saderības rādītāju savstarpējo saistību dažādos laika periodos pēc implantācijas un salīdzinājumā ar kontroles datiem.
9. Izveidot morfoloģisko diagnostiski-prognostisko reakciju algoritmu audu biosaderības noteikšanai konkrētos (3, 4,5, 6 un 8 mēneši) attālinātos laika periodos.

1.4. Darba hipotēzes

1. Audu lokālā reaktogenitāte ir atšķirīga dažādos laika periodos pēc kaulaudu aizvietojošo kalcijs fosfāta biokeramikas materiāla implantācijas.
2. Dažāda ķīmiskā sastāva un struktūras kalcijs fosfāta biokeramikas implantātiem ir selektīva inducējoša ietekme audu molekulārajās norisēs.

1.5. Pētījuma novitāte

Attālinātā laikā (pēc 3, 4,5, 6 un 8 mēnešiem) pēc dažādu kalcija fosfāta materiālu un polimēru implantācijas noteiktas audu nespecifiskās un specifiskās reaktogenitātes biomarķieru ekspresijas atšķirības morfoloģiski-diagnostiskā algoritma izveidošanai. Pirmo reizi aprakstītas faktoru ekspresijas atšķirības, dots to skaidrojums un noteikti marķieri, kas lietojami katrā implantācijas periodā.

2. LITERATŪRAS APSKATS

2.1. Audu reaktogenitāte un to ietekmējošie faktori

Audu reaktogenitāte ir organisma reakcija, kas ietver adaptīvos mehānismus un imūnās sistēmas reakcija tiek uzskatīta kā šī procesa sastāvdaļa (Szebeni, 2012). Tiek izdalīta nespecifiskā un specifiskā audu reaktogenitāte. Citokīni – IL-1, IL-6, IL-8 un IL-10 un antimikrobiālie proteīni β Def-2 ir nespecifiskās reaktogenitātes marķieri, jo liecina par imūnās sistēmas atbildes reakcijām organisma fizioloģiskās un patoloģiskās norisēs. Savukārt, kaulaudu aizvietojošo materiālu implantācijā kā specifiskās audu reaktogenitātes faktori tiek uzskatīti kaulu morfoģenētiskais proteīns BMP, kaulaudu osteoblastisko aktivitāti raksturojošais proteīns OPG, kaulu matricas proteīni – OP un OC (Lee, 2000; Sarfati, 2004; El-Ghannam, 2005), jo tie raksturo molekulāro procesu norisi gan kaulaudu reģenerācijā, gan deģeneratīvos mehānismos. Sākotnējās audu reakcijas pēc implantācijas kā audus traumatizējoša faktora iedarbības sekas noris nespecifiski un ir saistītas ar iekaisuma procesu. Līdz šim nav precīzi noteikta robeža, kad sāk prevalēt audu specifiskā reaktogenitāte. Iekaisuma process ietekmē kaulaudu reģenerācijas uzsākšanos un līdz ar to arī specifisko marķieru izdalīšanos apkārtējos audos.

Iekaisuma process, kā nespecifiskās reaktogenitātes pazīme, ir kompleksa audu reakcija uz endogēnas (biežāk – nekrozes produkti audu bojājuma gadījumā) un eksogēnas izcelsmes (baktērijas, vīrusi, fizikālas un ķīmiskas dabas faktori) kairinātāju (Kumar et al., 2005). Tādējādi iekaisuma process ir viena no reaktogenitātes vizuālajām izpausmēm – gan makroskopiskā, gan mikroskopiskā līmenī. Savukārt, iekaisuma process, kas norisinās tikai ar proinflatōro citokīnu – interleikīnu izdali audos bez iekaisuma šūnu infiltrācijas tajos, tiek dēvēts par slēptu iekaisumu, kas ir minēts arī literatūrā gan biomateriālu implantācijas pētījumos (Wilsson et al., 2008; Sonofuchi et al., 2016), gan tāda patoloģiska procesa kā metabolais sindroms gadījumā (Kim et al., 2016). Iekaisums, brūču sadzīšana un svešķermeņu izsuktas audu reakcijas tiek uzskatītas par vispārējām audu reakcijām uz bojājumu. Ir aprakstīts, ka svešķermeņu tipa iekaisuma veidošanās implantāta rajonos ir saistāma ar akūta vai hroniska iekaisuma attīstību tā rajonā (Bagambisa et al., 1994; Anderson, 2008).

Iekaisumu veido vaskulāras reakcijas, šūnu migrācija un aktivācija, un iekaisuma morfoloģiskais sastāvs ir atkarīgs no etiopatoģenētiskiem faktoriem un arī no tā, vai tā ir iekaisuma akūtā vai hroniskā fāze (Kumar et al., 2005). Akūta iekaisuma sākotnējās izpausmes norisinās asins plūsmā, kas izpaužas ar arteriolu dilatāciju histamīna ietekmē ar

sekojošu hemostāzi, asinsvadu (kapilāru) sienas caurlaidības paaugstināšanos aktivizēto leikocītu un etioloģiskā faktora radītā endotēlija bojājuma dēļ, leikocītu malas stāvokli un ekstravazāciju. Leikocītu adhēziju nodrošina to adhēzijas faktori – integrīni un selektīni, imūnglobulīnu virszimtas molekulas – intercelulārās adhēzijas molekula-1 (ICAM-1) un asinsvadu šūnu adhēzijas molekula-1 (VCAM-1), mucīniem līdzīgie glikoproteīni. Savukārt audzēja nekrotiskais faktors (TNF) un IL-1 inducē L-selektīna un E-selektīna ligandu ekspresiju endotēlijā (*Lentsch and Ward, 2000; Kumar et al., 2005*). Hroniska iekaisuma morfoloģisko bāzi veido limfocītus, makrofāģus un plazmocītus saturošs iekaisuma infiltrāts, destruēti audi un sekojoša to aizvietošana ar saistaudiem, granulāciju veidošanās angiogēnēzes un fibrozes ceļā (*Majno, 1998; Kumari et al., 2005*).

Iekaisums bieži rezultējas ar audu struktūras atjaunošanos reģenerācijas un rētošanās ceļā, un nereti arī ar granulomu (nespecifisku un specifisku), t. sk. svešķermeņa tipa granulomu veidošanos. Iekaisuma bioloģiskās jēgas organismam labvēlīgais aspekts ir bojājošā faktora vai bojāto audu norobežošana vai likvidēšana. Taču akūtam iekaisumam norisinoties ilgāk par vienu nedēļu, jādombā par infekcijas manifestēšanos uz implantāta virsmas vai tā rajonā (*Anderson, 2001*). Hronisks iekaisums ir viens no galvenajiem riska faktoriem sistēmiskam kaulu masas zudumam, izraisot arī osteoporotiskus to lūzumus (*Polzer et al., 2010*).

Audu reakcija uz implantētu gan dabīgas, gan sintētiskas izcelsmes materiālu ir uzskatāma kā iekaisuma reakcija uz svešķermeni. Un arī tādi faktori kā materiāla porozitāte, daļiņu lielums, forma, ķīmiskais sastāvs un ķīmiskā stabilitāte ietekmē konkrētu iekaisuma šūnu veidu klātbūtni un daudzumu implantāta rajonā, iespaidojot materiāla biosaderības veidošanos (*Henson, 1971; Anderson et al., 2008*). Pastāvot būtiskai atšķirībai starp biomateriāla virsmas laukumu un iekaisuma substrātu veidojošām šūnām un to daudzumu, var tikt izsaukta pastiprināta fagocitoze ar sekojošu biomateriāla destrukciju (*Anderson, 2001*). Tādējādi arī biomateriāla individuālās īpašības ietekmē audu molekulāros procesus pēcimplantācijas periodā un rada nepieciešamību veikt audu biosaderības pētījumus, t. sk., risinot jautājumu par audu morfoloģiskajām pārmaiņām dažādos laika periodos, jo implantoloģijā ne mazāk būtisks par agrīno pēcoperācijas periodu ir arī attālinātais laika periods. Svarīgi ir izvērtēt arī imūnsistēmas reakciju implantāciju gadījumos, jo iekaisuma inducēta kaula zaudēšana ir viena no biežākajām komplikācijām pēc kaulaudu aizvietojošo biomateriālu implantācijas (*Busscher et al., 2012*). Pagājušā gadsimta 50. gados ir aprakstīts alternatīvs imūnsistēmas reakcijas veids (*Pillemer et al., 1954*), kur imūnsistēma tiek aktivēta caur komplementa sistēmu, nevis caur klasisko IgG antivielu saistīšanas ceļu. Pēdējo gadu

literatūrā publicēti pētījuma dati, kur autori norādījuši, ka daudzu biomateriālu implantācijas gadījumā imūnsistēma reaģē caur šo alternatīvo ceļu (*Anderson et al.*, 2005). Joprojām literatūrā ir atrodami tikai hipotētiski dati par laiku, kad audi pārstāj reaģēt uz biomateriālu kā uz svešķermeni (*Ratner et al.*, 2013).

Literatūrā aprakstīts, ka audu reģenerācijas procesa pazīmes ir novērotas dažādos laika periodos pēc implantācijas. Dažāda rakstura mīksto audu un balstaudu bojājuma gadījumos attālinātos laika periodos, par ko runā sākot no 2–3 nedēļām, tiek novērotas vēlinas audu sadzīšanas pazīmes – mīkstajos audos sākas rētošanās un formējas granulācijas audi, kas var noritēt ar atrofiju un stromas fibrozēšanos, kaulaudos tiek novērota rumbējuma un jaunā kaula veidošanās (*Shaposhnikov*, 1997).

Pētījumā pacientiem ar šķembainiem kaulu lūzumiem, labdabīgiem kaulu audzējiem ar dobumu veidošanos tika implantēts liellopa HAP kā kaulu aizvietojošs materiāls un 81,8% gadījumu pēc 6–12 mēnešiem radiogrāfiski tika konstatēta kaulaudu masas formēšanās un mikroskopiski tika konstatēta jauna kaula veidošanās uz implantētā HAP materiāla (*Tsai et al.*, 2010). Interesanti atzīmēt pētījumu (*Hiraga et al.*, 2009), kura autori novēroja, ka periodontālās saites šūnas ekspresē osteoblastu marķierus, t. sk. osteokalcīnu. Minētā pētījuma autori šīs šūnas iestrādāja HAP porās, materiāls tika implantēts žurkām, un 12 nedēļas pēc implantācijas tika novērotas kaulam līdzīgas mineralizētas matricas veidošanās, kura ekspresēja kaula matricas proteīnus OP, OC un kaula sialoproteīnu. *Lee et al.* (2011) implantējot ar HAP pārklātus titāna implantātus, konstatēja augstāku OP un OC ekspresiju un pēc 3 mēnešiem novēroja kortikāla kaula un implantāta kontakta izveidošanos. *Roldán et al.* (2010) 12 nedēļas pēc Ca-P cementa implantācijas truša stilba kaulā arī novēroja jaunā kaula veidošanos un biomateriāla resorbcijas zonas, turklāt *Baslé et al.* (1993) jau vienu nedēļu pēc analoga materiāla implantācijas atzīmējuši kaula veidošanās pazīmes. *Yang et al.* (2011) novērojuši osteoindukcijas pazīmes, BMP2, OP un kolagēna I ekspresiju 30 dienas pēc bifāziska Ca-P keramikas implantācijas peļu kāju muskuļos. Tajā pašā laikā ir atrodami pētījumi, kur 6 un 12 nedēļas pēc Ca-P cementa materiālu implantācijas Jaunzēlandes trušu galvaskausa kaulā, autori nenovēroja būtisku pozitīvu ietekmi uz kaulaudu reģenerāciju (*Moghadam et al.*, 2004).

Pētījumā ar jūrascūciņām, kurām stilba kaulā tika ievietoti titāna implantāti, novēroja, ka osifikācijas process ap porozu implantātu veidojas jau 60 dienās, bet ap apstrādātu titāna implantātu izteiktās fibrozās plātnītes uzrāda sadzīšanas reakciju 90 dienās (*Schierano et al.*, 2005). Izmantojot *Osseotite* virsmas modificētu implantātu un tradicionāli – mehāniski apstrādātu titāna implantātu augšžokļa rekonstrukcijā cilvēkiem, novērots, ka 6 mēnešos

Osseotite implantāts uzrāda augstu kaula un implantāta kontakta procentu salīdzinoši ar parasto titāna implantātu (*Lazzara et al.*, 1999). Izmantojot Osseotite implantātu suņiem, novērots, ka iegurnā kaulā jau 3 mēnešu laikā novērots augsts kaula-implantāta kontakta procents (*Veiss et al.*, 2007). Savukārt pacientiem 6 mēnešus pēc augšžokļa dobuma membrānas pacelšanas operācijas, dažos gadījumos tika novērotas izlocītas kaulaudu struktūras nelielā daudzumā, bet vairumā gadījumu jauna kaula veidošanās pazīmes vispār netika konstatētas (*Ahn et al.*, 2011). Citiem pacientiem 6 mēnešus pēc divgabalu cirkonija starpdaļas titāna kaula implantāta ievietošanas biopsijas datos tika konstatēta pilnīga kaulaudu integrācija implantāta un kaula pamatnes savienojumā (*Nevins et al.*, 2011).

Analizējot minēto pētījumu datus par kaulaudu veidošanās sākuma laiku pēc HAP implantācijas (*Tsai et al.*, 2010; *Lee et al.*, 2011), var secināt, ka jaunā kaula veidošanās sākas dažādos laika periodos – gan 6–12 mēnešus, gan 3 mēnešus pēc implantācijas. Izmantojot Ca-P virsmas implantātus (*Baslé et al.*, 1993; *Roldán et al.*, 2010), jaunā kaula veidošanās pazīmes tika konstatētas ne tikai 3 mēnešus pēc implantācijas, kā HAP gadījumā, bet arī daudz agrīnākā periodā, t. i., vienu nedēļu pēc implantācijas. Tajā pašā laikā atrodami arī pretrunīgi dati par osteoģenēzes sākumu, t. i., 6 un 12 mēnešus pēc Ca-P implantācijas kaulaudu reģenerācija vispār netika novērota (*Moghadam et al.*, 2004). Minētais liecina, ka nepieciešams veikt kaulaudu reģeneratīvo procesu un to ietekmējošo faktoru turpmākos pētījumus.

2.2. Biosaderība un tās morfoloģiskā izpratne

Implantētā materiāla biosaderību veido vairākas komponentes. Viena no tām, par ko savā darbā jau norādījuši *Slutski* un *Vetra* (1996), ir biomateriāla un audu savstarpējās reaktogenitātes komplekss, par kuru, savukārt, liecina gan nespecifiskās, gan specifiskās reaktogenitātes rādītāji. Tādējādi, kaulaudu reģenerācijai un imūnās sistēmas reakcijai, kā reaktogenitātes pazīmēm, ir būtiska, iespējams, pat galvenā loma biosaderības veidošanās procesā.

Imūnsistēmas reakcija, brūču sadzīšanas process un svešķermeņa tipa reakcijas intensitāte un izpausme atkarībā no pēcimplantācijas perioda un biomateriāla īpašībām, veido biosaderību jeb biomateriāla atbilstību audiem (*Yamaguchi et al.*, 1997; *Anderson*, 2001). *Brown et al.* (2012) aprakstījis, ka imūnsistēmas šūnu reakcija audos (infiltrācija biomateriāla implantācijas rajonā) un arī citokīnu ekspresijas rādītāji dati sniedz prognostiskus datus biomateriālu biosaderības izvērtējumam.

Biomateriālam, neskatoties uz to, vai tas ir biodegradēties spējīgs, sintētisks vai dabiskas izcelsmes, ir jābūt biosaderīgam, vēlams arī osteoinduktīvam, osteokonduktīvam, integratīvam, porainam un mehāniski saderīgam ar dabisko kaulu, lai varētu veikt tam paredzētās funkcijas kaulaudu aizvietošanā (*El-Ghannam, 2005*).

Biomateriāla osteoindukcijas spējas izpaužas osteoprogenitorā osteoblastu stimulācijā. Savukārt osteokondukcijas laikā, pateicoties osteoblastu aktivitātei, jaunā kaula veidošanās notiek uz biomateriāla virsmas (*Albrektson and Johanson, 2001; Klokkevold et al., 2002*). Osteokondukcijas fenomens tiek bieži aplūkots kaulu implantātu pētniecībā. Tādi implantāti kā varš, sudrabs un kaula cements, kuriem ir salīdzinoši zema biosaderība, uzrāda vājas osteokondukcijas spējas vai tās neuzrāda vispār (*Albrektson and Johanson, 2001*). Osteointegrācija nozīmē tieša strukturāla un funkcionāla savienojuma jeb kaula-implantāta kontakta izveidošanos starp saimnieka kaulu un implantātu (*Brånemark, 1983*). Līdz ar to veiksmīgas osteointegrācijas laikā jāveidojas stabilai implantāta “noenkurošanās” vietai, kas var nodrošināt atbilstošās anatomiskās vienības funkcijas. Biomateriālu izmantošana medicīnā ir nozīmīga, jo tā nodrošina fizioloģisko un tādu bioloģisko izmaiņu kā ekstracelulārās matricas remodelēšana norisi un mijiedarbību ar dabisko jeb “saimnieka” kaulu (*El-Ghannam, 2005*).

Pateicoties biomateriālu vitāli nepieciešamajai izmantošanai medicīnā, osteoindukcijas un osteokondukcijas pētījumiem tiek veltīta liela uzmanība jau vairākus gadu desmitus.

Pētījumā pacientiem, kur kā implantātu izmantoja vērša HAP, kortikālo kaulu un ar biostiklu pārklātu autologo kaulu, 12 mēnešus pēc augšžokļa dobuma pamatnes paaugstināšanas operācijas novēroja augstu biosaderību un minimālu implantāta absorbciju HAP grupā, augstu implantāta absorbciju ar dažām tā daļiņām jaunizveidotajā kaulā eksperimenta grupā ar biostiklu pārklāto kaulu (*Galindo-Moreno et al., 2008*). Citā pētījumā par polimēru un kalcija fosfātu materiālu, t. sk. kombinēto materiālu izmantošanu, autori aprakstījuši polimetilmetakrilāta-hidroksiapatīta-hitozāna, polimetilmetakrilāta-kalcija hlorīda un alkoksilāna savienojumu implantēšanu dzīvniekiem. Atrasts, ka šie materiāli uzrādījuši biosaderību un, salīdzinoši ar “tīru” PMMA, arī osteoinduktīvāku iedarbību, kādēļ autori secina, ka lietotais bioaktīvais kaula cements varētu būt labāks kaulaudus aizvietojošs materiāls nekā “tīrs” PMMA (*Miyazaki et al., 2003; Kim et al., 2004*).

2.3. Apoptoze, tās raksturojums saistībā ar biomateriālu implantāciju

Šūnu bojājumu var izraisīt tādi faktori kā hipoksija, išēmija, fizikāli un ķīmiski kairinātāji, infekciozi aģenti, imūnreakcijas un vielmaiņas traucējumi (*Kumar et al., 2005*).

Atkarībā no etiopatogēniskā faktora intensitātes un ilguma, šūnu bojājums var būt atgriezenisks vai neatgriezenisks. Savukārt, neatgriezeniska šūnu un audu bojājuma morfoloģisko substrātu veido divi norises mehānismi, t. i., nekroze un apoptoze (*Trump et al.*, 2001; *Kumar et al.*, 2005). Nekroze ir patoloģiska šūnu bojāeja ārēju faktoru iedarbībā, ko raksturo lizosomu satura izplūšana citoplazmā, membrānas bojājums un šūnas satura izplūšana apkārtējā vidē, kas, savukārt, izraisa reaktīvas izmaiņas apkārtējos audos. Tādas morfoloģiskās pazīmes kā šūnu membrānas bojājums un šūnas satura izplūšana apkārtējos audos ir diferenciāldiagnostiskas otram šūnu bojājuma veidam – apoptozei.

Apoptoze ir programmētas šūnu nāves norise daudzos nozīmīgos fizioloģiskos un patoloģiskos organisma stāvokļos:

- 1) programmēta šūnu destrukcija embriogēnēzes, organogēnēzes un attīstības involūcijas laikā;
- 2) hormonu atkarīgā šūnu involūcijā;
- 3) autoreaktīvu T šūnu bojāeja aizkrūts dziedzerī un citotoksisku T šūnu izraisīta šūnu nāve;
- 4) audzēja proliferācijas procesā iesaistīto šūnu bojāeja;
- 5) dažādu vidējas intensitātes traumējošu faktoru (temperatūras izmaiņas, citotoksiski medikamenti, radiācija, mehānisks bojājums, u.c.) radīti bojājumi, kā rezultātā tiek izsaukta neatgriezeniska šūnas DNS bojāeja (*Webb et al.*, 1997; *Ratner et al.*, 2013).

Apoptozes procesa mehānismu var iniciēt dažādi iekšējie programmētie notikumi, augšanas faktoru trūkums, specifisku receptoru-ligandu savstarpējā iedarbība, enzīmu atbrīvošanās no citotoksiskām T šūnām. Apoptozi regulē Bcl-2 (B šūnu limfomas-2) gēna dzimtas loceklis BAX gēns, kas ir zināms arī kā Bcl-2 tipa proteīns 4 (*Sedlak et al.*, 1995). Intracelulāro agonistu ietekmes rezultātā aktivēto pro-apoptotisko BAX efektoru izraisītā mitochondriju ārējo membrānu palielinātā caurlaidība nodrošina citohroma-C ieplūšanu citosolā. Seko citohroma-C atkarīgā kaspāžu aktivācija, kas, savukārt, beidzas ar dezoksiribonukleīnskābes (DNS) fragmentāciju kalcija un magnija jonu aktivēto endonukleāžu iedarbībā (*Ratner et al.*, 2013). Apoptozes procesu kontrolē un koordinē arī Bcl-2 grupas proteīni, kas, savukārt, regulē mitochondriālo caurlaidību (*Fischer et al.*, 2003; *Ratner et al.*, 2013). Apoptozi var izraisīt arī ārējais jeb nāves receptoru radītais mehānisms. Šajā apoptozes mehānismā darbojas šūnu virsmas receptori – audzēju nekrozes faktors-1 (TNF-1) un Fas jeb apoptozes antigēns-1 proteīns, kas inducē kaspāžu aktivāciju (*Inazama et al.*, 1992; *Funk*, 2001). Ir aprakstīts, ka šūnu apoptozi un iekaisuma akūto fāzi spēj izraisīt TNF- α , kuram arī piemīt spējas inhibēt audzēja attīstību un vīrusu replikāciju (*Gaur et al.*, 2003).

Apoptotisko ķermenīšu un to fragmentu virsmas satur fagocītu signālmolekulas – fosfatidilserīna molekulas. Tādējādi bojāgājušās šūnas tiek fagocitētas līdz proinflammatoro citokīnu atbrīvošanās brīdim. Tas arī raksturo šī bojājuma veida specifiskumu, proti, tas norit bez iekaisuma un apkārtējo audu reakcijas. Šādā veidā organismā tiek uzturēta homeostāze un radīts līdzsvars starp šūnu proliferāciju un apoptozi.

Iekaisuma, galvenokārt strutaina tipa, radīta audu bojājuma gadījumā parasti salīdzinoši lielā daudzumā tiek konstatēti polimorfonukleārie leikocīti, kas hemotakses ceļā nonāk iekaisuma apvidū. Šāda rakstura audu bojājuma gadījumā apoptoze ir viens no ierobežojošiem mehānismiem, atklājot to, kā organisms spēj cīnīties pret neitrofilo leikocītu pārprodukciju (*Savill et al.*, 1997). TNF- α ir endogēnais proinflammatoro citokīnu mediators un, stimulējot IL-8, veicina epiteliālo šūnu bojājumu un apoptozi (*Shen and Pervaiz*, 2006). Ir novērots, ka hroniska periodontīta skartos audos, atšķirībā no veselajiem audiem, atrodama paaugstināta kaspāžu aktivitāte, kas, savukārt, tiek uzskatīta par nozīmīgu apoptozes riska rādītāju (*Alikhani et al.*, 2003; *Bantel et al.*, 2005). *Gamonal et al.* (2001) aprakstījuši, ka hroniska mutes dobuma infekcijas gadījumā aktivizējas apoptotiskais process un palielinās apoptotisko šūnu skaits.

Biomateriāls audos ir uzskatāms par svešķermeni, kurš, iespējams, dēļ sava ķīmiskā sastāva var izraisīt apoptotisku šūnu bojājumu. Tā kā biomateriālu implantācijas procesu nereti pavada iekaisuma process, kas ir arī viens no pēcooperāciju komplikāciju iemesliem, tad būtiski ir noteikt apoptozes radītājus dažādu biomateriālu implantācijas gadījumos. Literatūrā aprakstītas apoptozes rādītāju atšķirības apoptozes morfoloģiskajās atradēs gan kardioloģijas praksē, gan stomatoloģijas, gan ortopēdijas praksē izmantojamo biomateriālu pētījumos. Tā, piemēram, ar HAP pārklāta PMMA implantācijas gadījumā pelēm, novērota fibroblastu un osteocītu proliferatīva aktivitāte un mazs apoptotisko šūnu skaits (*Gonçalves et al.*, 2013). Tomēr augļa osteoblastu kultūrā uz hidroksiapatīta un hidroksiapatīta/titāna virsmas autori nenovēroja statistiski ticamu apoptozes indeksa, un šūnu proliferatīvās aktivitātes atšķirības starp eksperimenta un kontroles paraugiem (*Kumar et al.*, 2013). Pētījumā ar “tīru” trikalcija fosfātu un cinka/trikalcija fosfātu, augstāku apoptozes indeksu trušu osteoklastu kultūrā novēroja paraugā ar cinka/trikalcija fosfāta materiālu (*Kumar et al.*, 2013).

2.4. Proinflammatoro citokīnu interleikīna-1; interleikīna-6; interleikīna-8 un antiinflammatorā citokīna interleikīna-10 raksturojums

Iekaisumu stimulējošie citokīni – IL-1, IL-6, trombocītu augšanas faktors (PDGF-A) un transformējošais augšanas faktors alfa (TGF- α) ir atrasti svešķermeņu tipa gigantiskajās

šūnās, makrofāgos, fibroblastos un epiteliālās šūnās (*Dinarello, 1994*), un arī mezangiocītos (*Lovett et al., 1986*). IL-1 veicina adhēzijas molekulu ekspresiju endoleliocītos, tādējādi veicinot imūnkompetento šūnu diapēdēzi (*Dinarello, 1994*). Tiek uzskatīts, ka starp iekaisumā infiltrējošo makrofāgu producētajiem citokīniem tieši IL-1 ir izšķiroša loma lokāla iekaisuma un audu bojājuma patoģenēzē (*Dinarello, 1988; Tracey et al., 1989*). IL-1 un IL-6 piemīt osteoklastoģenēzi veicinošas īpašības, līdz ar to tie var sekmēt kaulaudu resorbciju (*Holt et al., 2007; Polzer et al., 2010*) ar sekojošu implantāta fiksācijas zaudējumu (*Holt et al., 2007*). Periimplantīta un hroniska periodontīta pacientu pētījumā arī norādīts, ka abās pacientu grupās atrasta citokīnu stimulējoša ietekme uz osteoklastiem (*Konttinen et al., 2006*). Par ortopēdisko implantātu zaudēšanu izteikta hipotēze, ka implantātu aktivēti makrofāgi atbrīvo IL-1 un TNF- α , kas, savukārt, stimulē osteoblastus un var veicināt IL-6 un prostaglandīnu E-2 sekrēciju. Tādējādi tiek aktivēti arī osteoklasti ar sekojošu kaula resorbciju un implanta fiksācijas zudumu (*Schmidt et al., 2003*).

Citokīns IL-6 darbojas gan kā iekaisuma stimulējošs citokīns, gan kā pretiekaisuma citokīns. To sekretē T limfocīti un asinsvadu sienā aktivēti makrofāgi, tādējādi stimulējot imūnsistēmas reakciju uz traumu (*Ostriker et al., 2014*), apdegumiem un citiem audu bojājumiem, kas noris ar iekaisuma reakciju. Kaulu smadzeņu mezenhīmas šūnu IL-6 ekspresija stimulē kā osteoklastu formēšanos ar sekojošu kaulaudu resorbciju, tā arī audzēju šūnu augšanu metastāzēs kaulaudos (*Roodman, 2003*). Tā sekrēcija ir novērota arī miopātijas slimnieku šķērssvītrotajā muskulatūrā (*Langhans et al., 2014*). Izteikta IL-6 ekspresija ir konstatēta stromas šūnās krūts un priekšdziedzera audzēja kaulu metastāžu rajonos (*Blouin et al., 2008*). Citokīnus un proteāzes producē arī fibroblasti un tiem ir loma osteolīzes procesos un implantāta zaudēšanā, ja fonā ir bijis audu detrits. Ir pētījumi par metāla un polietilēna materiāla implantātiem, bet, kā norādīts citu autoru darbos, ir maz zināms par šūnu atbildes reakcijām uz HAP, lai gan tieši tā materiāli ir plaši izmantoti klīniskajā praksē (*Ninomiya et al., 2001*). Novērota IL-6 un TNF- α ekspresija fibroblastos pēc HAP un hidroksiapatīta beta-tri-kalcija fosfāta (HA β /TCP) materiālu implantācijas (*Ninomiya et al., 2001*), IL-6 un BMP ekspresija osteoblastos Ca-P implantācijas gadījumā (*Eyckmans et al., 2013*), bet praktiski trūkst pētījumu par šo faktoru ekspresiju no paša kaula un audiem ap implantātu.

Citokīns IL-8 jeb CXC-8 ir 8,4 kDa neglikolizēts CXC apakšgrupas prekursora proteīna ekspresēts hemokīnproteīns (*Oppenheim et al., 1989; Baggiolini et al., 1992*) ar iekaisumu veicinošu iedarbību un raksturīgo hemotakses ietekmes funkciju, proti, ir viens no galvenajiem citokīniem, kas iekaisuma gadījumā aktivizē neitrofilos leukocītus (*Bickel, 1993; Rosenthal et al., 1994; Gilmour et al., 2003*). IL-8 proinflatōrai iedarbībai ir nozīme ne

tikai organisma atbildes nodrošināšanā uz bojājumu, bet, pateicoties tā stimulējošai ietekmei uz fibroblastu diferenciāciju miofibroblastos un angiogēnēzi, tam ir arī nozīmīga loma brūču sadzīšanas procesā (Broughton *et al.*, 2006; Vij *et al.*, 2008). IL-8 sintēzi inducē fitohemaglutinīni, forbola esteri, lektīns – konkanavalīns-A, vīrusi un baktēriju lipopolisaharīdi (Aihara *et al.*, 1997; Marstonar *et al.*, 1998). Tā sintēze ir cieši saistīta ar IL-1 un TNF- α stimulējošo ietekmi (Qazi *et al.*, 2011). IL-8 tiek sekretēts dažādos šūnu veidos, t. sk. monocītos, neitrofilajos leukocītos, epiteliocītos, endoteliocītos, fibroblastos, mezotēlija šūnās un audzēja šūnās (Matsushima and Oppenheim, 1989; Wolf *et al.*, 1998; Qazi *et al.*, 2011). Stomatoloģijas jomā ir aprakstīta IL-8 iekaisumu veicinoša aktivitāte gingivītu skartā gļotādā (Haake and Huang, 2002).

IL-10 ir 2. tipa citokīns, kas tiek uzskatīts par pretiekaisuma citokīnu, kuram piemīt dažādi efekti imūnregulācijā un iekaisuma procesā (Eskdale *et al.*, 1997). IL-10 producē tādas imūnās sistēmas šūnas kā T šūnas (Th2, Th1, Th17) (McGuirk and Mills, 2002), monocīti, makrofāgi, dendrītiskās šūnas (Fillatreau *et al.*, 2008), granulocīti, t. sk. eozinofīlie un tuklās šūnas (Ryan *et al.*, 2007). IL-10 konstatēts arī ārpus imūnās sistēmas, proti, keratinocītos, epitēlijšūnās (Moore *et al.*, 2001). IL-10 antagonizē tādas proinflatamos citokīnus kā TNF- α , IL-1, IL-8, IL-12, kā arī stimulē B limfocītu proliferāciju, antivielu produkciju (Numerof *et al.*, 2006). Zhou *et al.* (2005) savā pētījumā norāda, ka IL-10 piemīt izteikti supresīva ietekme uz iekaisuma mediatoru produkciju. Ir aprakstīti arī novērojumi, ka IL-10 nomāc IL-1 ekspresiju transkripcijas līmenī (Wang *et al.*, 1995). Literatūrā minēts, ka IL-10 nomāc matricas metaloproteināžu un nukleārā faktora beta darbību, tādējādi kavējot audu destrukciju (Garlet *et al.*, 2007). Salma *et al.* (2009) audu agrīno reakciju pētījumos pēc HAP implantācijas norādījusi, ka IL-10 ekspresija periostālajos audos netiek novērota.

Maz ir pētījumu par minēto citokīnu ekspresiju attālinātos, bet ne mazāk būtiskos, laika periodos pēc biomateriālu implantācijas.

2.5. Antimikrobās aizsardzības proteīnu – β defensīna-2; β defensīna-3 un β defensīna-4 raksturojums

Defensīni ir sīki, cisteīna bagāti katjonu proteīni, kuri ir atrasti gan mugurkaulniekiem, gan bezmugurkaulniekiem, gan arī augos (Thomma *et al.*, 2002; Pearce *et al.*, 2008). Šie proteīni uzrāda augstu antimikrobo aktivitāti gan pret gram-pozitīvām un gram-negatīvām baktērijām, gan sēnītēm un vīrusiem. Tādēļ tos uzskata par endogēniem antibiotiķiem, ko ir norādījis Crovella *et al.* (2005). Defensīnus satur imūnsistēmas un epitēlija šūnas un atkarībā no ekspresijas lokalizācijas, defensīni tiek iedalīti divās grupās: α -defensīni un β -defensīni. α -

defensīnus ekspresē neitrofilie leukocīti, bet β -defensīnus – dažādu orgānu un audu epiteliālās šūnas. Tā, β -defensīni atrodami ādā, radzenē, deguna gļotādā, mēlē, siekalu dziedzeros, nieru un gremošanas trakta epitēlija šūnās, aizkuņģa dziedzerī un dzemdē (*Bissell et al.*, 2004; *Crovella et al.*, 2005). Ir aprakstīti vairāk nekā trīsdesmit β -defensīni, bet, saistībā ar mutes dobumu, vairāk tiek aplūkoti mutes dobuma, smaganu un siekalu dziedzeru ekspresētie defensīni, t. i., β Def-1, β Def-2, β Def-3. Literatūrā norādīts, ka saistībā ar ģenētiskajām atšķirībām DEFB1 gēna kodēšanā, β Def-1 ekspresijas līmenis katram indivīdam var būt atšķirīgs (*Saitoh et al.*, 2004). Ir aprakstīts, ka β Def-1 epiteliālos audos izdalās pastāvīgi un neatkarīgi no kairinātāja dabas un intensitātes, taču β Def-2 un β Def-3 ekspresiju mutes dobumā veicina bakteriālais aplikums, IL-1 β , TNF- α (*Dale et al.*, 2002). To loma aizsardzībā pret orālo infekciju nav pilnībā skaidra un arī pētījumu dati ir pretrunīgi. *Dommsch et al.* (2005) savā pētījumā norādījis, ka β Def-1, β Def-2 producē gan keratinocīti, gan odontoblasti, tādējādi uzskatot, ka odontoblasti piedalās organisma dabiskajās imūnreakcijās. Literatūrā atrodami dati, kur autori aprakstījuši *Escherichia coli* lipopolisaharīdu inicētu toll-like receptoru 2 un 4, IL-1 beta, TNF- α , β Def-2, IL-8 sekrēciju odontoblastos (*Veerayutthwilai et al.*, 2007).

Ir pētījumi par β Def-1, β Def-2, β Def-3 ekspresiju peridotālo slimību gadījumos, kur, salīdzinājumā ar slimības neskarto audu paraugiem, rezultāti uzrādīja augstāku β Def-2 un β Def-3 ekspresiju veselajos audos (*Bissel et al.*, 2004). Savukārt kādā citā pētījumā autori aprakstījuši, ka β Def-2 tiek mazāk ekspresēts nekā β Def-1 periodontīta un periimplantīta zonās (*Kuula et al.*, 2008). Atrodami literatūras dati par β Def-2 ekspresiju elpošanas ceļos un to saistību ar hroniskām obstruktīvām plaušu saslimšanām (*Janssens et al.*, 2010), par β Def-2 izdalīšanās traucējumiem ar helikobaktēriju asociētu gastrītu gadījumos (*Vordenbäumen et al.*, 2010). *Varoga et al.* (2008) pētījumā par β Def-2 lomu osteomielīta gadījumā novērojuši augstāku šī proteīna ekspresiju osteomielīta skartajos kaulos salīdzinoši ar kontroles grupas veselajiem kauliem.

2.6. Augšanas faktora – kaula morfoģenētiskā proteīna (BMP)-2/4 raksturojums

Vairāki augšanas faktori, tostarp kaula morfoģenētiskais proteīns-2/4 (BMP-2/4), kas ir transformējošā augšanas faktora beta (TGF β) klases faktors, pētījumos ir aprakstīti kā kaulaudu augšanu, kolagēna sintēzi un audu sadzīšanas procesu stimulējoši proteīni *in vivo* un *in vitro* (*El-Ghannam*, 2005; *Lavery et al.*, 2008). Osteoģenēzi primāri regulē BMP, kura gēna regulācija notiek ar kaulu specifiskajiem transkripcijas faktoriem. *Lavery et al.* (2008) ir aprakstījuši atšķirīgu BMP-2/4 un BMP-6/7 aktivitāti primārajās mezenhimālajās šūnās un

uzskata, ka dažādi mehānismi inducē osteoblastu diferenciāciju. Ir aprakstīti *in vitro* pētījuma dati, kuros norādīts, ka BMP-2 veicina TGF β inducētu sinoviālā šķidrums cilmes šūnu hondroģenēzi (Rui *et al.*, 2010). Literatūrā ir minēti dati par BMP-2/4 ekspresiju astrocītos (Lü and Hu, 2009), bet konkrētu galvas smadzeņu patoloģiju izvērtējumā to loma nav aprakstīta.

BMP-2/4 tiek aprakstīts kā audu specifiskās reaktogenitātes marķieris. Tā, viena no BMP būtiskākajām lomām ir dalība osteoblastu diferenciācijas un kaula veidošanas procesā, kā arī tas aprakstīts kaulu lūzumu sadzīšanas pētījumā (Yu *et al.*, 2010), kur autori norādījuši, ka BMP ir būtisks tieši lūzumu sadzīšanas agrīnās stadijās, kurās BMP aktivizē kaula priekšteču šūnas periostā un endostā.

Ir aprakstīti inducētas hipoksijas pētījuma dati par to, ka hipoksija pastiprina BMP-2/4 ekspresiju kultivētos osteoblastos pēc HIF-1alfa (hipoksijas inducēts faktors-1 alfa) atkarīga mehānisma, iekļaujot ILK/Akt (integrīna saistīta kināze) un mTOR (*mechanistic or mammalian target of rapamycin (serine/threonine kinase)*) aktivāciju (Tseng *et al.*, 2010).

Eksperimentālajos pētījumos tiek apskatīti arī jautājumi par biomateriālu osteoindukcijas spēju aktivāciju. Tā, funkcionāli gradēta hidroksiapatīta subkutānas implantācijas gadījumā žurkām (Murata *et al.*, 2007), divas nedēļas pēc implantācijas autori novēroja materiāla virsmas un apmēra intensīvu degradāciju un gigantisko šūnu infiltrāciju biomateriāla rajonā, bet 4 nedēļas pēc implantācijas – albumīna saturoša šķidrums uzkrāšanos biomateriālā, ko autori izskaidro ar BMP-2/4 intensīvu ietekmi uz jaunā kaula veidošanās procesu. Ruhé *et al.* (2009), izmantojot ar BMP-2/4 piesātinātu kalcija fosfāta keramiku, divas un četras nedēļas pēc tās implantācijas truša galvaskausa kaulā novēroja kaula struktūru intensīvāku, salīdzinoši ar kontroles rajoniem, veidošanos.

2.7. Šūnu funkcionālās aktivitātes rādītāja – osteoproteģerīna raksturojums

Osteoproteģerīns (OPG) – tumora nekrozes faktora receptora virsdzimtas 11. tips ar citokīnu receptora īpašībām ir zināms kā proteīns – osteoklastoģenēzes inhibējošais faktors, kura ekspresiju nosaka audzēja nekrozes faktora virsdzimtas 11B gēns (Simonet *et al.*, 1997). OPG darbību imūnsistēmas B šūnās un dendrītiskās šūnās regulē CD-40 gēns, tādēļ OPG ir svarīga loma ne tikai kaulaudu metabolismā, bet arī imūnsistēmas funkcijās, galvenokārt – B šūnu attīstībā un nobriešanā un atbilstošo atbildes reakciju attīstībā (Yun *et al.*, 1998; Theodore *et al.*, 2001). OPG un OC ir vieni no galvenajiem proteīniem, kuri iesaistās kaulu metabolismā un osteoģenēzē (Yun *et al.*, 2001). Rekombinētais cilvēka OPG specifiski iedarbojas uz kaulu, paaugstinot mineralizācijas pakāpi (Tremollieres *et al.*, 2010). Ir

aprakstīts, ka estrogēni stimulē OPG producēšanu un tādējādi izpaužas estrogēnu nomācošā ietekme uz osteoporozes attīstību (*Khosla et al.*, 2001; *Lyrītis et al.*, 2010).

In vivo peļu aknu audos aprakstīta OPG ekspresija, kas rada osteopetrozi un var vienlaicīgi norītēt ar osteoklastu diferenciacijas pieaugumu (*Simonet et al.*, 1997). Saistībā ar rekombinantā OPG ekspresiju, autori līdzīgu efektu novērojuši arī veselām pelēm. Turklāt, *in vitro* pētījumā, autori novērojuši, ka rekombinantais OPG dozēti bloķē osteoklastu diferenciaciju no prekursoru šūnām un bloķē arī ar ovarioektomiju asociētu kaulu masas zudumu (*Simonet et al.*, 1997).

Aseptisks kaulaudu bojājums blakus ortopēdisko locītavu implantiem ir biežs iemesls implantātu zaudējumiem. Literatūrā aprakstīts pētījums, kurā tika salīdzināta osteoklastu formēšanās galveno regulatoru – receptoru aktivatora NFkappaB (RANK), NFkappaB ligandu receptoru aktivatora (RANKL) un osteoproteģerīna ekspresija. Pētījuma autori norādījuši, ka OPG ekspresija maz atšķīrās audos no periimplanta zonas pacientiem ar osteolīzi, sinoviālajos audos pacientiem ar osteoartrītiski izmainītām locītavām un veselos vizuāli neizmainītajos audos (*Crotti et al.*, 2004). OPG ekspresija ir novērota arī periimplanta audos sīko asinsvadu endotēlija šūnās (*Crotti et al.*, 2003; *Haynes et al.*, 2003), bet pētījumos, pacientiem ar osteoartrozi, reimatoīdo artrītu un periimplantītu, tika novērota dažāda un arī pretrunīga OPG ekspresija (*Crotti et al.*, 2003, *Crotti et al.*, 2004). Pētījumos par kaulaudu aktivitātes asociētā proteīna – OPG ekspresiju, izmantojot dažāda veida, t. sk. kalcija fosfāta un sintētiskos biomateriālus, ir norādīti atšķirīgi dati. Tā, izmantojot titāna implantātus ar dažādu virsmas porozitāti, tika noteikts, ka visi implantāti veicināja kaulu asociēto proteīnu – OPG, OC un sārmainās fosfatāzes ekspresiju, bet būtiski izteiktāka tā bija audos ap implantātiem, kuri bija pārklāti ar hidroksiapatītu (*Endres et al.*, 2006). Pacientiem ar saknes tipa dentāliem implantātiem periimplantīta rievās šķidrumā, izmantojot ELISA (enzīmu saistītā imunosorbenta tests) izmeklēšanu, tika noteikta OPG ekspresija, un pētījuma autori konstatēja, ka tā korelēja ar periimplantīta šķidruma daudzumu. Ar to pētījuma autori norāda, ka OPG varētu būt marķieris audu fizioloģiski-morfoloģiskā veseluma novērtēšanai ap implantātiem (*Arikan et al.*, 2008).

2.8. Kaula pamatvielas proteīnu osteopontīna un osteokalcīna raksturojums

Osteopontīns (OP) ir augsti fosforilēts sialoproteīns, kaula pamatvielas glikoproteīns, kurš tiek ekspresēts dažādos audos, tostarp kaulaudos, kaulu smadzenēs, hipertrofiskos skrimšļaudos, nierēs, smadzenēs, asinsvados, aktivētos limfocītos un makrofāgos (*Giachelli et al.*, 1995; *Butler et al.*, 1996; *Giachelli et al.*, 1998; *Sodek et al.*, 2000). *Sodek et al.* (2000)

norāda arī, ka OP ir nozīmīga kaulu un zobu ekstracelulārās matricēs komponente. *Nanci* (1999) un *Launey et al.* (2010) aprakstījuši OP izdalīšanos kaulaudu ārpusšūnu matricē starp kolagēnām šķiedrām, un, kā apraksta *Fantner et al.* (2005), OP darbojas kā adhezīvs materiāls. Bet, kā norādījuši *Hunter* (2013) un *Holm et al.* (2014), joprojām ir neskaidra OP kā mineralizēto struktūru ārpusšūnu matricēs komponentes, inhibējošā vai stimulējošā ietekme uz minerāla – hidroksiapatīta veidošanos, kas nenoliedzami ir būtiska biomateriālu implantācijas gadījumos. Tāpat, arī OP gēna regulācijas mehānisms, kā arī paša OP loma joprojām vēl nav pilnībā noskaidrota. Pētījumos norādīts, ka OP bez proinflatōrās iedarbības spēj ietekmēt mineralizācijas inhibīciju, tādējādi aizsargājot organismu no ektoiskas kalcija depoziāciju uzkrāšanās, piemēram, asinsvadu sienā (*Scatena et al.*, 2007). Interesanti atzīmēt *Choi et al.* (2008) pētījumu, kurā parādās OP dubultās funkcijas – autori ankilizējošā spondilīta pacientiem atzīmējuši augstāku OP līmeni asins serumā un uzskata, ka OP prevalējošā loma ir kaula remodelēšanas procesā, kā sekundāru atstājot tā nozīmi iekaisuma uzturēšanā. Arī *Cho et al.* (2009) norādījis OP saistību ar imūno sistēmu aprakstot, ka OP klasificējams kā T palīgšūnu citokīns, kas var izraisīt iekaisuma paasinājumu hronisku saslimšanu gadījumos, ieskaitot aterosklerozi. Neskatoties uz jau minēto, arī jaunākos pētījumos tiek norādītas atšķirīgas OP funkcionālās izpausmes tādos procesos kā attīstība, brūču dzīšana, imunoloģiskās reakcijas, kaulaudu resorbcija un kalcifikācija (*Sodek et al.*, 2000). Uz šīm funkcijām, proti, OP kā fosforilāciju veicinoša faktora iesaisti biomineralizācijā, kaulaudu remodelēšanā un imūnās sistēmas atbildes reakcijas uzturēšanā norāda arī *Li et al.* (2015).

Attiecībā uz biomateriālu implantāciju literatūrā sastopami salīdzinoši maz datu par biomateriālu selektīvu ietekmi uz OP ekspresiju. Tā, *Lee et al.*, (2011) aprakstījis, ka ar HAP pārklāti titāna implantāti izraisa gan OP, gan OC paaugstināšanos implantācijas rajonos jau 3 mēnešus pēc implantācijas. *Ruckh et al.* (2012) novērojis, ka jau 3 nedēļas pēc dažādas koncentrācijas (1% un 10%) HAP un PCL kompozītu implantācijas kaulaudos ir atrodami ievērojami OP perēkļi, tādējādi secinot, ka biomateriālu sastāva būtiska komponente ir tieši HAP, pat neskatoties uz to, cik liels ir HAP īpatsvars biomateriālā. Bet, jau dažus gadus vēlāk *Zheng et al.* (2014) aprakstījis, ka tomēr HAP un OP ir augsts savstarpējās mijiedarbības potenciāls.

Osteokalcīns (OC), kas, salīdzinoši ar aptuveni 300 aminoskābju saturošo OP, ir mazs proteīns (sastāv no 49 aminoskābēm) un ir zināms kā γ -karboksi glutamīnskābi saturošs kaula pamatvielas glikoproteīns, un to ekspresē osteoblasti, odontoblasti, cementoblasti un hondrocīti (*Lee et al.*, 2000; *Lombardi et al.*, 2015). OC nozīmīgo lomu kaula vielmaiņā

procesā un osteogēnēzē savos pētījumos aprakstījuši arī *Davis et al.* (2006), *Lee et al.* (2007), *Lombardi et al.* (2015). Kā apraksta *Lombardi et al.* (2015), OC karboksilēšanās pakāpe nosaka kalcija jonu afinitāti izgulsnēties kaula ekstracelulārā matricē gan fizioloģiskos, gan patoloģiskos stāvokļos. Vairākos pētījumos atzīmēts, ka kaula matricē proteīniem – OP, OC un osteonektīnam ir vadoša loma kolagēna I integrācijas procesā ar HAP kristāliem kaula matricē (*Robey et al.*, 1993; *Young*, 2003; *Hamada et al.*, 2008).

Tiek uzskatīts, ka OC ir specifisks kaula formēšanās procesa biomarķieris attālinātos laika periodos. Tomēr literatūrā joprojām maz pieejami dati par OP un OC ekspresiju dentālo implantāciju gadījumos attālinātos laika periodos un, īpaši, par biomateriālu – HAP, Ca-P, PMMA selektivitāti OC un OP izdalē dentālo implantāciju gadījumos. Tomēr, interesanti atzīmēt dažus no pētījumiem, kur aprakstīta HAP un sintētiskā materiāla – PMMA ietekme uz kaulu matricē proteīnu izdali. Tā, *Endres et al.* (2006), izmantojot vakuuma plazmas – izsmidzinoša (*spray*) tipa un “tīra” titāna implantātus, aprakstījuši OC, OPG un sārmainās fosfatāzes ekspresijas atšķirības, proti, tā bija izteiktāka audos ar HAP pārklātu implantātu. *Santarelli et al.* (2014) dabīgā, no liellopa iegūtā, HAP un sintezēta nanokristālu hidroksiapatīta biosaderības pētījumā *in vitro*, izmantojot MG-63 šūnu līniju (cilvēka osteosarkomas šūnu līnija), konstatēja variablu osteogēno marķieru – OC un OP ekspresiju eksperimenta un kontroles audos. Par PMMA interesanti atzīmēt sekojošus datus. Tā, *Zambonin et al.* (1998) PMMA *in vitro* pētījumā cilvēka osteoblastu kultūrā novēroja augstu gan OC, gan IL-6 ekspresiju PMMA implantācijas apvidos un vienlaikus atzīmēja nomāktu osteoblastu proliferāciju un kolagēna sintēzi. *Ohsawa et al.* (2001) pēc PMMA daļiņu implantācijas žurkas stilba kaulā novēroja PMMA stimulējošo ietekmi uz OC ekspresiju, kas noritēja vienlaikus ar osteonektīna ekspresiju. Tā arī, biomateriāla – PMMA stimulējošā iedarbība var norisināties kopā ar citiem faktoriem un izsaukt periprostētisku osteolīzi ar sekojošu paaugstinātu OC un IL-6 osteoklastogēnēzi un kaulaudu resorbciju, par ko savā pētījumā ir norādījis jau iepriekš minētais autors – *Zambonin et al.* (1998).

2.9. Kalcija fosfāta tipa un sintētiskie biomateriāli

Ortopēdiskās un neiroķirurģiskās implantoloģijas praksē pašlaik kā kaula cementus izmanto polimetilmetakrilātu (PMMA), stikla-jonomēru un kalcija fosfāta kaulu cementu. Tomēr biežāk pieejamie ir PMMA un kalcija fosfātu kaulu cementi.

Stomatoloģijas praksē potenciāli lietojamo biomateriālu pētījumos tiek izmantoti dažāda veida materiāli. Galvenokārt tie ir kalcija fosfātu saturoši materiāli – HAP. Kalcija fosfātu kaulu cementi sastāv no kalcija fosfātu sāļu pulvera (cietā fāze) un no ūdens vai ūdens

šķīdumiem (šķidrā fāze). Kalcija fosfātu cementi ir neorganiski cementi, un to cietā fāze ir viena vai vairāku kalcija fosfātu maisījums. Kalcija fosfātu cementu sastāvs ir elastīgs – iespējama tā komponentu maiņa. Kalcija fosfātu kaulu cements var būt gan tīrā veidā, gan pārklāts ar medikamentiem, poliesteriem polikaprolaktonu (PCL) vai polilaktātskābi (PLA). Kā kaula cementa sastāvdaļa tiek izmantots arī metilmetakrilāta un/vai polimetilmetakrilāta (PMMA) pulveris, vai HAP-hitozāna-PMMA savienojumi un citi materiāli. Kalcija fosfātu cementi ir biosaderīgi un to biodegradācijas ātrumu var kontrolēt, izmainot cementa sastāvu (*Kokubo, 2008; Neut and Diercks, 2008*).

Ir aprakstīts, ka pēc biodegradācijas kalcija fosfātu cements tiek aizstāts ar normāliem organisma audiem (*Baroud and Bohner, 2006; Shen and Pervaiz, 2006*). Tā kā materiālam ir salīdzinoši liela porainība un īpatnējā virsma, tad kalcija fosfātu kaulu cementi ir īpaši piemēroti dažādu vielu sorbcijai. Zinātniskajā literatūrā atrodams, ka kalcija fosfāta cementi atzīmēti kā perspektīvas medikamentu ievades sistēmas – plaša spektra ārstniecības līdzekļu (antibiotikas, hormoni, augšanas faktori, pretvēža medikamenti) piegādei un šūnu pamatņu veidošanai kaulaudu inženierijā (*Habraken et al., 2007; Verron et al., 2010*).

Kalcija fosfāta materiālus, īpaši HAP ($(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$), to ķīmiskā sastāva un kristalogrāfiskās līdzības ar dabīgajiem kaulaudiem, bioaktīvo un osteokonduktīvo īpašību dēļ, prevalējoši izmanto cieto audu – kaulaudu aizvietošanā (*Shepherd and Best, 2011*). Kalcija fosfāta cementus galvenokārt izmanto slodzi nenesošās vietās, proti, sejas un žokļa un galvaskausa kaulu labošanai kā pildmateriālu vietās, kurās slodzi nes kāda cita struktūra (*Kokubo, 2008*).

Literatūrā aprakstīts, ka, salīdzinot ar TCP, HAP resorbcijas īpašības ir mazāk izteiktas un tādējādi HAP var palikt audos salīdzinoši ilgāku laiku pēc implantācijas. Turklāt TCP var tikt pilnībā aizvietots, pateicoties tā stimulējošai ietekmei uz kaulaudu remodelēšanos, t. i., jaunu kaulaudu formēšanos un izteiktāku resorbciju (*Kamitakahara et al., 2008*). Tādēļ TCP keramikas materiāliem, kā biomateriāliem, tiek pievērsta liela uzmanība kaulaudu reģenerācijas jautājumos.

HAP keramikas biomateriāls, kura pamatā ir dabīgam kaulam līdzīga sastāva pulveris, tiek plaši izmantots kaulaudu aizvietošanā. Ir aprakstīts, ka tā bioresorbcija, salīdzinoši ar TCP, ir zema un biomateriāla fragmenti audos var saglabāties ilgu laiku pēc implantācijas (*Kamitakahara et al., 2008*). Līdz ar to tiek uzskatīts, ka TCP varētu būt biosaderīgāks materiāls, bet tomēr šī jautājuma risināšanai ir nepieciešami turpmāki pētījumi.

PMMA cements ir polimērs, kura cietās fāzes galvenā sastāvdaļa ir PMMA mikrolodītes jeb polimetilmetakrilāta daļiņas, kas veido cieto fāzi, un metilmetakrilāta

monomērs, kas veido šķidro fāzi un cementa lielāko daļu. Metilmetakrilātam polimerizējoties, izdalās liels siltuma daudzums, kas var izraisīt apkārtējo audu bojājumu, turpretim PMMA cementi ir biotolerants materiāls (organisms izolē materiālu ar plānu saistaudu kapsulu) un organismā netiek bioresorbēts un aizstāts ar saimnieka organisma audiem. PMMA ir caurspīdīgs termoplastisks materiāls, kas pēc ķīmiskās struktūras ir metilmetakrilāta sintētisks poliesteris un savas tehniskās izturības dēļ parasti tiek izmantots kā implantāta fiksējošs materiāls locītavu protēzēs un kaulaudu defektu novēršanai (*Talmdage, 2006*). Ir aprakstīti pētījumi par tādu kombinētu biomateriālu kā PMMA-HAP-hitozāna, PMMA-Ca hlorīda un alkoksilāna savienojumu izmantošanu implantoloģijā (*Miyazaki et al., 2003; Kim et al., 2004*), bet reaktogenitātes pētījumi par “tīru” PMMA materiālu praktiski nav atrodami.

Ca fosfāta keramikas kā bioaktīva kaula aizvietotāja reaktogenitātes pētījumos norādīts, ka, izmantojot minēto materiālu implantāciju trušiem un pelēm, konstatēta kaula un implantāta laba kontakta veidošanās, un autori arī norādījuši, ka tas veicina kaulaudu formēšanos atšķirīgos laika posmos (*Baslé et al., 1993; Roldán et al., 2010*).

Jāatzīmē, ka tomēr trūkst datu par precīzi noteiktiem laika intervāliem, kuros veidojas vizuāli konstatējamas reģenerācijas pazīmes, kas dotu iespēju izstrādāt diagnostiski prognostiskos rādītājus, izvēloties noteikta tipa un veida biomateriālus.

3. MATERIĀLS UN METODEDES

3.1. Pētījuma materiāls

Audu reaktogenitātes pētījumam biomateriālu implantācijai tika izmantoti eksperimenta dzīvnieki – Kalifornijas truši. Pētījuma veikšanai tika saņemta Latvijas Pārtikas un Veterinārā dienesta atļauja (Nr. 24 no 02.07.2010. gads). Dzīvnieki tika turēti Rīgas Stradiņa universitātes Eksperimenta dzīvnieku laboratorijā, pētījuma laikā tika ievērotas prasības saskaņā ar Ministru kabineta noteikumiem Nr.1131 “Noteikumi par dzīvnieku audzētāju, lietotāju reģistru. Kārtība, kādā veicamas darbības ar izmēģinājuma dzīvniekiem, un izmēģinājuma dzīvnieku labturības prasības”. Noteikumi bija spēkā no 2010. gada 30. decembra līdz 2012. gada 31. decembrim, biomateriālu implantācijas operācijas un dzīvnieku eitanāzija tika veikta laika posmā no 2009. gada 20. jūlija līdz 2012. gada 06. martam.

Dzīvnieku vienas puses apakšžokļa vai stilbu kaulaudi tika izvēlēti biomateriālu implantācijai, bet otras puses apakšžokļa vai stilbu kaulaudi, un mīkstie audi – kontroles paraugu veidošanai. Pētījumā tika iekļauti 19 dzīvnieki, kopumā iegūti 33 eksperimentālie paraugi no biomateriālu implantācijas zonas un 12 kontroles paraugi. Pielietojot vispārējo anestēziju ar *Sol.Ketamini* (devā 45 mg/kg) un *Sol.Dormicum* (2 mg/kg) intramuskulāri un lokālo anestēziju ar *Sol.Articaini* (5 mg/kg), tika veiktas biomateriālu implantācijas operācijas.

Operācijas metodika: biomateriālu implantācijai apakšžoklī vai stilbā tika atslāņots ādas un muskuļu lēveris, radot pieeju kaulam; pēc iepriekšminētajām darbībām ar 2 mm diametrā trepāna urbi intraossāli tika izveidots dobums jeb implantācijas loža un veikta biomateriālu implantācija; kontroles puses loža apakšžoklī vai stilbā tika izveidota līdzīgi, tikai bez biomateriāla ievietošanas – tika radīta, t. s. *sham* kontrole; operāciju brūces slēgtas ar *Vicryl* 4–0 diegu; pēc paredzētajiem implantācijas termiņiem, pielietojot gaisa embolizācijas metodi, tika veikta dzīvnieku eitanāzija un, pielietojot dimanta diska urbi ar diametru 5 mm, tika izdalīti audu bloki no biomateriālu implantācijas zonas un no kontroles puses (Ģ. Šalms, A. Skaģers, izstrādāta metodoloģija).

Pētījumam tika izmantoti nekomerciālie – RTU Rūdolfa Cimdiņa RBIAC izveidotie biomateriālu implantāti (sagatavoja J. Ločs un V. Zālīte) un komerciālais materiāls (3.1., 3.2., 3.3., 3.4. tabula).

Biomateriālu implantācijas operācijas tikai veiktas 4 posmos, kas attiecīgi tika iedalīti četros eksperimentos.

1. eksperimentālā grupa

Eksperimentālajā grupā iekļauti trīs dzīvnieki, kuru apakšžokļa labā leņķa rajonā tika implantēts RTU Rūdolfa Cimdiņa RBIAC izveidots biomateriāls – hidroksiapatīta (HAP) granulas (3.1. tabula). Kontrolei tika izmantots minēto trušu apakšžokļa kreisā leņķa rajons. Viena truša eitanāzija veikta pēc 6 mēnešiem un divu trušu – pēc 8 mēnešiem. Pēc eitanāzijas procedūras veikta kaulaudu bloku ar biomateriālu un kontroles audiem izzāgēšana. Tādējādi turpmākai morfoloģiskai izmeklēšanai kopumā iegūti trīs kaulaudu paraugi ar biomateriālu un trīs – ar kontroles audiem.

3.1. tabula

1. eksperimentālajā grupā izmantotie biomateriāli un to raksturojums

Lokalizācija	Biomateriāla veids	Biomateriāls	Īss biomateriāla raksturojums
Trusis Nr. 1, apakšžokļa labā leņķa rajons	GRANULAS	apdedzinātas hidroksiapatīta-2 (HAP-2) granulas	neorganisks kalcija fosfāta granulu veida implantāts, apdedzināts 1150 °C; lielā virsmas laukuma dēļ, iespējams, ir biodegradējošs
Trusis Nr. 2, labā leņķa rajons		apdedzinātas HAP-2 granulas	neorganisks kalcija fosfāta granulu veida implantāts, apdedzināts 1150 °C; lielā virsmas laukuma dēļ, iespējams, ir biodegradējošs
Trusis Nr. 3, labā leņķa rajons		apdedzinātas HAP-2 granulas	neorganisks kalcija fosfāta granulu veida implantāts, apdedzināts 1150 °C; lielā virsmas laukuma dēļ, iespējams, ir biodegradējošs
Trusis Nr. 1, kreisās puses leņķa rajons	KONTROLE	-	-
Trusis Nr. 2, apakšžokļa kreisās puses leņķa rajons		-	-
Trusis Nr. 3, apakšžokļa kreisās puses leņķa rajons		-	-

2. eksperimentālā grupa

Grupā iekļauti 4 Kalifornijas truši, no kuriem trīs eksperimenta trušiem abos stilba kaulos, bet vienam trusim – apakšžokļa abās pusēs tika izveidots kaula defekts un piepildīts ar RTU Rūdolfa Cimdiņa RBIAC izveidotiem biomateriālu implantātiem un komerciālo materiālu (3.2. tabula). Minētajās lokalizācijās tika izveidoti urbuma caurumi kontroles audu iegūšanai. Kopumā tika izveidoti 8 eksperimentālie objekti ar biomateriālu un 6 – kontrolei. Dzīvnieku eitanāzija veikta pēc trīs mēnešiem.

2. eksperimentālajā grupā izmantotie biomateriāli un to raksturojums

Lokalizācija	Biomateriāla veids	Biomateriāls	Īss biomateriāla raksturojums
Trusis Nr. 1, labās puses stilba kauls	CEMENTI	komerciālais polimetilmetakrilāta (PMMA) kaulu cements	polimēru materiāls, netiek biodegradēts, nav bioaktīvs, blīvs (ražotājs <i>Biomet Bone Cement R; Biomet Inc., Šveice</i>)
Trusis Nr. 1, kreisās puses stilba kauls		nekomerčiālais PMMA cements	polimēru materiāls, netiek biodegradēts, nav bioaktīvs, blīvs
Trusis Nr. 2, labās puses stilba kauls		α -trikalcijs fosfāta (α -TCP) cements-I	neorganisks cements, biodegradējošs, sastāv no 1,0 g cietās fāzes un 0,53 mL šķidrās fāzes, ar sākotnējo šķidrās fāzes pH 6,0; sacietēja pēc ievietošanas audos
Trusis Nr. 2, kreisās puses stilba kauls		α -TCP cements-II	neorganisks cements, biodegradējošs, sastāv no 1,0 g cietās fāzes un 0,53 mL šķidrās fāzes, ar sākotnējo šķidrās fāzes pH 7,0; sacietēja pēc ievietošanas audos
Trusis Nr. 3, labās puses stilba kauls	GRANULAS	neapdedzinātas hidroksiapatīta (HAP) granulas	neorganisks Ca/P granulu veida implantāts, iespējams, ka ir biodegradējošs (lielā virsmas laukuma dēļ). Lielāks virsmas laukums salīdzinājumā ar granulām, kas apdedzinātas 1150 °C
Trusis Nr. 3, kreisās puses stilba kauls		apdedzinātas HAP-2 granulas	neorganisks Ca/P granulu veida implantāts, apdedzināts 1150 °C; biodegradācija ļoti lēna
Trusis Nr. 4, apakšžokļa labā puse	TABLETES	ar polikaprolaktonu 30% (PCL) pārklāta HAP tablete	neorganisks HAP tabletes formas implantāts, pārklāts ar biodegradējošu poliesteru – PCL; HAP daļas biodegradācija ļoti lēna
Trusis Nr. 4, apakšžokļa kreisā puse		nepārklāta HAP tablete	neorganisks tīrs HAP tabletes formas implantāts, biodegradācija ļoti lēna

3. eksperimentālā grupa

Šajā grupā tika iekļauti 6 Kalifornijas truši, kuru apakšžokļa abās pusēs tika izveidoti kaula defekti – implantācijas ložas biomateriālu iepildīšanai un kontrolei un tika izmantoti RTU Rūdolfā Cimdiņa RBIAC izveidotie biomateriāli (3.3. tabula). Kopumā tika izveidoti 10 eksperimentālie objekti ar biomateriālu un 2 – kontrolei. Dzīvnieku eitanāzija veikta pēc trīs mēnešiem.

3.3. tabula

3. eksperimentālajā grupā izmantotie biomateriāli un to raksturojums

Lokalizācija	Biomateriāla veids	Biomateriāls	Īss biomateriāla raksturojums
Trusis Nr. 1, apakšžokļa labā puse	GRANULAS	HAP/ β -TCP-2 (hidroksiapatīts/trikalcija fosfāts-2) granulas	bifāziska keramika: 40% veidoti no trikalcijfosfāta un 60% – hidroksiapatīta; apdedzināta 1150 °C
Trusis Nr. 2, apakšžokļa labā puse		HAP/ β -TCP-2 granulas	bifāziska keramika: 40% veidoti no trikalcijfosfāta un 60% – hidroksiapatīta; apdedzināta 1150 °C
Trusis Nr. 3, apakšžokļa labā puse		β -TCP-1 granulas	monofāziska keramika, sastāvā trikalcijfosfāts, apdedzināts 1000 °C
Trusis Nr. 3, apakšžokļa kreisā puse		β -TCP-1 granulas	monofāziska keramika, sastāvā trikalcijfosfāts, apdedzināts 1000 °C
Trusis Nr. 4, apakšžokļa labā puse		HAP/ β -TCP-1 granulas	bifāziska keramika: 40% veidoti no trikalcijfosfāta un 60% – hidroksiapatīta; apdedzināta 1000 °C
Trusis Nr. 4, apakšžokļa kreisā puse		HAP/ β -TCP-1 granulas	bifāziska keramika: 40% veidoti no trikalcijfosfāta un 60% – hidroksiapatīta; apdedzināta 1000 °C
Trusis Nr. 5, apakšžokļa labā puse		β -TCP-2 granulas	monofāziska keramika, sastāvā trikalcijfosfāts apdedzināts 1150 °C
Trusis Nr. 5, apakšžokļa kreisā puse		β -TCP-2 granulas	monofāziska keramika, sastāvā trikalcijfosfāts apdedzināts 1150 °C
Trusis Nr. 6, apakšžokļa labā puse		HAP-1 granulas	monofāziska keramika, sastāvā hidroksiapatīts, apdedzināts 1000 °C
Trusis Nr. 6, apakšžokļa kreisā puse		HAP-1 granulas	monofāziska keramika, tās sastāvā hidroksiapatīts, apdedzināts 1000 °C
Trusis Nr. 1, apakšžokļa kreisā puse	KONTROLE	-	-
Trusis Nr. 2, apakšžokļa kreisā puse		-	-

4. eksperimentālā grupa

Grupā tika iekļauti 6 Kalifornijas truši, kuru apakšžokļa abās pusēs tika izveidoti kaula defekti – implantācijas ložas biomateriālu iepildīšanai un kontrolei, izņemot vienu trusi – Nr. 1, kura labās puses stilba kaulā implantēja biomateriālu, bet apakšžokļa labā puse tika izmantota kontroles veidošanai. Šajā eksperimentālajā grupā izmantoti RTU Rūdolfa Cimdiņa RBIAC izveidotie biomateriāli (3.4. tabula). Dzīvnieku eitanāzija veikta pēc 4,5 mēnešiem.

3.4. tabula

4. eksperimentālajā grupā izmantotie biomateriāli un to raksturojums

Lokalizācija	Biomateriāla veids	Biomateriāls	Īss biomateriāla raksturojums
Trusis Nr. 1, labās puses stilba kauls	CEMENTI	α -trikalcijs fosfāta (α -TCP) cements pH 8,0	neorganisks cements, biodegradējošs, sastāv no 1,0 g cietās fāzes un 0,57 mL šķidrās fāzes; cementa pH 8,0; sacietēja pēc ievietošanas audos
Trusis Nr. 1, apakšžokļa kreisā puse		α -TCP cements pH 8,0	neorganisks cements, biodegradējošs, sastāv no 1,0 g cietās fāzes un 0,57 mL šķidrās fāzes; cementa pH 8,0; sacietēja pēc ievietošanas audos
Trusis Nr. 2., apakšžokļa labā puse		α -TCP cements pH 7,0	neorganisks cements, biodegradējošs, sastāv no 1,0 g cietās fāzes un 0,57 mL šķidrās fāzes; cementa pH 7,0; sacietēja pēc ievietošanas audos
Trusis Nr. 2., apakšžokļa kreisā puse		α -TCP cements pH 7,0	neorganisks cements, biodegradējošs, sastāv no 1,0 g cietās fāzes un 0,57 mL šķidrās fāzes; cementa pH 7,0; sacietēja pēc ievietošanas audos
Trusis Nr. 3, apakšžokļa labā puse		α -TCP cements pH 6,0	neorganisks cements, biodegradējošs, sastāv no 1,0 g cietās fāzes un 0,57 mL šķidrās fāzes; cementa pH 6,0; sacietēja pēc ievietošanas audos
Trusis Nr. 3, apakšžokļa kreisā puse		α -TCP cements pH 6,0	neorganisks cements, biodegradējošs, sastāv no 1,0 g cietās fāzes un 0,57 mL šķidrās fāzes; cementa pH 6,0; sacietēja pēc ievietošanas audos

Lokalizācija	Biomateriāla veids	Biomateriāls	Īss biomateriāla raksturojums
Trusis Nr. 4, apakšžokļa labā puse	CEMENTI	α -TCP cements pH 8,0	neorganisks cements, biodegradējošs, sastāv no 1,0 g cietās fāzes un 0,57 mL šķidrās fāzes; cementa pH 8,0, sacietēja pēc ievietošanas audos
Trusis Nr. 4, apakšžokļa kreisā puse		α -TCP cements pH 8,0	neorganisks cements, biodegradējošs, sastāv no 1,0 g cietās fāzes un 0,57 mL šķidrās fāzes; cementa pH 8,0, sacietēja pēc ievietošanas audos
Trusis Nr. 5, apakšžokļa labā puse		α -TCP cements pH 6,0	neorganisks cements, biodegradējošs, sastāv no 1,0 g cietās fāzes un 0,57 mL šķidrās fāzes; cementa pH 6,0, sacietēja pēc ievietošanas audos
Trusis Nr. 5, apakšžokļa kreisā puse		α -TCP cements pH 6,0	neorganisks cements, biodegradējošs, sastāv no 1,0 g cietās fāzes un 0,57 mL šķidrās fāzes; cementa pH 6,0, sacietēja pēc ievietošanas audos
Trusis Nr. 6, apakšžokļa labā puse		α -TCP cements pH 7,0	neorganisks cements, biodegradējošs, sastāv no 1,0 g cietās fāzes un 0,57 mL šķidrās fāzes; cementa pH 7,0, sacietēja pēc ievietošanas audos
Trusis Nr. 6, apakšžokļa kreisā puse		α -TCP cements pH 7,0	neorganisks cements, biodegradējošs, sastāv no 1,0 g cietās fāzes un 0,57 mL šķidrās fāzes; cementa pH 7,0, sacietēja pēc ievietošanas audos
Trusis Nr. 1, apakšžokļa labā puse	KONTROLE	-	-

3.2. Pētījuma metodes

3.2.1. Morfoloģiskā pētījuma metodes

Pētījumā tika izmantotas klasiskās audu sagatavošanas un morfofunkcionālās izmeklēšanas metodes, kuras veiktas Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūtā valsts pētījuma programmas “Inovatīvu daudzfunkcionālu materiālu, signālapstrādes un informātikas tehnoloģiju izstrāde konkurētspējīgiem zinātnes ietilpīgiem produktiem” 4. projekta “Jauni materiāli un tehnoloģijas bioloģisko audu izvērtēšanai un aizvietošanai” ietvaros (M. Pilmane, N. Moroza).

3.2.1.1. Audu fiksācija, apstrāde un sagatavošana rutīnas un imūnhistoķīmiskai krāsošanai

Pēc kaulaudu bloku izdalīšanas audi tika ievietoti fiksējošā šķīdumā – *Sol. Stefanini*, kas tika pagatavots pēc sekojošas metodes: 125 mL 16% paraformaldehīda šķīdumam pievienoja 150 mL pikrīnskābi un 425 mL 0,1 M nātrija fosfāta buferi, destilēto ūdeni, līdz iegūts 1 litrs šķīduma; tad pievienoja 10 M NaOH, lai iegūtu šķīdumu ar pH 7,3. Fiksējošā šķīdumā audi tika turēti ne mazāk kā 24 stundas. Pēc fiksācijas *Sol. Stefanini* kaulaudi tika dekalcinēti ar šķīdumu *Decalcifer, rapid* (kods ITB RS 155800054, firma *I.T. Baker*, Holande). Tad audi tika atūdeņoti, pielietojot etilspirtus no 70° līdz 96°, un attaukoti ksilola šķīdumā. Tad sekoja audu ieguldināšana kasetēs ar parafīnu, izveidojot, t. s., parafīna blokus, no kuriem tika sagatavoti 3–5 µm biezi griezumumi ar mikrotomu (firma *Leica*, RM2245) un uzklāti uz priekšmetstikliem turpmākai apstrādei un krāsošanai (hematoksilīna/eozīna metodes pielietošanas gadījumā tika izmantoti priekšmetstikli *Diapath* ((firma *Diapath*, Itālija)), bet imūnhistoķīmiskai krāsošanai – priekšmetstikli *Histoband* (firma *Marienfield*, Vācija)).

3.2.1.2. Audu krāsošanas metodes

Pārskata morfoloģiskās ainas iegūšanai kaulaudu un mīksto audu morfoloģiskajai izpētē tika izmantota rutīnizmeklēšanas metode ar hematoksilīnu/eozīnu (*Kiernan et al.*, 2008). Biomarkieru noteikšanai tika veikta audu imūnhistoķīmiska krāsošana, izmantojot biofīna un streptavidīna metodi (*Hsu et al.*, 1981). Šūnu apoptozes noteikšanai tika izmantots TUNEL (*terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end labelling*) *in situ* kits (*Roche Applied Science, Vācija*) (*Gavrieli et al.*, 1992) un *Caspase* kits (firma *Abcam* [EP1325Y], ab.5259, Lielbritānija).

3.2.1.2.1. Hematoksilīna un eozīna metode

Pirms krāsošanas audu griezumumi tika deparafinizēti, tos skalojot divas reizes pa 10 min ortoksilola šķīdumā, tad pa 3 min 96° un 70° etilspirtā. Tad audi 3 min tika skaloti destilētā ūdenī, 10 min krāsoti hematoksilīna šķīdumā (*Mayers Hematoxylin*, kods 05M06002, *Bio-Optica*, Itālija), 10 min skaloti tekošā krāna ūdenī, 2 min skaloti *Scotch* bufera šķīdumā, 2 min krāsoti eozīna šķīdumā (*Eosin Y Alcoholic solution*, kods 05B1003, *Bio-Optica*, Itālija), 2 min skaloti destilētā ūdenī, tad 3 reizes pa 3 min ievietoti 70°, 96° etilspirtos, uz īsu mirkli karboksilolā un 1 min ortoksilola šķīdumā. Tad preparātu pārklāja ar polistirolu un pārsedza

ar segstikliņu. Pēc šīs metodes šūnu kodoli iekrāsojās bazofīli – zili violetā krāsā un šūnu citoplazma iekrāsojās acidofīli – rozā krāsā.

3.2.1.2.2. Biotīna un streptavidīna imūnhistoķīmiskā metode

Audu paraugi 24 stundas tika fiksēti 2% formaldehīda un 0,2% pikrīnskābes 0,1 M fosfātu bufera (pH 7,2) maisījuma šķīdumā, tad 12 stundas skaloti 10 % saharozi saturošā tiroīda buferī un atūdeņoti. Tad audi tika ieguldināti parafīnā un ar mikrotomu sagriezti 3–5 µm biezus griezumus un uzklāti uz *Histoband* priekšmetstikliem.

Audu parafīna griezumi tika krāsoti pēc sekojoša protokola:

1. Deparafinizācija (3 reizes pa 5 min ksilola šķīdumā);
2. Skalošana spirtā (3 min – 70°, 3 min – 96°, 3 min – 96°) un destilētā ūdenī;
3. Skalošana 10 min mazgāšanas buferšķīdumā (*TRIS buffer solution* TWEEN20, kods T0083, firma *Diapath*, Itālija);
4. Ievietošana uz 5 min 750W temperatūrā mikroviļņu krāsnī EDTA vārīšanās buferšķīdumā (kods TU103, firma *Diapath*, Itālija);
5. Atzesētu paraugu skalošana divas reizes pa 5 min mazgāšanas buferšķīdumā;
6. Paraugu apstrāde ar 3% ūdeņraža peroksīdu 10 min;
7. Paraugu skalošana destilētā ūdenī, pēc tam divreiz skalojot pa 5 min mazgāšanas buferšķīdumā;
8. Fona krāsojuma mazināšana ar normālu bloķēšanas serumu 20 min (kods 9273-05, firma *Cell Marque*, ASV);
9. Paraugu 60 min ilga apstrāde ar primārām antivielām (3.5. tabula) mitrā kamerā istabas temperatūrā;
10. Paraugu skalošana 10 min mazgāšanas buferšķīdumā;
11. Paraugu 30 min inkubācija ar *LSAB +LINK* ar biotīnu saistītu sekundāro antivielu (kods K1015, *DakoCytomation*, Dānija);
12. Paraugu skalošana 5 min mazgāšanas buferšķīdumā;
13. Paraugu apstrāde 25 min ar *LSAB+KIT* ar enzīmu peroksidāzi saistītu streptavidīnu (kods K0690, *DakoCytomation*, Dānija);
14. Paraugu skalošana 5 minūtes mazgāšanas buferī;
15. Paraugu apstrāde no 3 līdz 10 min ar DAB substrāta hromogēno sistēmu (kods K3468, *DakoCytomation*, Dānija), panākot pozitīvo struktūru krāsojumu brūnā krāsā;
16. Paraugu skalošana tekošā ūdenī;

17. Paraugu krāsošana 2 min ar hematoksilīnu (*Mayers Hematoxylin*, kods 05M06002, *Bio-Optica*, Itālija).

3.5. tabula

Dati par imūnhistoķīmijā lietotajām antivielām

Faktors	Klona veids / dzīvnieks, no kā iegūta antiViela	Kods	Darba atšķaidījums	Produkta ražotājs
βDef-2	poliklonāla/ kaza	AF 2758	1:100	<i>RD systems</i> , Lielbritānija
IL-1	monoklonāla/ pele	(B-7), SC-9983	1:50	<i>Abcam</i> , Lielbritānija
IL-6	monoklonāla/ pele	SC-73319	1:50	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Kalifornija, ASV
IL-8	poliklonāla/ kaza	(c-19), SC-1269	1:50	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Kalifornija, ASV
IL-10	poliklonāla/ trusis	Ab-34843	1:400	<i>Abcam</i> , Lielbritānija
BMP-2/4	poliklonāla/ kaza	AVI-024011	1:100	<i>R/D systems</i> , Vācija
OPG	poliklonāla/ kaza	SC-8468	1:40	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Kalifornija, ASV
OP	poliklonāla/ trusis	Ab-8448	1:100	<i>Abcam</i> , Lielbritānija
OC	poliklonāla/ trusis	FL-100, SC-3004	1:100	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Kalifornija, ASV
<i>Caspase-6</i>	monoklonāla/ trusis	(EP 13254) Ab-52951	1:250	<i>Abcam</i> , Lielbritānija

3.2.1.2.3. Metode apoptozes noteikšanai

Apoptozes noteikšanai ar *TUNEL* metodi tika izmantots apoptozes noteikšanas komplekts (*In situ Cell Death Detection* POD, kods: REF-11684817910, LOT-13799800, *Roche Diagnostics* DNase I, *Roche Applied Science*, Vācija) ar darba atšķaidījumu – 1:10 un pēc *Gavrieli et al.* (1998) aprakstītās krāsošanas procedūras. Deparafinizēti audu griezumumi 10 min tika turēti istabas temperatūrā fosfāta bufera šķīdumā (PBS), kas saturēja 0,25% Triton X-100. Endogēnās peroksidāzes aktivitātes bloķēšanai audu griezumumi uz 30 min tika ievietoti šķīdumā, kas saturēja 50 mL PBS un 500 µl 30% H₂O₂ peroksīdu. Pēc tam griezumumi trīs reizes pa 5 min tika skaloti ar PBS. Pēc skalošanas preparāti tika ievietoti citrāta buferšķīdumā un 10 min tika karsēti mikroviļņu krāsnī 700W temperatūrā, lai atmaskotu antigēnu. Pēc atdzesēšanas istabas temperatūrā preparāti 5 min tika skaloti ar PBS. Viens audu griezumums kontroles nolūkā tika pārklāts ar DNase, bet visi audu griezumumi uz 10 min tika ievietoti 0,1% govus seruma albumīna fosfātu bufera šķīdumā. Tad sekoja audu inkubēšana ar *TUNEL mix*

(*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridinetriphosphate nick end-labelling* – T gala deoksinukleotidiltransferāzes un dioksigenīda iezīmēto nukleotīdu maisījums) 37 °C mitrā kamerā 60 min. Pēc skalošanas fosfātu bufera šķīdumā griezumus 30 min inkubēja ar POD 37 °C. Peroksidāzes iezīmēšanai audu griezumi tika noklāti ar diamino benzidīna hromogēnu (*Vector*, No SK 4100) uz 7 min. Tad audi tika atkārtoti skaloti destilētā ūdenī, pēc tam tiem tika veikta kontrastkrāsošana 20 sekundes ar hematoksilīnu. Tādējādi, apoptotisko šūnu kodoli iekrāsojās brūnā krāsā. Iekrāsoto šūnu skaitīšanai tika nejauši izvēlēti 3 redzeslauki, kas savā starpā nepārklājās.

Ar *TUNEL* metodi tika nokrāsoti daži kaulaudu paraugi. Apoptozes noteikšanai tika testēta arī *Caspase-6* antivielu (*Abcam*, Lielbritānija). Tā kā vienos un tajos pašos izvēlētajos paraugos tika konstatēts vienāds apoptotisko šūnu skaits – gan krāsojot pēc *TUNEL* metodes, gan ar *Caspase-6* antivielu, tad finansiālu apsvērumu dēļ pārējo paraugu krāsošanai apoptozes noteikšanai izmantota *Caspase-6* antivielu, krāsojot pēc biotīna un streptavidīna imūnhistoķīmiskās metodes.

3.2.2. Iegūto datu vizualizācija un to statistiskās apstrādes metodes

Audu mikropreparātu vizualizācijai tika izmantota gaismas mikroskopija un fotografēšana ar mikroskopu *Leica DMRB* un apstrāde ar datorprogrammu *Image-Pro Plus*.

Imūnhistoķīmiski un pēc *TUNEL* metodes noteikto parametru/rādītāju relatīvā biežuma novērtēšanai kaulaudos tika izmantota morfoloģijas praksē plaši lietotā, arī literatūrā aprakstītā, puskvantitatīvā skaitīšanas metode (*Tobin et al.*, 1990; *Pilmane et al.*, 1998). Faktoru ekspresija tika analizēta viena griezuma trīs nejauši izraudzītos redzeslaukos (3.6. tabula).

3.6. tabula

Imūnhistoķīmiski un pēc *TUNEL* metodes noteikto pozitīvo struktūru relatīvā biežuma apzīmēšana

-	pozitīvas struktūras redzeslaukā neatrod
+	maz pozitīvu struktūru redzeslaukā
++	vidēji daudz pozitīvu struktūru redzeslaukā
+++	daudz pozitīvu struktūru redzeslaukā
++++	ļoti daudz pozitīvu struktūru redzeslaukā

Datu statistiskā analīzē tika lietotas aprakstošās un analītiskās statistikas metodes. Morfoloģiskās atrades rādītāju sastopamības atšķirību novērtēšanai tika izmantoti neparametriskie datu analīzes testi, t. i., *Mann–Withney* (Manna–Vitnija) un *Wilcoxon*

(Vilkoksona) testi. Imūnpozitīvo šūnu un apoptozes aprakstīšanai tika izmantoti vidējais aritmētiskais un izkliedes rādītāji (standartnovirze un standartklūda). Pētījumā tika izmantots būtiskuma līmenis $\alpha=0,05$. Tātad, ja statistisko testu aprēķinos p vērtība bija mazāka par 0,05 ($p<0,05$), tad rezultāti tika uzskatīti par ticamiem. Lai izvērtētu divu mainīgo lielumu savstarpējās atbilstības ciešumu, tika izmantota *Spearman's* (Spīrmena) korelāciju metode. Korelācijas koeficientu r_s kā sakarības ciešuma kvantitatīvo rādītāju starp diviem vai vairākiem mainīgajiem lielumiem aprēķināja kā Spīrmena korelāciju koeficientu. Ja korelācijas koeficients bija no 0,7 līdz 0,9 – cieša korelācija vērtība. Ja korelācijas koeficients no 0,3 līdz 0,7 – vidēja korelācija, ja mazāks par 0,3 (0,1–0,3) – vāja korelācija. Ar vienu un divām zvaigznītēm*· ** atzīmēta statistiski ticama korelācija.

Statistiskā analīze tika veikta ar *IBM SPSS 20 (SPSS Inc., USA)* datorprogrammas palīdzību.

4. REZULTĀTI

4.1. Morfoloģiskā pētījuma un datu statistiskās analīzes rezultāti 1. eksperimentālajā grupā

4.1.1. Morfoloģiskās rutīnās izmeklēšanas rezultāti

Mīksto audu pārskata griezumos gan pēc **6**, gan **8 mēnešiem** implantāta – apdedzināta hidroksiapatīta-2 (HAP-2) rajonā tika atrastas līdzīgas pārmaiņas audu struktūrā – atsevišķu skeleta šķērsvītrotu muskuļšķiedru distrofija un jaunveidošanās, vietām ar iekaisuma šūnu, galvenokārt, limfocītu infiltrāciju endo- un perimīzijā (4.1. mikrofotogrāfija pielikumā). Kontroles rajona mīkstajos audos arī tika konstatētas minētās morfoloģiskās izmaiņas, bet tikai dažos redzeslaukos un maz izteiktas.

Vienā no kaulaudu paraugiem **6 mēnešus** pēc HAP-2 implantācijas, tā rajonā tika konstatētas granulas, kas ietvertas granulācijas audus saturošā kapsulā (4.2. mikrofotogrāfija pielikumā). Kaulaudu pārskata griezumos kontroles audu rajonā pēc **6 un 8 mēnešiem** tika konstatētas perēkļveida osteonu kanālu daļēja un pilnīga obliterācija ar saistaudiem un atsevišķu asinsvadu skleroze (4.3. mikrofotogrāfija pielikumā).

4.1.2. Imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas rezultāti un to statistiskās apstrādes dati

Antimikrobā faktora β -defensīna-2 (β Def-2), kaulu augšanas faktora – kaula morfoģenētiskā proteīna-2/4 (BMP-2/4), kaulaudu aktivitātes marķiera – osteoproteģerīna (OPG), kaula matricē proteīnu osteopontīna (OP) un osteokalcīna (OC), un citokīnu – interleikīnu (IL)-1, IL-6, IL-8 un IL-10 saturošo šūnu skaits kaulaudos **6 un 8 mēnešus** pēc HAP-2 implantācijas bija atšķirīgs gan eksperimenta, gan kontroles audos (4.1. tabula).

Biomateriāla rajona kaulaudos **6 mēnešus** pēc implantācijas antimikrobā proteīna β Def-2 aktivitāte netika novērota, t. i., netika konstatēts neviens β Def-2 pozitīvs osteocīts. Savukārt kontroles puses audos tika novērots vidēji daudz (++) β Def-2 pozitīvu struktūru pēc **6 mēnešiem**. Pēc **8 mēnešiem** biomateriāla rajonā β Def-2 pozitīvi osteocīti netika atrasti un kontroles rajona kaulaudos bija tikai maz (+) β Def-2 pozitīvu osteocītu.

Augšanas faktoru klātbūtne tika konstatēta abos periodos gan eksperimenta audu rajonā, gan kontroles audos, bet pozitīvo šūnu sadalījums bija ar nelielām atšķirībām un mainīgs implantācijas un kontroles rajonā. Tā, minētajos paraugos **6 mēnešus** pēc implantācijas tika konstatēts vidēji daudz (++) BMP-2/4 pozitīvu osteocītu (4.4. mikrofotogrāfija pielikumā), bet kontroles rajonā – tikai maz (+) BMP-2/4 pozitīvu osteocītu

(4.5. mikrofotogrāfija pielikumā). Arī **8 mēnešus** pēc implantācijas kaulaudos bija vidēji daudz (++) BMP-2/4 pozitīvu osteocītu (4.6. mikrofotogrāfija pielikumā), bet kontroles grupā tika konstatēts vidēji daudz (++) līdz daudz (+++) BMP-2/4 pozitīvu struktūru (4.7. mikrofotogrāfija pielikumā).

4.1. tabula

βDef-2, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, BMP-2/4, OPG, OC un OP ekspresējošo šūnu relatīvais sadalījums implantāta un kontroles apvida kaulaudos truša apakšžoklī 1. eksperimentālajā grupā

Biomateriāls	Hidroksiapatīts-2					
	6 mēneši		8 mēneši			
Marķieri:	Paraugs Nr.1	Kontrole	Paraugs Nr.1	Kontrole	Paraugs Nr.1	Kontrole
βDef-2	–	++	–	–	–	+
BMP-2/4	++	+	+	++	++	+++
OPG	–	+	+	++	++++	++++
OC	+	+	+	+	+	+
OP	–	++	+	++	+	+
IL-1	+	++	++	++	+	+
IL-6	++	+++	+	++	+++	+++
IL-8	+	+	+	+	+	+
IL-10	++	+	++	+++	+++	+++

¹IKL – implantācijas un kontroles laiks; (–) – nav nevienas imūnhistoķīmiski pozitīvas struktūras redzeslaukā, (+) – maz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā, (++) – vidēji daudz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā, (+++) – daudz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā, (++++) – ļoti daudz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā; βDef-2 – β-defensīns-2, BMP-2/4 – kaula morfoģenētiskais proteīns-2/4, OPG – osteoproteģerīns, OC – osteokalcīns, OP – osteopontīns, IL-1 – interleikīns-1, IL-6 – interleikīns-6, IL-8 – interleikīns-8, IL-10 – interleikīns-10

HAP-2 implantācijas apvidū pēc **6 mēnešiem** OPG pozitīvi osteocīti netika konstatēti, bet, savukārt, kontroles rajonā tika atrasts maz (+) OPG pozitīvu osteocītu. Turklāt **8 mēnešus** pēc HAP-2 implantācijas kaulaudos tika konstatēts maz (+) līdz ļoti daudz (++++) OPG pozitīvu struktūru – osteocītu (4.8. mikrofotogrāfija pielikumā), bet kontroles apvidū tika konstatēts vidēji (++) daudz līdz ļoti daudz (++++) OPG pozitīvu struktūru (4.9. mikrofotogrāfija pielikumā).

Kaulu matricē proteīna osteokalcīna (OC) ekspresija **6 un 8 mēnešus** pēc HAP-2 implantācijas tika konstatēta vienlīdz izteikta kā biomateriāla implantācijas, tā kontroles rajonos, kur tika konstatēti maz (+) OC pozitīvu osteocītu.

Kaulu matricē proteīna osteopontīna (OP) ekspresija pēc **6 mēnešiem** netika konstatēta HAP-2 implantācijas rajonā. Savukārt kontroles rajonos tā saturošās šūnas tika konstatētas vidēji daudz (++) OP ekspresijas morfoloģiskā aina pēc **8 mēnešiem** uzrādīja maz

(+) OP pozitīvu osteocītu implantācijas rajonā (4.10. mikrofotogrāfija pielikumā), bet kontroles rajonā tika konstatēts maz (+) līdz vidēji daudz (++) OP pozitīvu osteocītu (4.11. mikrofotogrāfija pielikumā).

Sešus mēnešus pēc HAP-2 implantācijas proinflaturo citokīnu IL-1 un IL-6 saturošo šūnu skaits eksperimenta un kontroles audos bija atšķirīgs. Tā, biomateriāla rajonā tika atrasts maz (+) IL-1 pozitīvu osteocītu, bet kontroles rajonos – vidēji daudz (++) IL-1 pozitīvu osteocītu. **Astoņus mēnešus** pēc implantācijas gan HAP-2 implantācijas zonā (IL-1 pozitīviem osteocītiem vairāk koncentrējoties ap deģeneratīvo kaulu implantāta rajonā), gan kontroles rajonos tika konstatēts no maz (+) līdz vidēji daudz (++) IL-1 pozitīvu osteocītu.

Līdzīga tendence bija vērojama arī IL-6 ekspresijā. Tā, **6 mēnešus** pēc implantācijas biomateriāla rajonā tika konstatēts vidēji daudz (++) IL-6 pozitīvu osteocītu, bet kontroles audu rajonos – daudz (++) IL-6 pozitīvu osteocītu. Pēc **8 mēnešiem** biomateriāla apvidū tika atrasts no maz (+) līdz daudz (+++) IL-6 pozitīvu osteocītu, bet kontroles rajonā – no vidēji daudz (++) līdz daudz (+++) IL-6 saturošu osteocītu.

Proinflaturo citokīna IL-8 ekspresija šūnās bija vienādi izteikta abos pēcimplantācijas laikos gan biomateriāla (4.12. mikrofotogrāfija pielikumā), gan kontroles audu rajonos, kur tika konstatēts maz (+) IL-8 pozitīvu osteocītu.

Antiinflaturo citokīna IL-10 ekspresijā eksperimenta un kontroles audos bija vērojama variabilitāte. **Sešus mēnešus** pēc HAP-2 implantācijas tika konstatēts vidēji daudz (++) IL-10 pozitīvu osteocītu, bet kontroles rajonos to skaits bija mazāks, t. i., konstatēts maz (+) IL-10 pozitīvu šūnu. Atšķirīgs to skaits bija arī **8 mēnešus** pēc implantācijas, kur implantāta rajonā tika konstatēts no vidēji daudz (++) līdz daudz (+++) IL-10 pozitīvu osteocītu (4.13. mikrofotogrāfija pielikumā), bet kontroles audos bija daudz (+++) IL-10 pozitīvu osteocītu (4.14. mikrofotogrāfija pielikumā).

Izvērtējot biomarķierus ekspresējošo šūnu vidējo skaitu trīs redzeslaukos, tika konstatēts, ka β Def-2, IL-1, IL-6, IL-8 un IL-10, kā arī BMP-2/4, OPG, OC un OP saturošo šūnu vidējais skaits eksperimenta un kontroles audos bija atšķirīgs (4.2. tabula).

**βDef-2, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, BMP-2/4, OPG, OC un OP ekspresējošo šūnu vidējais skaits
kaulaudos un standartklūda 1. eksperimentālajā grupā**

Bioma- teriāls	Hidroksiapatīts-2					
	IKL ¹	6 mēneši		8 mēneši		
Marķie- ri:	Paraugs Nr.1 (Vid.sk. ² ±SE ³)	Kontrole	Paraugs Nr.1	Kontrole	Paraugs Nr.2	Kontrole
βDef-2	0	14,66±0,66	0	0	0	1,33±0,33
BMP- 2/4	12,66±0,88	1,33±0,33	5,33±0,33	12,33±0,33	13,00±0,57	23,66± 0,33
OPG	0	1,33±0,30	1,33±0,33	13,00±2,13	37,33±0,88	37,00±0,57
OC	4,66±1,20	2,66±0,33	3,33±0,33	1,00±0,57	1,33±0,66	1,33±0,33
OP	0	13,66 ± 2,18	2,33 ± 0,88	17,66 ± 0,33	1,33 ± 0,33	2,00±0,57
IL-1	4,33±0,88	13,00±1,73	14,00±1,52	14,00±2,00	4,66±1,20	5,00±1,15
IL-6	11,66±1,20	20,33±0,88	4,00±1,15	12,66±1,45	24,33±2,40	22,00±1,15
IL-8	5,00±1,15	5,00±2,08	3,66±1,20	4,33±0,88	6,00±1,52	4,33±1,45
IL-10	14,33±2,40	4,33±1,45	13,00±1,73	23,33±1,45	23,66±2,02	23,33±1,85

¹IKL – pēcimplantācijas un kontroles laiks; ²Vid.sk. – vidējais imūnpozitīvo šūnu skaits trīs redzeslaukos; ³SE – standartklūda; βDef-2 – β-defensīns-2, BMP-2/4 – kaula morfoģenētiskais proteīns-2/4, OPG – osteoproteģerīns, OC – osteokalcīns, OP – osteopontīns, IL-1 – interleikīns-1, IL-6 – interleikīns-6, IL-8 – interleikīns-8, IL-10 – interleikīns-10

Visinteresantākie dati tika atrasti **8 mēnešus** pēc implantācijas. Tā, **vislielākais vidējo šūnu skaits tika konstatēts vienā no kaulaudu paraugiem ar OPG marķiera ekspresiju (37,33±0,88) 8 mēnešus pēc HAP-2 implantācijas**, kā arī vienā kontroles audu paraugā (37,00±0,57). **Astoņus mēnešus** pēc implantācijas salīdzinoši liels arī BMP-2/4 ekspresējošo šūnu skaits (23,66±0,33) tika konstatēts kontroles paraugā, kas bija lielāks nekā paraugā ar biomateriālu (13,00±0,57). Interleikīnus ekspresējošo šūnu vidējais skaits bija variabls. IL-6 ekspresējošās šūnas eksperimenta paraugā **8 mēnešus** pēc implantācijas sastādīja lielāko skaitu (24,33±2,40), kas bija liels arī kontroles grupā (22,00±1,15). IL-10 ekspresējošās šūnas sastādīja līdzīgu skaitu gan eksperimenta audos (23,66±2,02), gan kontrolē (23,33±1,85) **8 mēnešus** pēc implantācijas.

Salīdzinot biomarķierus ekspresējošo šūnu vidējo skaitu starp visiem eksperimenta un kontroles grupas paraugiem **8 mēnešus** pēc implantācijas, konstatēts, ka tomēr vislielāko šūnu skaitu sastādīja OPG ekspresējošo šūnu skaits gan eksperimenta grupā (19,33±18,00), gan kontroles grupā (25,00±12,00) (4.3. tabula). Savukārt vismazāko šūnu skaitu uzrādīja OP pozitīvo šūnu skaits eksperimenta grupā (1,83±0,50) un OC pozitīvo osteocītu skaits kontroles grupā (1,16±0,16).

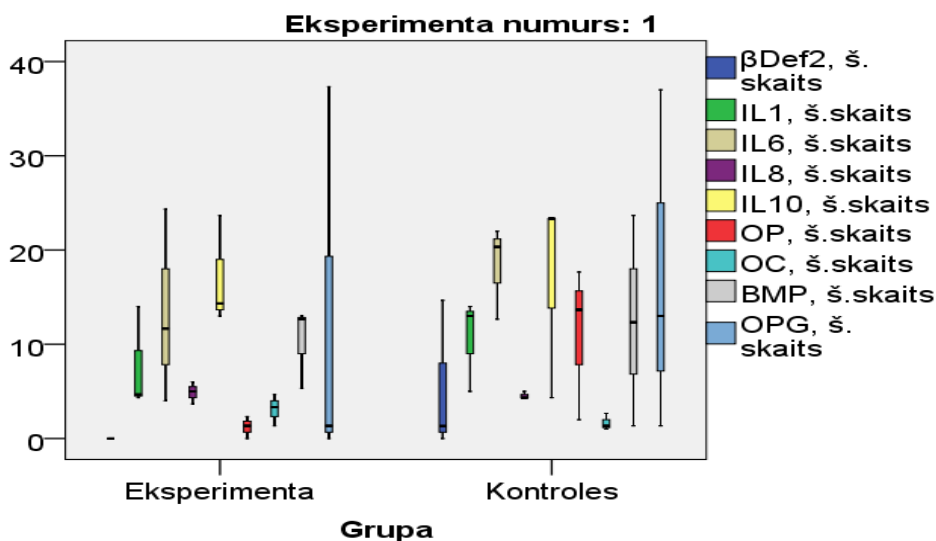
Biomarķierus ekspresējošo šūnu vidējais skaits un standartklūda eksperimentālajā un kontroles grupās 8 mēnešus pēc implantācijas 1. eksperimentālajā grupā

Grupa		β Def-2	IL-1	IL-6	IL-8	IL-10	OP	OC	BMP-2/4	OPG
E ¹	Vid.sk. ³	0	9,33	14,16	4,83	18,53±	1,83	2,33	9,16	19,33
	± SE ⁴		± 4,66	± 10,16	± 1,16	5,33	± 0,50	± 1,00	± 3,83	± 18,00
K ²	Vid.sk.	1,33	9,50	17,33	4,33	23,66	9,83	1,16	18,00	25,00
	± SE	± 0,33	± 4,50	± 4,66	± 0,50	± 6,80	± 7,83	± 0,16	± 5,16	± 12,00

¹E – eksperimentālo audu grupa; ²K – kontroles audu grupa; ³Vid.sk. – vidējais imūnpozitīvo šūnu skaits trīs redzeslaukos; ⁴SE – standartklūda; β Def-2 – β -defensīns-2, IL-1 – interleikīns-1, IL-6 – interleikīns-6, IL-8 – interleikīns-8, IL-10 – interleikīns-10, OP – osteopontīns, OC – osteokalcīns, BMP-2/4 – kaula morfoģenētiskais proteīns-2/4, OPG – osteoproteģerīns

Balstoties uz Manna–Vitnija un Vilkoksona testiem eksperimenta un kontroles grupas salīdzinājumā **8 mēnešus** pēc implantācijas, secināts, ka **1. eksperimentā β Def-2, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, BMP-2/4, OPG, OC un OP saturošo šūnu vidējais skaits statistiski ticami neatšķīrās eksperimenta un kontroles audu grupā**, $p > 0,05$, t. i., β Def-2 ($Z=1,54$; $p=0,20$), IL-1 ($Z=0,88$, $p=0,40$), IL-6 ($Z=0,65$; $p=0,70$), IL-8 ($Z=0,44$; $p=0,70$), IL-10 ($Z=0,22$; $p=0,90$), OP ($Z=1,52$; $p=0,20$), OC ($Z=1,32$; $p=0,20$), BMP-2/4 ($Z=0,21$; $p=0,91$), OPG ($Z=0,44$; $p=0,70$) (4.1. attēls).

Biomarķierus ekspresējošo šūnu vidējā skaita attēlojums kastveida diagrammā eksperimenta un kontroles grupai 8 mēnešus pēc implantācijas 1. eksperimentālajā grupā



βDef-2 š. skaits – β-defensīnu-2 ekspresējošo šūnu skaits, IL-1 š. skaits – interleikīnu-1 ekspresējošo šūnu skaits, IL-6 š. skaits – interleikīnu-6 ekspresējošo šūnu skaits, IL-8 š. skaits – interleikīnu-8 ekspresējošo šūnu skaits, IL-10 š. skaits – interleikīnu-10 ekspresējošo šūnu skaits, OP š. skaits – osteopontīnu ekspresējošo šūnu skaits, OC š. skaits – osteokalcīnu ekspresējošo šūnu skaits, BMP-2/4 š. skaits – kaula morfoģenētisko proteīnu-2/4 ekspresējošo šūnu skaits, OPG š. skaits – osteoproteģerīnu ekspresējošo šūnu skaits

4.1.3. Apoptozes izmeklēšanas rezultāti un statistiskās apstrādes dati 1.eksperimentālajā grupā

Maz (+) apoptotisku šūnu tika konstatēts kaulaudos ar HAP-2 gan **6 mēnešus**, gan **8 mēnešus** pēc implantācijas (4.15. mikrofotogrāfija pielikumā). Arī kontroles kaulaudu paraugos pēc **6 un 8 mēnešiem** tika konstatēts maz apoptotisku šūnu.

Analizējot vidējo apoptotisko šūnu skaitu, konstatēts, ka eksperimenta audu grupā to vidējais skaits trīs redzeslaukos sastādīja $8,33 \pm 0,33$, bet kontroles grupā apoptotisko šūnu skaits bija $9,00 \pm 3,00$ (4.4. tabula).

Apoptotisko šūnu skaits kaulaudos 6 un 8 mēnešus pēc HAP-2 implantācijas

Biomateriāls	Pēcimplantācijas un kontroles laiks	Relatīvais pozitīvo šūnu skaits redzeslaukā	Vidējais šūnu skaits 3 redzeslaukos ± standartklūda
HAP-2	6 mēneši	+	8,67±1,76
HAP-2	8 mēneši	+	8,00±1,15
Vidējais skaits eksperimenta audu grupā			8,33±0,33
Kontrole	6 mēneši	+	12,00±7,02
Kontrole	8 mēneši	+	6,00±1,15
Vidējais skaits kontroles audu grupā			9,00±3,00

HAP – hidroksiapatīts, (+) – maz apoptotisku šūnu vienā redzeslaukā

Balstoties uz vidējā šūnu skaita aprēķiniem 3 akli izraudzītos redzeslaukos, secināts, ka *lielāks vidējais apoptotiskais šūnu skaits gan eksperimenta, gan kontroles grupā bija pēc 6 mēnešiem. Sešus un 8 mēnešus pēc implantācijas apoptotisko šūnu vidējā skaita statistiski ticams atšķirības rezultāts netika iegūts.*

4.2. Morfoloģiskā pētījuma un statistiskās datu analīzes rezultāti 2. eksperimentālajā grupā

4.2.1. Morfoloģiskās rutīnās izmeklēšanas rezultāti

Trīs mēnešus pēc “tīras” jeb nepārklātas hidroksiapatīta (HAP) tabletes, ar polikaprolaktonu (PCL) pārklātas HAP tabletes, komerciālā polimetilmetakrilāta (PMMA) kaulu cementa (4.16. mikrofotogrāfija pielikumā), neapdedzinātu un apdedzinātu HAP-2 granulu *implantācijas*, blakus to implantācijas zonai esošajos mīkstajos audos tika konstatēta audu tūska, atsevišķu limfocītu infiltrācija un fibroblastu proliferācija, kaulaudu zonās – jaunā kaula veidošanās ar kaula – implantāta nepilnīgas saaugšanas pazīmēm. Mīkstajos audos implantātu α -trikalcija fosfāta (α -TCP) cementa un nekomerciālā PMMA cementa rajonā konstatēta neliela mīksto audu tūska, reti limfocīti un proliferējoši fibroblasti. Jaunā kaula veidošanās α -TCP cementa rajonā bija mazāk izteikta, turklāt nekomerciālā PMMA cementa rajonā tā vispār netika konstatēta.

4.2.2. Imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas rezultāti un to statistiskās apstrādes dati

Augšanas faktora BMP-2/4, kaula šūnu aktivitātes marķiera OPG un kaula pamatvielas proteīnu OP un OC ekspresija kaulaudos dažāda veida biomateriālu implantātu rajonos bija atšķirīga (4.5. tabula).

OC, OP, BMP-2/4 un OPG ekspresējošo šūnu skaita relatīvais sadalījums 3 mēnešus pēc biomateriālu implantācijas 2. eksperimentālajā grupā

Marķieri	Biomateriāla veids								Kontrole
	Paraugs Nr.1 Komerčiālais PMMA kaulu cements	Paraugs Nr.2 Nekomerci- ālais PMMA kaulu cements	Paraugs Nr.3 α -TCP cements I	Paraugs Nr.4 α -TCP cements II	Paraugs Nr.5 Neapdedzi- nātas HAP granulas	Paraugs Nr.6 Apdedzi- nātas HAP-2 granulas	Paraugs Nr.7 Ar PCL pārklāta HAP tablete	Paraugs Nr.8 Nepārklāta HAP tablete	
OPG	+++	++	++++	-	-	+	++++	+	+
OC	+++	++++	++	++	+	+	++++	++	++
OP	+++	+++	+++	++	++	+++	++++	+++	+++
BMP-2/4	+++	+	+++	+++	+++	++	++++	++/+	+++

(-) – nav nevienas imūnhistoķīmiski pozitīvas struktūras redzeslaukā, (+) – maz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā, (++) – vidēji daudz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā, (++++) – ļoti daudz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā; OPG – osteoproteģerīns, OC – osteokalcīns, OP – osteopontīns, BMP-2/4 – kaula morfogēniskais proteīns-2/4; PMMA – polimetilmetakrilāts, α -TCP – α -trikalcija fosfāts, HAP – hidroksiapatīts, PCL – polilaktolaktons

Komerčiālā PMMA cementa implantācijas rajonā kaulos tika konstatēts daudz (+++) BMP-2/4- (4.17. mikrofotogrāfija pielikumā), OPG-, OP- un OC pozitīvu struktūru – osteocītu. Kontroles audos konstatēts atšķirīgs šos biomarkierus ekspresējošo šūnu skaita sadalījums, proti, konstatēts daudz BMP-2/4 ekspresējošo šūnu (4.18. mikrofotogrāfija pielikumā) un OP ekspresējošu šūnu, vidēji daudz (++) OC- un maz OPG ekspresējošo šūnu.

Nekomerciālā PMMA cementa implantācijas rajonos BMP-2/4, OPG, OP un OC pozitīvo struktūru skaits bija variabls. Tā, tika konstatēti maz (+) BMP-2/4 pozitīvu osteocītu, kas galvenokārt koncentrējās ap biomateriālu. Šī biomateriāla rajonā perēkļveidīgi tika konstatēts daudz (+++) OP pozitīvu osteocītu (4.19. mikrofotogrāfija pielikumā), kas bija vienādā daudzumā ar kontrolē konstatēto (4.20. mikrofotogrāfija pielikumā), un ļoti daudz (++++) OC pozitīvu osteocītu (4.21. mikrofotogrāfija pielikumā). Nekomerciālā PMMA cementa implantācijas rajonos OPG pozitīvi osteocīti tika konstatēti vidējā daudzumā. Savukārt, kontroles rajonos tika konstatēts daudz BMP-2/4 un OP pozitīvu osteocītu, vidēji daudz (++) OC ekspresējošo osteocītu un maz (+) OPG ekspresējošo osteocītu.

α -TCP cementa I implantāta rajonā tika konstatēts daudz (+++) BMP-2/4 pozitīvu osteocītu (4.22. mikrofotogrāfija pielikumā), kas līdzinājās to skaitam kontroles audos. Implantāta rajonā tika konstatēti vidēji daudz (++) OC pozitīvu osteocītu, un to skaits bija arī vienāds ar kontroles audos konstatēto. OP ekspresējošo šūnu skaits bija vienādi daudz gan eksperimenta, gan kontroles audos (+++). Ļoti daudz (++++) OPG ekspresējošie osteocīti konstatēti α -TCP cementa I rajonā, bet kontroles rajonā konstatētas tikai maz OPG pozitīvas šūnas.

α -TCP cementa II rajona kaulaudos arī tika konstatēts daudz (+++) BMP-2/4 pozitīvu osteocītu, kas bija vienādi ar kontroles audos konstatēto. OC pozitīvie osteocīti tika konstatēti vidējā daudzumā (++) gan biomateriāla, gan kontroles rajonā. Lielāks OP ekspresējošo šūnu skaits (+++), līdzīgi kā α -TCP cementa I gadījumā, arī tika novērots kontroles audos, bet eksperimenta rajona kaulaudos – vidēji daudz (++)). Savukārt, OPG ekspresija šī veida implantāta rajonā vispār netika novērota, kamēr kontrolē tā tika atrasta maz osteocītos.

BMP-2/4 ekspresējošo šūnu skaita sadalījumā konstatēts, ka arī neapdedzinātu HAP granulu apvidos, tāpat kā kontroles audos, tika konstatēts daudz (+++) BMP-2/4 pozitīvu osteocītu. Kaulu pamatvielas proteīna OC ekspresējošo osteocītu skaits bija vienāds (++) gan implantāta rajonā (4.23. mikrofotogrāfija pielikumā), gan kontroles rajonā (4.24. mikrofotogrāfija pielikumā). Savukārt, OP ekspresējošo osteocītu implantāta rajonā arī bija vidēji daudz (++)), bet kontroles audos to skaits bija lielāks – tika konstatēts daudz OP

pozitīvu šūnu (+++). Biomateriāla rajonā OPG ekspresējošās šūnas netika konstatētas, bet arī kontroles audos tika konstatētas tikai maz OPG pozitīvu šūnu.

Salīdzinot eksperimenta paraugus ar kontroles audiem konstatēts, ka apdedzinātu (1150 °C temperatūrā) HAP-2 granulu apvidū BMP-2/4 ekspresējošās šūnas bija vidējā daudzumā (++), bet kontroles rajonā tās bija ar nelielu pārsvaru, kur tika konstatēts daudz (+++) BMP-2/4 pozitīvu osteocītu. OP ekspresējošās šūnas gan implantāta, gan kontroles rajonā bija vienādā daudzumā, t. i., tika konstatēts daudz (+++) OP pozitīvu šūnu. OC un OPG ekspresija bija mazāk izteikta. Tā, biomateriāla rajonā tika konstatēts tikai maz (+) OC pozitīvu osteocītu (4.25. mikrofotogrāfija pielikumā), kas arī bija mazāk kā kontroles audos, kur attiecīgi tika konstatēts vidēji daudz (++) šādu osteocītu. OPG ekspresējošo osteocītu skaits bija vienāds gan biomateriāla, gan kontroles audu rajonos, kur tika konstatēti maz (+) OPG ekspresējošu osteocītu.

Eksperimentā ar PCL pārklātu HAP tableti tika konstatēts ļoti daudz (++++) gan BMP-2/4 pozitīvu struktūru (4.26. mikrofotogrāfija pielikumā), gan arī OP- un OC pozitīvu struktūru (4.27. mikrofotogrāfija pielikumā), bet kontroles audi uzrādīja variablu šo proteīnu ekspresējošo šūnu skaitu. Tā, kontroles rajonā konstatēts daudz (+++) BMP-2/4- un OP pozitīvu šūnu, vidēji daudz (++) OC pozitīvu osteocītu. Ar PCL pārklātas HAP tabletes apvidū konstatēti ļoti daudz (++++) OPG ekspresējošu osteocītu (4.28. mikrofotogrāfija pielikumā), kas bija atšķirīgi no atrades kontroles audos, kur tika novērotas tikai maz OPG pozitīvu šūnu (4.29. mikrofotogrāfija pielikumā).

Kaulaudu paraugos no nepārklātas HAP tabletes implantācijas un kontroles rajoniem tika novērots atšķirīgs BMP-2/4, OPG, un OC pozitīvo šūnu skaits. BMP-2/4 ekspresējošo šūnu skaits bija mazāks implantāta rajonā, kur tika konstatēts vidēji daudz (++) līdz daudz (+++) pozitīvu osteocītu (4.30. mikrofotogrāfija pielikumā). OP ekspresējošās šūnas bija lielā daudzumā (+++) implantācijas zonā un to skaits bija vienāds ar kontroles audos esošo. OC ekspresējošo šūnu bija vidēji daudz (++) gan implantāta rajonā, gan kontroles audos. Šajā eksperimentā tika konstatēts tikai maz (+) OPG pozitīvu struktūru un to skaits bija vienāds gan implantāta apvidū, gan kontroles audos.

Kaulaudu paraugos ar nepārklātu HAP, ar PCL pārklātu HAP tableti, komerciālo un nekomerciālo PMMA kaulu cementu, neapdedzinātām un apdedzinātām HAP-2 granulām βDef-2 un interleikīnus – IL-1, IL-6, IL-8 un IL-10 ekspresējošo šūnu skaits bija variabls, kas bija vērojams arī kontroles audos (4.6. tabula).

βDef-2, IL-1, IL-6, IL-8 un IL-10 ekspresējošo šūnu skaita relatīvais sadalījums 3 mēnešus pēc biomateriālu implantācijas 2. eksperimentālajā grupā

Marķieri	Biomateriāla veids										Kontrole
	Paraugs Nr.1 Komerčiālais PMMA kaulu cements	Paraugs Nr.2 Nekomerciālais PMMA kaulu cements	Paraugs Nr.3 α-TCP cements I	Paraugs Nr.4 α-TCP cements II	Paraugs Nr.5 Neapdedzinātas HAP granulas	Paraugs Nr.6 Apdedzinātas HAP-2 granulas	Paraugs Nr.7 Ar PCL pārklāta HAP tablete	Paraugs Nr.8 Nepārklāta HAP tablete			
βDef-2	+++	+++	++	+	++	+++	+++	+++	++++		++
IL-1	+++	+++	++++	++	++	++	++	++	-		+
IL-6	++++	+++	++++	+	++	+++	++++	++			+++
IL-8	+++	-	+	+	+	+	+	+	-		+
IL-10	++++	+++	++++	++++	++	+	++++	++++			+/++

¹IKL – implantācijas un kontroles laiks; (-) – nav nevienas imūnhistoķīmiski pozitīvas struktūras redzeslaukā, (+) – maz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā, (++) – vidēji daudz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā, (+++) – daudz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā, (++++) – ļoti daudz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā; βDef-2 – β-defensīns-2, IL-1 – interleikīns-1, IL-6 – interleikīns-6, IL-8 – interleikīns-8, IL-10 – interleikīns-10; PMMA – polimetilmetakrilāts, α-TCP – α-trikalcija fosfāts, HAP – hidroksiapatīts, PCL – polikaprolaktons

Vislielākais β Def-2 pozitīvo šūnu skaits, t. i., ļoti daudz šūnu (++++) tika konstatēts paraugā ar nepārklātu HAP tableti (4.31. mikrofotogrāfija pielikumā), kas arī bija vairāk nekā kontroles audos, kur tika konstatēts tikai vidēji daudz (++) β Def-2 pozitīvu osteocītu (4.32. mikrofotogrāfija pielikumā). Abu PMMA kaulu cementu rajonos (4.33. mikrofotogrāfija pielikumā), apdedzinātu HAP-2 granulu un ar PCL pārklātas HAP tabletes rajonā kaulaudos tika konstatēts daudz (++++) β Def-2 ekspresējošo šūnu, kas sastādīja lielāku skaitu nekā kontroles audos (++)). Savukārt kaulaudos ar α -TCP cementu I un neapdedzinātām HAP granulām (4.34. mikrofotogrāfija pielikumā) β Def-2 pozitīvo šūnu skaits bija vienāds gan implantāta, gan kontroles rajonā, t. i., tās bija vidēji daudz (++) α -TCP cementa II apvidū tika konstatēts maz (+) antimikrobo proteīnu saturošu osteocītu un to skaits arī bija mazāks nekā kontroles audos (++)).

Kaulaudu paraugos ar 2. eksperimentā izmantotajiem biomateriāliem proinflatōrā citokīna IL-1 ekspresējošo šūnu skaits bija mainīgs. Ļoti daudz (++++) IL-1 pozitīvu osteocītu tika konstatēts paraugā ar α -TCP cementu I, daudz (++) – komerciālā cementa apvidū (4.35. mikrofotogrāfija pielikumā) un nekomerciālā PMMA cementa apvidū, kas bija salīdzinoši vairāk nekā kontroles audos, kur tika atrasts tikai maz (+) IL-1 pozitīvu osteocītu (4.36. mikrofotogrāfija pielikumā). Vidēji daudz (++) IL-1 ekspresējošo osteocītu tika konstatēts paraugos ar α -TCP cementu II, neapdedzinātām un apdedzinātām HAP-2 granulām, kā arī paraugā ar PCL pārklātu HAP tableti. Turklāt, nepārklātas HAP tabletes implantācija neizraisīja IL-1 ekspresiju.

Proinflatōrā citokīna IL-6 ekspresējošo šūnu skaits paraugos ar minētajiem biomateriāliem bija līdzīgs ar IL-1 ekspresējošo šūnu skaitu. Tā, ļoti daudz (++++) IL-6 pozitīvu osteocītu konstatēts paraugos ar komerciālo PMMA cementu (4.37. mikrofotogrāfija pielikumā), α -TCP cementu I un ar PCL pārklātu HAP tableti, bet kontroles audos to skaits arī bija salīdzinoši liels – tika konstatēts daudz IL-6 ekspresējošo šūnu (4.38. mikrofotogrāfija pielikumā). Daudz (++) IL-6 pozitīvu osteocītu tika konstatēts paraugos ar nekomerciālo PMMA cementu, apdedzinātām HAP-2 granulām, un šis skaits bija vienāds ar kontroles audos konstatēto skaitu. Savukārt vidēji daudz (++) IL-6 ekspresējošo šūnu konstatēts neapdedzinātu HAP granulu apvidū un nepārklātas HAP tabletes rajonā, un maz (+) IL-6 pozitīvu osteocītu konstatēts α -TCP cementa II rajonā.

Proinflatōrā citokīna – IL-8 ekspresējošo šūnu skaits biomateriālu implantācijas rajonos un kontroles audos bija dažāds. Vislielākā IL-8 aktivitāte tika novērota komerciālā PMMA cementa rajonā, kur tika atrasts daudz IL-8 pozitīvi osteocīti (+++), bet abu tipu α -TCP cementa apvidū un HAP granulu apvidū, kā arī PCL pārklātas tabletes rajonā tika

konstatēts tikai maz (+) IL-8 pozitīvu osteocītu, kas, savukārt, bija vienādā daudzumā ar kontroles audos konstatēto. Nekomerciālā PMMA cementa un nepārklātas HAP tabletes rajonā IL-8 ekspresija netika novērota.

Antiinflamatorā citokīna – IL-10 ekspresējošo šūnu skaits biomateriālu implantācijas rajonos un kontroles audos bija dažāds. Komerciālā PMMA cementa, α -TCP cementa I, α -TCP cementa II, ar PCL pārklātas HAP tabletes un nepārklātas HAP tabletes implantācijas rajonos tika atrasts ļoti daudz (++++) IL-10 pozitīvu osteocītu (4.39. mikrofotogrāfija pielikumā), bet kontroles audu rajonā šī marķiera ekspresija bija salīdzinoši mazāk izteikta, kur tika atrasts maz līdz vidēji daudz (++) IL-10 pozitīvu osteocītu (4.40. mikrofotogrāfija pielikumā). Nekomerciālā PMMA cementa rajonā kaulaudos tika atrasts daudz (++) IL-10 pozitīvu šūnu, bet neapdedzinātu HAP granulu implantācijas apvidū to bija vidēji daudz (++) un apdedzinātu HAP-2 granulu rajonā tikai maz (+) IL-10 pozitīvu osteocītu.

Salīdzinot biomarķierus ekspresējošo šūnu vidējo skaitu trīs nejauši izraudzītos redzeslaukos divās neatkarīgās izlasēs – eksperimenta un kontroles grupās, tika iegūti sekojoši rezultāti. Antimikrobā proteīna β Def-2, interleikīnu IL-1, IL-6, IL-8 un IL-10, kā arī BMP-2/4, OPG, OC un OP ekspresējošo šūnu vidējais skaits eksperimenta un kontroles audos bija variabls (4.7. tabula).

βDef-2, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, BMP-2/4, OPG, OC un OP ekspresējošo šūnu vidējais skaits un standartklūda 3 mēnešus pēc biomateriāla implantācijas

2. eksperimentālajā grupā

Marķieri	Biomateriāla veids										Kontrole
	Paraugs Nr.1 Komerčiālais PMMA kaulu cements (vid.sk.±SE)	Paraugs Nr.2 Nekomerciālais PMMA kaulu cements	Paraugs Nr.3 α-TCP cements I	Paraugs Nr.4 α-TCP cements II	Paraugs Nr.5 Neapdedzinātas HAP granulas	Paraugs Nr.6 Apdedzinātas HAP-2 granulas	Paraugs Nr.7 Ar PCL pārklāta HAP tablete	Paraugs Nr.8 Nepārklāta HAP tablete			
βDef-2	2,66±0,66 (vid.sk.±SE)	22,00±1,52	16,66±0,88	4,33±0,33	12,33±0,33	22,33±0,88	32,66±1,45	22,33±0,88			14,28±2,32
IL-1	21,66±1,20	23,00±1,73	31,66±1,20	13,33±1,45	13,33±2,40	13,66±1,76	12,00±1,15	0			5,44±2,73
IL-6	33,33±2,02	24,33±1,45	34,3±1,45	5,3±0,88	11,33±0,88	21,66±1,20	36,33±1,45	13,66±1,20			27,33±1,95
IL-8	24,00±1,73	0	5,66±0,88	6,00±1,15	6,33±1,45	6,33±1,20	5,00±1,15	0			4,61±2,20
IL-10	33,66±1,45	23,33±1,85	32,66±1,45	21,66±1,20	16,00±1,73	7,00±1,15	33,33±1,45	35,66±1,76			15,44±2,71
OPG	25,33±0,33	0	23,66±1,20	0	13,66±0,33	2,33±0,33	31,33±0,33	4,00±1,00			4,78±1,66
OC	26,00±2,00	37,00±2,08	1,00±0,57	16,66±0,88	16,00±1,54	2,00±0,57	34,00±0,57	14,66±1,45			15,72±2,27
OP	28,66±0,88	27,00±2,08	14,66±0,88	13,66±0,66	6,33±0,33	23,66±0,66	34,33±2,02	21,33±0,88			24,83±3,21
BMP-2/4	48,00±1,15	12,00±0,57	21,00±0,57	22,66±1,45	21,66±0,88	12,66±0,66	36,00±1,52	16,00±0,57			26,00±2,73

βDef-2 – β-defensīns-2, IL-1 – interleikīns-1, IL-6 – interleikīns-6, IL-8 – interleikīns-8, IL-10 – interleikīns-10, Vid.sk. – vidējais šūnu skaits trīs nejausi izraudzītos redzeslaukos; SE – standartklūda; PMMA – polimetilmetakrilāts, α-TCP – α-trikalcija fosfāts, HAP – hidroksiapatīts, PCL – polikaprolaktons OPG – osteoproteģerīns, OC – osteokalcīns, OP – osteopontīns, BMP-2/4 – kaula morfoģenētiskais proteīns-2/4, Vid.sk. – vidējais šūnu skaits trīs nejausi izraudzītos redzeslaukos; SE – standartklūda; PMMA – polimetilmetakrilāts, α-TCP – α-trikalcija fosfāts, HAP – hidroksiapatīts, PCL – polikaprolaktons

Vislielākais β Def-2 ekspresējošo šūnu vidējais skaits ($32,66 \pm 1,45$), IL-6 ($36,33 \pm 1,45$), OPG ($31,33 \pm 0,33$) un OP ($34,33 \pm 2,02$) ekspresējošo šūnu skaits tika konstatēts paraugos ar PCL pārklāta HAP implantācijas zonā. Savukārt, kaulaudu paraugos no α -TCP cementa I implantācijas zonas tika konstatēts vislielākais IL-1 pozitīvo osteocītu vidējais skaits ($31,66 \pm 1,20$), bet nekomerciālā PMMA rajonā – vislielākais OC ekspresējošo šūnu skaits ($37,00 \pm 2,08$). Paraugos ar komerciālo PMMA cementu tika konstatēts vislielākais IL-8 ekspresējošo šūnu skaits ($24,00 \pm 1,73$) un BMP-2/4 ekspresējošo šūnu skaits ($48,00 \pm 1,15$). Vislielākais proinflatōrā citokīna IL-10 ekspresējošo šūnu vidējais skaits ($35,66 \pm 1,76$) tika konstatēts paraugos ar nepārklātu HAP. ***IL-10 pozitīvi osteocīti sastādīja vislielāko ekspresējošo šūnu skaitu visā eksperimenta grupā ($25,42 \pm 3,62$)***, bet vismazāk bija IL-8 saturošo šūnu. Savukārt ***kontroles grupas audos vislielāko ekspresējošo šūnu skaitu sastādīja IL-6 pozitīvas šūnas ($27,33 \pm 1,95$)*** un vismazāko – arī IL-8 ekspresējošas šūnas (4.8. tabula).

4.8. tabula

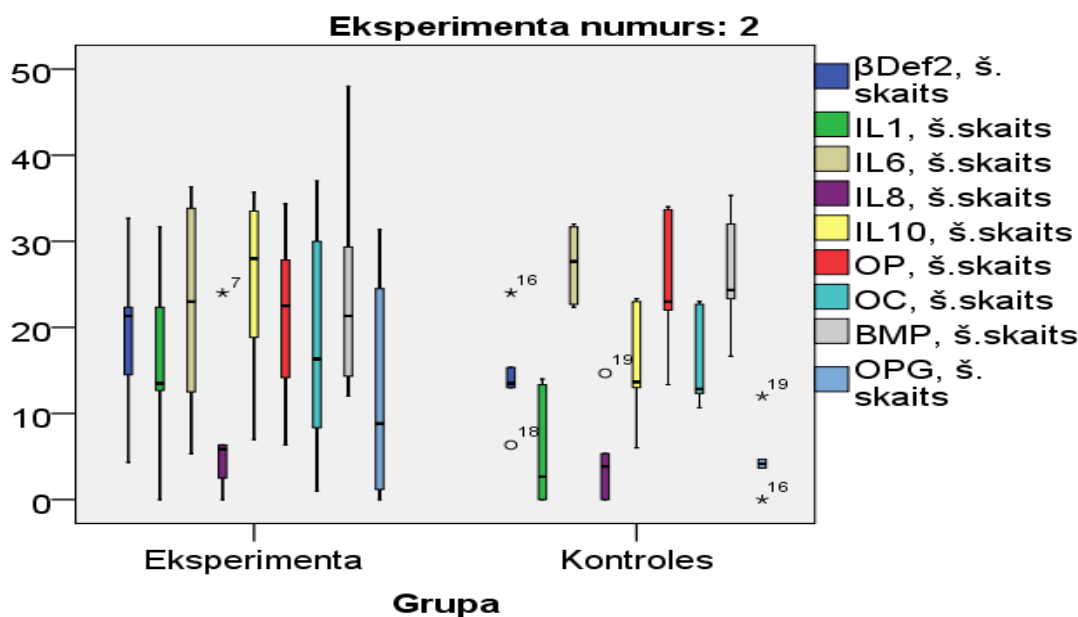
Biomarķierus ekspresējošo šūnu vidējais skaits kopumā eksperimenta un kontroles grupās 2. eksperimentālajā grupā

Grupa		β Def-2	IL-1	IL-6	IL-8	IL-10	OP	OC	BMP-2/4	OPG
E ¹	Vid.sk. ³	19,17	16,08	22,54	6,67	25,42	21,21	18,42	23,75	12,54
	\pm SE ⁴	\pm 2,94	\pm 3,32	\pm 4,12	\pm 2,65	\pm 3,62	\pm 3,24	\pm 4,71	\pm 4,38	\pm 4,50
K ²	Vid.sk. ³	14,28	5,44	27,33	4,61	15,44	24,83	15,72	26,00	4,78
	\pm SE ⁴	\pm 2,32	\pm 2,73	\pm 1,95	\pm 2,20	\pm 2,71	\pm 3,21	\pm 2,27	\pm 2,73	\pm 1,60

¹E – eksperimenta audu grupa; ²K – kontroles grupa; ³Vid.sk. – vidējais imūnpozitīvo šūnu skaits trīs redzeslaukos; ⁴SE – standartkļūda; β Def-2 – β -defensīns-2, IL-1 – interleikīns-1, IL-6 – interleikīns-6, IL-8 – interleikīns-8, IL-10 – interleikīns-10, OP – osteopontīns, OC – osteokalcīns, BMP-2/4 – kaula morfoģenētiskais proteīns-2/4, OPG – osteoproteģerīns

Balstoties uz Manna–Vitnija testu, ***2. eksperimentālajā grupā tika konstatēts statistiski ticami izteiktāks IL-1 saturošo šūnu skaits eksperimenta grupā ($Z=1,77$; $p=0,04$)***. Citus biomarķierus saturošo šūnu skaits eksperimenta un kontroles grupās statistiski ticami neatšķīrās, t. i., β Def-2 ($Z=1,03$; $p=0,34$), IL-6 ($Z=0,38$; $p=0,75$), IL-8 ($Z=1,04$; $p=0,34$), IL-10 ($Z=1,87$; $p=0,59$), OP ($Z=0,38$; $p=0,75$), OC ($Z=0,77$; $p=0,49$), BMP-2/4 ($Z=1,16$; $p=0,28$), OPG ($Z=0,58$; $p=0,57$) (4.2. attēls).

Biomarkierus ekspresējošo šūnu vidējā skaita attēlojums kastveida diagrammā eksperimenta un kontroles grupai 2. eksperimentālajā grupā



βDef-2 š. skaits – β-defensīnu-2 ekspresējošo šūnu skaits, IL-1 š. skaits – interleikīnu-1 ekspresējošo šūnu skaits, IL-6 š. skaits – interleikīnu-6 ekspresējošo šūnu skaits, IL-8 š. skaits – interleikīnu-8 ekspresējošo šūnu skaits, IL-10 š. skaits – interleikīnu-10 ekspresējošo šūnu skaits, OP š. skaits – osteopontīnu ekspresējošo šūnu skaits, OC š. skaits – osteokalcīnu ekspresējošo šūnu skaits, BMP-2/4 š. skaits – kaula morfoģenētisko proteīnu-2/4 ekspresējošo šūnu skaits, OPG š. skaits – osteoproteģerīnu ekspresējošo šūnu skaits

4.2.3. Apoptozes izmeklēšanas rezultāti un to statistiskās apstrādes dati 2. eksperimentālajā grupā

Apoptotisko šūnu skaits kaulaudos **3 mēnešus pēc** kalcija fosfāta un polimēru tipa biomateriālu **implantācijas** apvidos bija variabls (4.9. tabula). Implantācijas apvidos to vidējais skaits trīs redzeslaukos bija no $1,3 \pm 0,57$ apoptotiskām šūnām α -TCP cementa II rajonā līdz $48,3 \pm 5,50$ apoptotiskām šūnām neapdedzinātu HAP granulu rajonā. Daudz (+++) apoptotisko šūnu tika konstatēts arī α -TCP cementa I implantācijas apvidū, ar PCL pārklāta HAP implantācijas un nepārklātas HAP tabletes tipa biomateriāla implantācijas apvidū (4.41. mikrofotogrāfija pielikumā). Savukārt, kontroles rajonu kaulaudos apoptoze netika novērota.

**Apoptotisko šūnu skaits 3 mēnešus pēc dažādu biomateriālu implantācijas un kontroles audos
2. eksperimentālajā grupā**

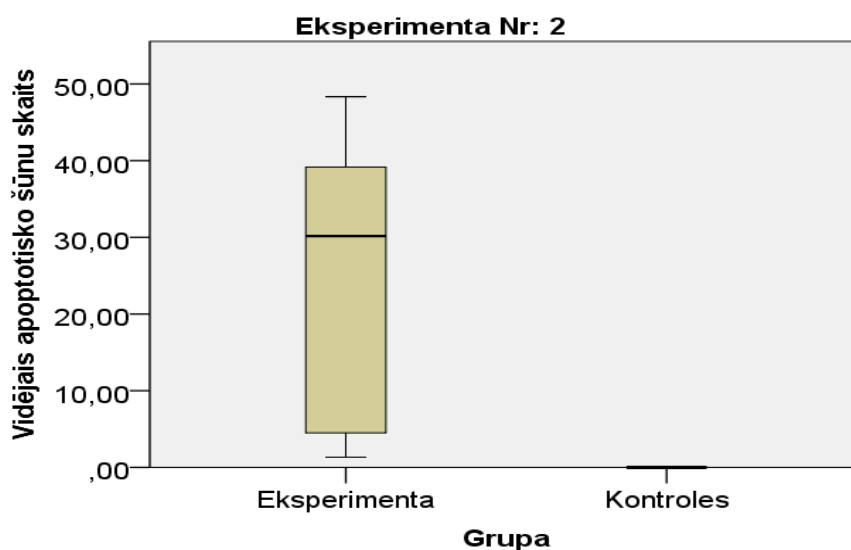
Biomateriāla veids	Relatīvais pozitīvo šūnu skaits redzeslaukā	Vidējais šūnu skaits trīs redzeslaukos ± standartkļūda
PMMA	+	5,60±2,08
Komerčiālais PMMA	++	27,30±3,05
α-TCP cements II	+	1,30±0,57
α-TCP cements I	++	42,60±19,85
Apdedzinātas HAP-2 granulas	+	3,30±1,15
Neapdedzinātas HAP granulas	+++	48,30±5,50
Nepārklāta HAP tablete	++	35,60±3,78
Ar PCL pārklāta HAP tablete	++	33,00±8,88
	apoptotisko šūnu vidējais skaits eksperimentā	24,67±6,60
Kontrole	–	–
Kontrole	–	–

PMMA – polimetilmetakrilāts, α-TCP – β-trikalcija fosfāts, HAP – hidroksiapatīts, PCL – polikaprolaktons; (–) – nav nevienas pozitīvas struktūras redzeslaukā, (+) – maz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā, (++) – vidēji daudz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā, (+++) – daudz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā

Balstoties uz Manna–Vitnija testu, secināts, ka **2. eksperimentālajā grupā apoptotisko šūnu skaits eksperimenta audu grupā bija statistiski ticami izteiktāks nekā kontroles grupā** ($Z=2,09$; $p=0,02$) (4.3. attēls).

Apoptotisko šūnu vidējā skaita attiecība eksperimenta un kontroles audu grupā

2. eksperimentālajā grupā



4.3. Morfoloģiskā pētījuma un statistiskās datu analīzes rezultāti 3. eksperimentālajā grupā

4.3.1. Morfoloģiskās rutīnās izmeklēšanas rezultāti

Kaulaudos *3 mēnešus pēc* HAP/ β -TCP-1, HAP/ β -TCP-2, β -TCP-2 (4.42. mikrofotogrāfija pielikumā), un apdedzinātu HAP-1 granulu (4.43. mikrofotogrāfija pielikumā) *implantācijas* tika konstatētas kaulaudu resorbcijas zonas un jauna kaula veidošanās. Eksperimenta paraugos ar β -TCP-2 un HAP-1 granulām (4.42., 4.43. mikrofotogrāfija pielikumā) konstatējām mīksto audu pārmaiņas ar izteiktu makrofāgu un fibroblastu daudzumu. Vienā no HAP-1 granulu implantācijas rajoniem tika konstatēta arī granulācijas audu kapsulu formēšanās ap biomateriāla granulām blakus kaulam atrodošajos mīkstajos audos (4.44. mikrofotogrāfija pielikumā). Neliela granulācijas audu veidošanās tika novērota arī kontroles audos.

4.3.2. Imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas rezultāti un to statistiskās apstrādes dati

Trešajā eksperimentā β Def-2 un interleikīnus – IL-1, IL-6, IL-8 un IL-10 ekspresējošo šūnu skaits bija maz mainīgs visos paraugos ar implantēto materiālu un kontroles audos. Maz (+) β Def-2 pozitīvu osteocītu tika konstatēts gan paraugos ar HAP-1 granulām (4.45. mikrofotogrāfija pielikumā), gan arī kontroles audos, bet citos paraugos no implantāta rajoniem tie netika konstatēti (4.10. tabula).

βDef-2, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, OC, OP, BMP-2/4 un OPG ekspresējošo šūnu skaita relatīvais sadalījums 3 mēnešus pēc dažādu biomateriālu implantācijas kaulaudos truša apakšžoklī 3. eksperimentālajā grupā

Marķieri:	Biomateriāla veids											Kontrolē	
	Paraugs Nr.1 HAP/β-TCP-2	Paraugs Nr.2 HAP/β-TCP-2	Paraugs Nr.3 β-TCP-1	Paraugs Nr.4 β-TCP-1	Paraugs Nr.5 HAP/β-TCP-1	Paraugs Nr.6 HAP/β-TCP-1	Paraugs Nr.7 β-TCP-2	Paraugs Nr.8 β-TCP-2	Paraugs Nr.9 HAP-1	Paraugs Nr.10 HAP-1	Kontrolē	Kontrolē	
IL-1	+	+	+	++	+	+	+	++	++	+++	+	+	
IL-6	+	+	++	++	+	+	-	+	+++	+	++	+	
IL-8	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
IL-10	-	+	+	+	-	+	+	+	+	++	+	++	
βDef-2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	
OP	++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	++++	+++	+++	++	
OC	++	++	++	+++	++	+++	+++	++++	+++	+++	+++	++	
BMP-2/4	-	+++	+	++	++	++	++	+++	+	++	+	-	
OPG	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	

(-) – nav nevienas imūnhistoķīmiski pozitīvas struktūras redzeslaukā, (+) – maz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā, (++) – vidēji daudz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā, (+++) – daudz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā; (+++++) – ļoti daudz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā; IL-1 – interleikīns-1, IL-6 – interleikīns-6, IL-8 – interleikīns-8; IL-10 – interleikīns-10, βDef-2 – β-defensīns-2, OP – osteopontīns, OC – osteokalcīns, BMP-2/4 – kaula morfogēnētiskais proteīns-2/4, OPG – osteoproteģerīns; HAP/β-TCP-1 – hidroksiapatīts/trikalcija fosfāts-1 (ar šķidrās fāzes pH 6,0), HAP/β-TCP-2 – hidroksiapatīts/β-trikalcija fosfāts-2 (ar šķidrās fāzes pH 7,0), β-TCP-1 – trikalcija fosfāts-1 (apdedzināts 1000 °C), β-TCP-2 – trikalcija fosfāts-2 (apdedzināts 1150 °C), HAP-1 – hidroksiapatīts (apdedzināts 1000 °C)

Paraugos ar β -TCP-1 un β -TCP-2 tika konstatēts no maz (+) līdz vidēji daudz (++) IL-1 pozitīvu osteocītu (4.46. mikrofotogrāfija pielikumā). Turklāt, kontroles audos (4.47. mikrofotogrāfija pielikumā) konstatēts tikai maz IL-1 imūnaktīvu šūnu, un to skaits bija vienādā daudzumā ar HAP/ β -TCP-2, HAP/ β -TCP-1 implantācijas rajonā konstatēto. Savukārt, HAP-1 rajonā to skaits bija no vidēji daudz līdz daudz (+++) IL-1 pozitīvo osteocītu redzeslaukā. HAP-1 granulu implantācijas rajona paraugos tika konstatēts gan maz, gan daudz proinflammatoro citokīnu IL-6 ekspresējošo šūnu (4.48. mikrofotogrāfija pielikumā). Vidējā daudzumā tās tika konstatētas β -TCP-1 apvidū. Savukārt, HAP/ β -TCP-1, HAP/ β -TCP-2 un β -TCP-2 rajonos tika konstatēts maz IL-6 pozitīvu osteocītu. Kontroles audu paraugos IL-6 ekspresija bija variabla, to skaits bija no maz līdz vidēji daudz osteocītiem redzeslaukā (4.49. mikrofotogrāfija pielikumā).

IL-8 ekspresija šajā eksperimentā bija vismazāk izteikta. Tā, maz IL-8 pozitīvu osteocītu tika konstatēts tikai vienā no implantācijas rajoniem, t. i., β -TCP-2 apvidū. IL-10 ekspresējošo osteocītu skaits bija salīdzinoši neliels, proti, no maz līdz vidēji daudz osteocītu vienā redzeslaukā. Tā, maz IL-10 pozitīvu osteocītu tika konstatēts biomateriālu – HAP/ β -TCP-1, HAP/ β -TCP-2, β -TCP-1 un β -TCP-2 apvidos, maz līdz vidēji daudz – kaulaudos ar HAP-1 (IL-10 imūnreaktīvajām šūnām, galvenokārt, koncentrējoties HAP granulu rajonā) (4.50. mikrofotogrāfija pielikumā). No maz līdz vidēji daudz IL-10 pozitīvu osteocītu tika konstatēts arī kontroles paraugos (4.51. mikrofotogrāfija pielikumā).

Kaulu pamatvielas proteīnu OP un OC ekspresija, salīdzinoši ar citokīnu un antimikrobo proteīnu ekspresiju, bija izteiktāka. Daudz (+++) līdz ļoti daudz (++++) OP (4.52. mikrofotogrāfija pielikumā) un OC ekspresējošo osteocītu (4.53. mikrofotogrāfija pielikumā) tika konstatēts HAP-1 granulu rajonā. Savukārt kontroles rajonos bija vidēji daudz (++) OP un OC pozitīvu osteocītu. Galvenokārt, ļoti daudz OP un OC pozitīvu osteocītu tika konstatēts β -TCP-2 rajonos. Kaulaudu paraugos ar β -TCP-1 to skaits bija mainīgs, t. i., no vidēji daudz līdz daudz OP un OC pozitīviem osteocītiem redzeslaukā, kas tika novērots arī paraugos ar HAP/ β -TCP-1. Kaulaudu paraugos ar HAP/ β -TCP-2 tika konstatēts vienmērīgi daudz OP un OC pozitīvu šūnu, t. i., vidēji daudz abos paraugos, kas bija vienāds ar kontroles audiem.

Kaulaudu šūnu aktivitātes rādītāja OPG ekspresējošas šūnas (osteocīti) tika konstatētas mazākā daudzumā (4.10. tabula). Tikai maz (+) OPG pozitīvu šūnu tika konstatēts paraugos ar HAP-1 granulām (4.54. mikrofotogrāfija pielikumā); β -TCP-1, β -TCP-2 un HAP/ β -TCP-2 gadījumos OPG šūnu skaits bija vienāds ar kontroles paraugos esošo OPG pozitīvo šūnu skaitu, bet HAP/ β -TCP-1 gadījumā OPG saturošas šūnas kaulaudos vispār neatradām.

Kaula morfoģenētiskā proteīna BMP-2/4 ekspresējošo šūnu skaita analīzē tika konstatēts no maz (+) līdz daudz (++++) BMP-2/4 pozitīvo šūnu. Tā, HAP/ β -TCP-1 (4.55. mikrofotogrāfija pielikumā) un HAP/ β -TCP-2 apvidū konstatētas, galvenokārt, vidēji daudz (++) šūnu, β -TCP-1 un HAP-1 granulu apvidū no maz līdz vidēji daudz BMP-2/4 ekspresējošo šūnu. β -TCP-2 apvidū to skaits bija no vidēji daudz līdz daudz šūnām redzeslaukā (4.56. mikrofotogrāfija pielikumā). Savukārt, neliels to skaits bija kontroles audos, kur tika konstatēti maz BMP-2/4 pozitīvu osteocītu (4.57. mikrofotogrāfija pielikumā).

Analizējot biomarkierus ekspresējošo šūnu vidējo skaitu trīs nejauši izraudzītos redzeslaukos (4.11. tabula) konstatēts, ka IL-1 pozitīvie osteocīti visvairāk konstatēti kaulaudu paraugos no HAP-1 implantācijas zonas ($21,33 \pm 0,88$).

βDef-2, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, BMP-2/4, OPG, OC un OP ekspresējošo šūnu vidējais skaits un standartklāda 3 mēnešus pēc biomateriālu implantācijas

3. eksperimentālajā grupā

Mar-ķīteri	Biomateriāla veids										Kontrolē	
	Paraugs Nr.1 HAP/β-TCP-2	Paraugs Nr.2 HAP/β-TCP-2	Paraugs Nr.3 β-TCP-1	Paraugs Nr.4 β-TCP-1	Paraugs Nr.5 HAP/β-TCP-1	Paraugs Nr.6 HAP/β-TCP-1	Paraugs Nr.7 β-TCP-2	Paraugs Nr.8 β-TCP-2	Paraugs Nr.9 HAP-1	Paraugs Nr.10 HAP-1	Kontrolē	Kontrolē
IL-1	3,33±0,33 (vid.sk.±SE)	2,00±0,57	3,33±0,33	11,00±0,57	3,66±0,33	3,33±0,33	2,33±0,33	11,66±0,66	12,00±0,57	21,33±0,88	3,33±0,88	2,00±0,57
IL-6	4,66±0,33	2,00±0,57	11,00±0,57	15,33±1,20	1,66±0,33	1,33±0,33	0	1,00±0,57	7,00±0,57	1,00±0,57	11,00±0,57	2,33±0,33
IL-8	0	0	0	0	0	0	2±0	0	0	0	0	0
IL-10	0	2,33±0,33	5,66±0,88	3,66±0,33	0	3,33±0,33	3,33±0,33	3,66±0,33	2,66±0,33	12,00±0,57	2,33±0,33	10,66±0,33
βDef-2	0	0	0	0	0	0	0	0	2,66±0,33	2,66±0,33	2,33±0,33	0
OP	11,00±0,57	16,00±0,57	14,33±0,88	21,33±0,33	11,33±0,33	21,33±0,33	21,33±0,88	22,00±0,57	31,66±0,88	22,66±0,88	22,33±0,33	15,00±0,57
OC	12,00±0,57	14,00±0,57	12,00±0,57	24,00±0,57	14,00±0,57	22,33±0,88	23,66±0,66	32,33±0,33	33,33±0,88	34,00±0,57	21,33±0,33	11,33±0,88
BMP-2/4	0	22,33±0,33	4,33±0,33	11,33±0,33	12,00±0,57	11,33±0,33	13,33±0,33	22,66±0,88	4,33±0,33	11,33±0,33	3,33±0,33	0
OPG	3,33±0,33	0	0	4,33±0,33	4,33±0,33	0	0	3,33±0,33	3,00±0,57	0	4,00±0,57	0

IL-1 – interleikīns-1, IL-6 – interleikīns-6, IL-8 – interleikīns-8, IL-10 – interleikīns-10; βDef-2 – β-defensīns-2, OP – osteopontīns, OC – osteokalcīns, BMP-2/4 – kaula morfogēnētiskais proteīns-2/4, OPG – osteoproteģerīns; HAP/β-TCP-1 – hidroksiapatīts/trikalcijs fosfāts-1 (ar šķīdās fāzes pH 6,0), HAP/β-TCP-2 – hidroksiapatīts/β-trikalcijs fosfāts-2 (ar šķīdās fāzes pH 7,0), β-TCP-1 – trikalcijs fosfāts-1 (apdedzināts 1000 °C), β-TCP-2 – trikalcijs fosfāts-2 (apdedzināts 1150 °C), HAP-1 – hidroksiapatīts (apdedzināts 1000 °C); vid.sk. – vidējais šūnu skaits trīs nejausi izraudzītos redzeslaukos; SE – standartklāda

Vislielākais IL-6 pozitīvo šūnu vidējais skaits konstatēts β -TCP-1 biomateriāla rajonā ($15,33 \pm 1,20$). IL-8 pozitīvas šūnas konstatētas tikai β -TCP-2 apvidū un arī šeit to skaits bija salīdzinoši neliels (2 ± 0). Proinflamatorā citokīna IL-10 pozitīvo šūnu vidējais skaits, salīdzinoši ar citiem citokīniem, bija salīdzinoši zems un tā lielākais vidējais skaits ($12,00 \pm 0,57$) bija HAP-1 implantācijas rajonā. β Def-2 tika konstatēts tikai HAP-1 rajonā un šī biomarkiera pozitīvo šūnu vidējais skaits trīs redzeslaukos bija $12,00 \pm 0,57$, kas bija tuvu kontrolē atrastajam ($2,33 \pm 0,33$). Kaulu matricē proteīnus OP un OC ekspresējošo osteocītu vislielākais vidējais skaits (OP – $31,66 \pm 0,88$; OC – $34,00 \pm 0,57$) tika konstatēts HAP-1 rajonā. Vislielākais kaulu augšanas faktora BMP-2/4 pozitīvo osteocītu vidējais skaits tika konstatēts β -TCP-2 rajonā ($22,66 \pm 0,88$), kas bija vairāk, nekā vidējais skaits kontroles audos ($1,67 \pm 1,67$). Kaula aktivitātes rādītāja OPG ekspresija bija salīdzinoši maz izteikta un lielākais OPG ekspresējošo šūnu skaits bija paraugos ar β -TCP-1 un HAP/ β -TCP-1.

Kaulaudu paraugos ar mono- un bifāziskiem hidroksiapatīta un trikalcijs fosfāta materiāliem vislielāko biomarkierus ekspresējošo šūnu vidējo skaitu sastādīja OC pozitīvas šūnas ($22,17 \pm 2,82$), bet kontroles grupā – OP pozitīvas šūnas ($18,67 \pm 3,67$) (4.12. tabula). Savukārt, vismazāko skaitu sastādīja IL-8 pozitīvi osteocīti ($0,20 \pm 0,20$) eksperimenta grupā un β Def-2 pozitīvi osteocīti kontroles grupā.

4.12. tabula

Biomarkierus ekspresējošo šūnu vidējais skaits kopumā eksperimenta un kontroles grupās

3. eksperimentālajā grupā

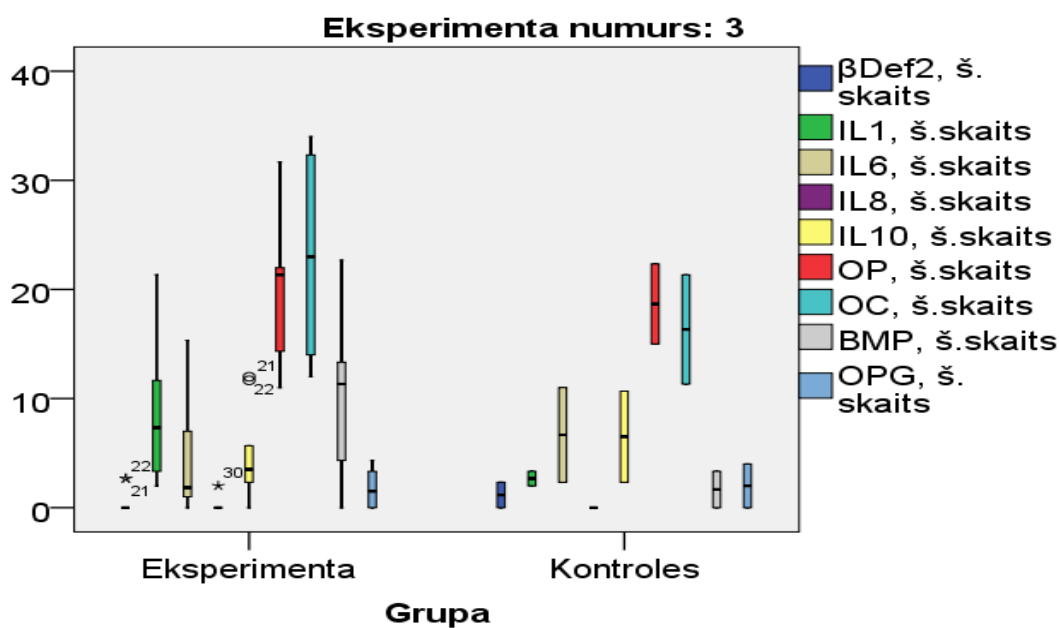
Grupa		β Def-2	IL-1	IL-6	IL-8	IL-10	OP	OC	BMP-2/4	OPG
E ¹	Vid. sk. ³	0,53	8,20	4,50	0,20	4,57	19,30	22,17	11,30	1,83
	\pm SE ⁴	\pm 0,36	\pm 1,99	\pm 1,62	\pm 0,20	\pm 1,33	\pm 1,98	\pm 2,82	\pm 2,31	\pm 0,63
K ²	Vid. sk.	1,17	2,67	6,67	0,00	6,50	18,67	16,33	1,67	2,00
	\pm SE	\pm 1,17	\pm 0,67	\pm 4,33		\pm 4,17	\pm 3,67	\pm 5,00	\pm 1,67	\pm 2,00

¹E – eksperimenta audu grupa; ²K – kontroles grupa; ³Vid.sk. – vidējais imūnpozitīvo šūnu skaits trīs redzeslaukos; ⁴SE – standartkļūda; β Def-2 – β -defensīns-2, IL-1 – interleikīns-1, IL-6 – interleikīns-6, IL-8 – interleikīns-8, IL-10 – interleikīns-10, OP – osteopontīns, OC – osteokalcīns, BMP-2/4 – kaula morfoģenētiskais proteīns-2/4, OPG – osteoproteģerīns

Balstoties uz Manna–Vitnija testu, secināts, *ka 3. eksperimentālajā grupā BMP-2/4 saturošo šūnu skaits eksperimenta grupā bija statistiski ticami lielāks nekā kontroles grupā (Z=1,84; p=0,03)*. Pielietojot šo testu citus biomarkķierus saturošo šūnu skaita analīzē eksperimenta un kontroles grupās, konstatēts, ka statistiski ticamas atšķirības eksperimenta un kontroles grupā netika konstatētas, t. i., β Def-2 ekspresējošo šūnu grupā Z=0,56, p=0,75, IL-1 ekspresējošo šūnu grupā Z=1,40, p=0,18, IL-6 ekspresējošo šūnu grupā Z=0,97, p=0,36, IL-8 ekspresējošo šūnu grupā Z=0,44, p=0,90, IL-10 ekspresējošo šūnu grupā Z=0,10, p=0,90, OP ekspresējošo šūnu grupā Z=0,21, p=0,90, OC ekspresējošo šūnu grupā Z=1,29, p=0,27 un OPG ekspresējošo šūnu grupā Z=0,11, p=0,90 (4.4. attēls).

4.4. attēls

Biomarkķierus ekspresējošo šūnu vidējā skaita attēlojums kastveida diagrammā eksperimenta un kontroles grupai 3. eksperimentālajā grupā



β Def-2 š. skaits – β -defensīnu-2 ekspresējošo šūnu skaits, IL-1 š. skaits – interleikīnu-1 ekspresējošo šūnu skaits, IL-6 š. skaits – interleikīnu-6 ekspresējošo šūnu skaits, IL-8 š. skaits – interleikīnu-8 ekspresējošo šūnu skaits, IL-10 š. skaits – interleikīnu-10 ekspresējošo šūnu skaits, OP š. skaits – osteopontīnu ekspresējošo šūnu skaits, OC š. skaits – osteokalcīnu ekspresējošo šūnu skaits, BMP-2/4 š. skaits – kaula morfoģenētisko proteīnu-2/4 ekspresējošo šūnu skaits, OPG š. skaits – osteoproteģerīnu ekspresējošo šūnu skaits

4.3.3. Programmētā šūnu nāve – apoptoze kaulaudos implantācijas un kontroles rajonos 3. eksperimentālajā grupā

Salīdzinot apoptotisko šūnu skaitu kaulaudos ar dažādiem biomateriālu veidiem, to starpā tika konstatētas atšķirības (4.13. tabula).

4.13. tabula

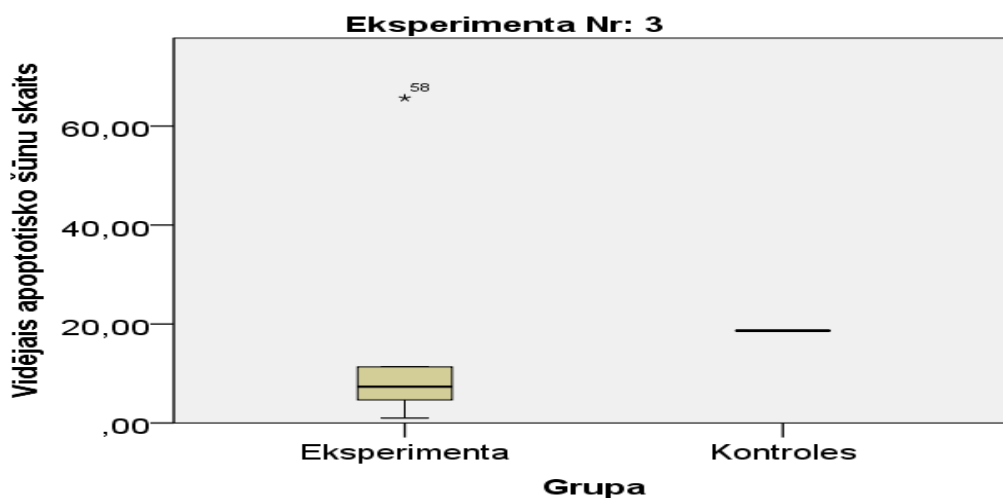
Apoptotisko šūnu skaits 3 mēnešus pēc dažādu biomateriālu implantācijas kaulaudos un kontroles audos 3. eksperimentālajā grupā

Biomateriāls	Relatīvais pozitīvo šūnu skaits redzeslaukā	Vidējais šūnu skaits trīs redzeslaukos \pm standartklūda
HAP/ β -TCP-2	+	1,00 \pm 0,57
HAP/ β -TCP-1	+	4,67 \pm 1,20
β -TCP-1	++	11,30 \pm 2,90
β -TCP-2	+	7,33 \pm 1,45
HAP-1	+++	65,00 \pm 21,18
	apoptotisko šūnu vidējais skaits eksperimentā	18,00 \pm 12,04
Kontrole	++	18,67 \pm 4,25

(+) – maz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā, (++) – vidēji daudz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā, (+++) – daudz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā; HAP/ β -TCP-2 – hidroksiapatīts/ β -trikalcijs fosfāts-2 (ar šķīdros fāzi pH 7,0), HAP/ β -TCP-1 – hidroksiapatīts/ β -trikalcijs fosfāts-1 (ar šķīdros fāzi pH 6,0), β -TCP-1 – β -trikalcijs fosfāts-1 (apdedzināts 1000 °C), β -TCP-2 – β -trikalcijs fosfāts-2 (apdedzināts 1150 °C), HAP-1 – hidroksiapatīts (apdedzināts 1000 °C)

Vislielākais apoptotisko šūnu skaits konstatēts kaulaudos ar HAP-1 materiālu un pārsvarā tieši blakus materiāla granulām un kaulaudu resorbcijas zonām (4.58. mikrofotogrāfija pielikumā), kur tika konstatēts daudz (+++) apoptotisko šūnu. Maz (+) apoptotisko šūnu konstatēts bifāziskā materiāla – HAP/ β -TCP-1 un HAP/ β -TCP-2 apvidū (4.59. mikrofotogrāfija pielikumā) un monofāziskā β -TCP-2 apvidū, bet β -TCP-1 rajonā – vidēji daudz (++) apoptotisko šūnu. Būtiskas atšķirības apoptotisko šūnu skaitā kontroles rajona kaulaudos netika konstatētas, proti, šūnu bija vidēji daudz (4.60. mikrofotogrāfija pielikumā). **Vislielākais vidējais apoptotisko šūnu skaits trīs redzeslaukos tika konstatēts HAP-1 implantācijas rajonā (65,00 \pm 21,18)**, bet to vidējais skaits visā eksperimenta grupā sastādīja 18,00 \pm 12,04 šūnas un kontroles grupā – 18,67 \pm 4,25. Balstoties uz Manna–Vitnija un Vilkoksona testiem **eksperimenta un kontroles grupas salīdzinājumā**, iegūti dati, kas liecina, ka **nepastāv statistiski ticama atšķirība apoptotisko šūnu skaitā** minētajās grupās ($z=8,78$; $p=0,66$) (4.5. attēls).

**Apoptotisko šūnu vidējā skaita attiecība eksperimenta un kontroles audu grupā 3.
eksperimentālajā grupā**



4.4. Morfoloģiskā pētījuma un statistiskās datu analīzes rezultāti 4. eksperimentālajā grupā

4.4.1. Morfoloģiskās rutīnās izmeklēšanas rezultāti

Eksperimenta dzīvniekiem, izdalot kaulaudu paraugus no implantācijas un kontroles zonām *4,5 mēnešus pēc biomateriālu implantācijas*, konstatēts, ka implantācijas vietās audi bija ar labām sadzīšanas pazīmēm, tomēr kaulaudi bija plānāki nekā blakus zonās un α -TCP-pH 8,0 rajonā vizuāli grūti bija atšķirt implantāta vietu, jo to pārklāja makroskopiski “vesels” kauls. Mikroskopiskā rutīnas izmeklēšanā biomateriālu implantācijas rajonos tika konstatēti granulācijas audi un fibrozes apvidi (4.61. mikrofotogrāfija pielikumā), un jaunā kaula veidošanās zonas (4.62. mikrofotogrāfija pielikumā). Kontroles audos arī tika konstatēti nelieli granulācijas audu rajoni.

4.4.2. Imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas rezultāti un to statistiskās apstrādes dati

Eksperimentā noteikto interleikīnu – IL-1, IL-6, IL-8 un IL-10, antimikrobā proteīna β Def-2, kā arī kaulu matricē proteīnu OP un OC, kaulu augšanas faktora BMP-2/4 un kaulu šūnu aktivitātes rādītāja OPG relatīvais daudzums *4,5 mēnešus* pēc α -TCP biomateriālu ar dažādu pH līmeni implantācijas, salīdzinot ar iepriekšējiem eksperimentiem, bija zems un atsevišķi biomarķieri vispār netika konstatēti (4.14. tabula).

βDef-2, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, OC, OP, BMP-2/4 un OPG ekspresējošo šūnu skaita relatīvais sadalījums 4,5 mēnešus pēc biomateriālu implantācijas un kontroles rajona kaulaudos 4. eksperimentālajā grupā

Marķieri	Biomateriālu veidi											Kontrole
	Paraugs Nr.1 α-TCP- pH 8,0	Paraugs Nr.2 α-TCP- pH 8,0	Paraugs Nr.3 α-TCP- pH 8,0	Paraugs Nr.4 α-TCP- pH 8,0	Paraugs Nr.5 α-TCP- pH 7,0	Paraugs Nr.6 α-TCP- pH 7,0	Paraugs Nr.7 α-TCP- pH 7,0	Paraugs Nr.8 α-TCP- pH 7,0	Paraugs Nr.9 α-TCP- pH 6,0	Paraugs Nr.10 α-TCP- pH 6,0	Paraugs Nr.11 α-TCP- pH 6,0	
IL-1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
βDef-2	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
OPG	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
OC	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BMP-2/4	+	-	+	-	-	+	-	+	-	++	-	-

(-) – nav nevienas imūnhistoķīmiski pozitīvas struktūras vienā redzeslaukā, (+) – maz pozitīvu struktūru redzeslaukā, (++) – vidēji daudz pozitīvu struktūru redzeslaukā;

IL-1 – interleikīns-1, IL-6 – interleikīns-6, IL-8 – interleikīns-8, IL-10 – interleikīns-10; βDef-2 – β-defensīns-2, OPG – osteoproteģerīns, OC – osteokalcīns, OP – osteopontīns,

BMP-2/4 – kaula morfoģenētiskais proteīns-2/4; α-TCP-pH 8,0 – trikalcija fosfāta cements ar šķidrās fāzes pH 8,0, α-TCP-pH 7,0 – trikalcija fosfāta cements ar šķidrās fāzes pH 7,0,

α-TCP-pH 6,0 – trikalcija fosfāta cements ar šķidrās fāzes pH 6,0

Proinflatōrā citokīna IL-1 aktivitāte kaulaudos **4,5 mēnešus** pēc biomateriālu implantācijas bija zema. Tā, maz (+) IL-1 pozitīvu osteocītu tika konstatēts tikai vienā no paraugiem ar α -TCP-pH 8,0 cementu un to vidējais skaits bija $1,33\pm 0,33$. Proinflatōros citokīnus IL-6 un IL-8, antiinflatōro citokīnu IL-10 ekspresējoši osteocīti implantācijas un kontroles rajonos netika konstatēti.

Nelielā skaitā, t. i., maz (+) antimikrobo proteīnu β Def-2 ekspresējošo osteocītu tika konstatēts tikai α -TCP-pH 8,0 un α -TCP-pH 6,0 rajonā, un to vidējais skaits kaulaudos ar abiem biomateriālu veidiem attiecīgi bija no $2,66\pm 0,33$ līdz $3,33\pm 0,33$ un $3,33\pm 0,33$. Kontroles audu apvidū šī proteīna izdale šūnās netika novērota.

Maz (+) OPG saturošu osteocītu tika konstatēts atsevišķos kaulaudu paraugos ar α -TCP-pH 8,0 un to vidējais skaits bija no $1,66\pm 0,33$ līdz $2,66\pm 0,33$. Maz OPG ekspresējošo osteocītu tika konstatēti atsevišķos kaulaudu paraugos arī ar α -TCP-pH 6,0 materiālu, α -TCP-pH 7,0 materiālu un arī kontroles audu paraugos, kur attiecīgi to vidējais skaits paraugos ar biomateriālu bija $1,66\pm 0,33$, $2,00\pm 0,57$, bet kontroles paraugā – $2,00\pm 0,57$.

Kaula pamatvielas proteīna OC ekspresija kaulaudos tika konstatēta tikai α -TCP-pH 8,0 implantācijas apvidū, kur tika atrasti maz OC pozitīvu osteocītu (4.63. mikrofotogrāfija pielikumā) un to vidējais skaits trīs redzeslaukos bija no $1,6\pm 0,33$ līdz $3,00\pm 0,57$. Kaula pamatvielas proteīnu OP ekspresējošas šūnas biomateriālu implantāciju un kontroles audu rajonos netika konstatētas.

BMP-2/4 pozitīvas šūnas tika novērotas visos kaulaudu paraugos ar biomateriālu, t. i., tika konstatēts maz (+) un vidēji daudz (++) BMP-2/4 pozitīvu osteocītu paraugā ar α -TCP-pH 6,0 (4.64. mikrofotogrāfija pielikumā), un to vidējais skaits trīs akli izraudzītos redzeslaukos bija no $2,66\pm 0,33$ līdz $7,2\pm 0,33$. Maz BMP-2/4 pozitīvu osteocītu (ar to vidējo skaitu trīs redzeslaukos 2 ± 0) tika konstatēts kaulaudos ar α -TCP-pH 7,0 materiālu un ar α -TCP-pH 8,0 materiālu (ar to vidējo skaitu trīs redzeslaukos no $3,33\pm 0,33$).

Kaulaudos ar trikalcija fosfāta materiālu implantātiem (4.15. tabula) ***vislielāko biomarkierus ekspresējošo šūnu skaitu sastādīja BMP-2/4 pozitīvas šūnas*** ($1,19\pm 0,44$), bet vismazāko – IL-1 pozitīvi osteocīti ($0,11\pm 0,11$). Kontroles grupā OPG ekspresējošo šūnu vidējais skaits bija 2 ± 0 , kas bija arī vienīgās imūnpozitīvās šūnas šajā grupā.

Biomarķierus ekspresējošo šūnu vidējais skaits kopumā eksperimenta un kontroles grupās

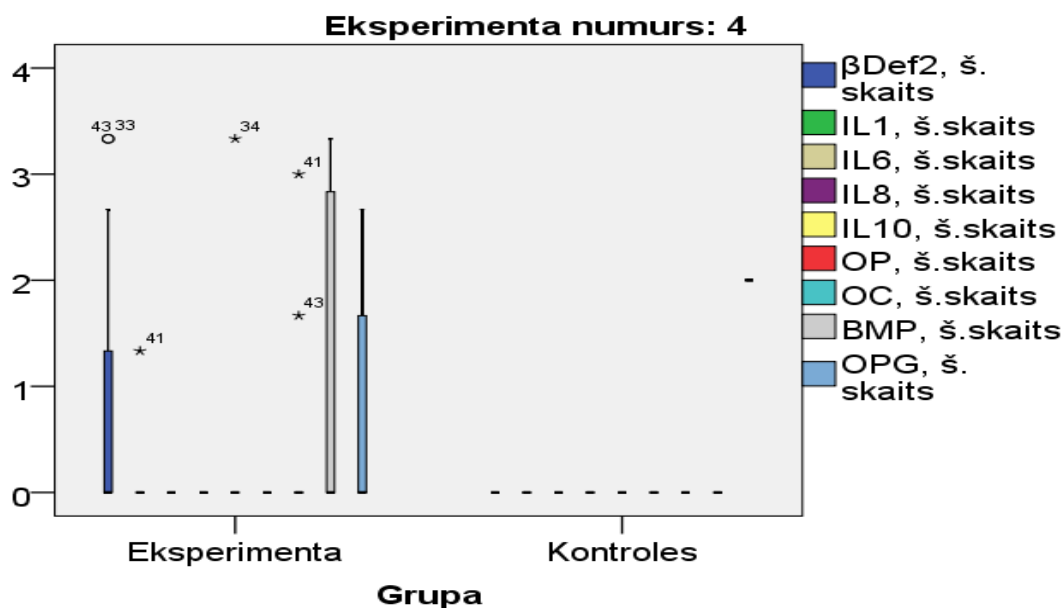
4. eksperimentālajā grupā

Grupa		β Def-2	IL-1	IL-6	IL-8	IL-10	OP	OC	BMP-2/4	OPG
E ¹	Vid.s k. ³ \pm SE ⁴	0,78 \pm 0,41	0,11 \pm 0,11	0,00	0,00	0,28 \pm 0,28	0,00	0,39 \pm 0,27	1,19 \pm 0,44	0,67 \pm 0,29
K ²	Vid.s k. \pm SE	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00 \pm 0,57

¹E – eksperimenta audu grupa; ²K – kontroles grupa; ³Vid.sk. – vidējais imūnpozitīvo šūnu skaits trīs redzeslaukos; ⁴SE – standartkļūda; β Def-2 – β -defensīns-2, IL-1 – interleikīns-1, IL-6 – interleikīns-6, IL-8 – interleikīns-8, IL-10 – interleikīns-10, OP – osteopontīns, OC – osteokalcīns, BMP-2/4 – kaula morfoģenētiskais proteīns-2/4, OPG – osteoproteģerīns

Pielietojot Manna–Vitnija un Vilkoksona testus biomarķierus ekspresējošo šūnu varbūtības analīzei eksperimenta un kontroles grupās, tika iegūtas sekojošas Z un p vērtības salīdzinot šīs divas grupas: β Def-2 ekspresējošo šūnu grupā $Z=0,54$, $p=0,76$, IL-1 ekspresējošo šūnu grupā $Z=0,28$, $p=0,92$, IL-6 ekspresējošo šūnu grupā $Z=0,00$ $p=0,93$, IL-8 ekspresējošo šūnu grupā $Z=0,00$, $p=0,90$, IL-10 ekspresējošo šūnu grupā $Z=0,28$ $p=0,92$, OP ekspresējošo šūnu grupā $Z=0,00$, $p=0,93$, OC ekspresējošo šūnu grupā $Z=0,42$, $p=0,92$, BMP2/4 ekspresējošo šūnu grupā $Z=0,76$, $p=0,61$ un OPG ekspresējošo šūnu grupā $Z=1,37$, $p=0,30$. Līdz ar to tika konstatēts, ka **4. eksperimentā biomarķierus saturošo šūnu skaits eksperimenta un kontroles grupā statistiski ticami neatšķīrās, $p>0,05$** (4.6. attēls).

Biomarkierus ekspresējošo šūnu vidējā skaita attēlojums kastveida diagrammā eksperimenta un kontroles grupai 4. eksperimentālajā grupā



βDef-2 š. skaits – β-defensīnu-2 ekspresējošo šūnu skaits, IL-1 š. skaits – interleikīnu-1 ekspresējošo šūnu skaits, IL-6 š. skaits – interleikīnu-6 ekspresējošo šūnu skaits, IL-8 š. skaits – interleikīnu-8 ekspresējošo šūnu skaits, IL-10 š. skaits – interleikīnu-10 ekspresējošo šūnu skaits, OP š. skaits – osteopontīnu ekspresējošo šūnu skaits, OC š. skaits – osteokalcīnu ekspresējošo šūnu skaits, BMP-2/4 š. skaits – kaula morfoģenētisko proteīnu-2/4 ekspresējošo šūnu skaits, OPG š. skaits – osteoproteģerīnu ekspresējošo šūnu skaits

4.4.3. Programmētā šūnu nāve – apoptoze kaulaudos implantācijas un kontroles rajonos 4. eksperimentālajā grupā

Apoptotisko šūnu skaits kaulaudu paraugos *4,5 mēnešus pēc α-TCP implantācijas* bija variabls (4.16. tabula). Salīdzinot apoptotisko šūnu skaitu paraugos ar dažāda pH līmeņa α-TCP, vislielākais to skaits, t. i., vidēji daudz (++) apoptotisko šūnu tika konstatēts paraugā ar α-TCP-pH 6,0 (4.65. mikrofotogrāfija pielikumā). Kaulaudos ar α-TCP-pH 7,0 un α-TCP-pH 8,0, tāpat kā kontroles paraugos (4.66. mikrofotogrāfija pielikumā), tika konstatēts maz (+) apoptotisko šūnu.

Apoptotisko šūnu skaits pēc α -TCP ar dažādu pH implantācijas un kontroles audos

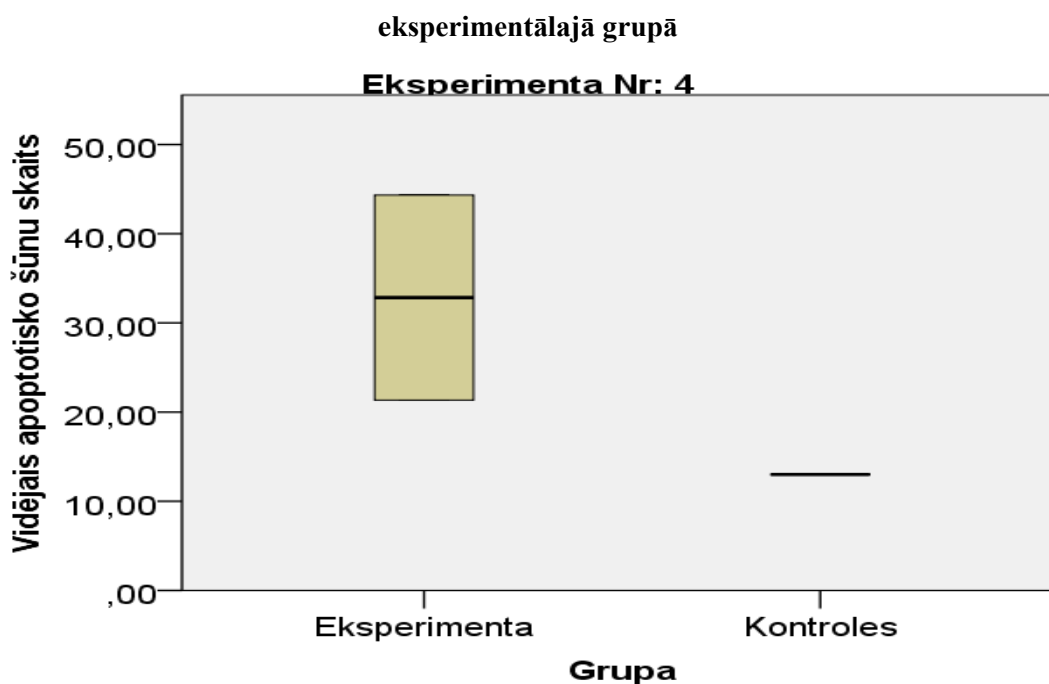
4. eksperimentālajā grupā

Biomateriāls	Relatīvais pozitīvo šūnu skaits redzeslaukā	Vidējais šūnu skaits trīs redzeslaukos \pm standartklūda
α -TCP-pH 8,0	+	21,3 \pm 2,02
α -TCP-pH 7,0	+	28,67 \pm 1,45
α -TCP-pH 6,0	++	44,33 \pm 2,33
	vidējais apoptotisko šūnu skaits eksperimenta grupā	31,44 \pm 6,78
Kontrole	+	13,00 \pm 1,15

(+) – maz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā, (++) – vidēji daudz pozitīvu struktūru vienā redzeslaukā, α -TCP-pH 8,0 – α -trikalcijs fosfāta cements ar šķidrās fāzes pH 8,0, α -TCP-pH 7,0 – α -trikalcijs fosfāta cements ar šķidrās fāzes pH 7,0, α -TCP-pH 6,0 – α -trikalcijs fosfāta cements ar šķidrās fāzes pH 6,0

Balstoties uz Manna–Vitnija un Vilkoksona testa rezultātiem *eksperimenta un kontroles grupas salīdzinājumā*, konstatēts, *ka apoptotisko šūnu skaits statistiski ticami neatšķirās, $p > 0,05$* (4.7. attēls).

Apoptotisko šūnu vidējā skaita attiecība eksperimenta un kontroles audu grupā 4.



4.5. Ar imūnhistoķīmijas metodēm analizēto faktoru saturošo šūnu un apoptotisko šūnu savstarpējās korelācijas kaulaudos implantācijas un kontroles rajonos

Izmantojot Spīrmena testu, analizējam dzīvnieku apakšžokļa un stilba kaulaudos noteikto faktoru – biomarkieru korelācijas implantācijas un kontroles audos **3, 4,5, un 8 mēnešus pēc dažādu biomateriālu implantācijas**. Ar vienu un divām zvaigznītēm* ** tabulās atzīmēta statistiski ticama korelācija. Sakarā ar nelielu paraugu skaitu, imūnhistoķīmiski noteikto faktoru savstarpējās korelācijas **6 mēnešu** pēcimplantācijas laikam, kā arī savstarpēji ar apoptozes rādītājiem **3, 4,5, 6 un 8 mēnešus** pēc implantācijas, netika noteiktas. Analizējot Spīrmena rangu korelāciju koeficientus starp faktoriem **eksperimenta kaulaudos** (4.17. tabula) pēc biomateriālu implantācijas, konstatējām sekojošas korelācijas un sakarības:

1. Pieaugot **β Def-2** ekspresijai osteocītos pēc **3 mēnešiem**, pieauga arī **IL-10** izdale ($r_s=0,703$), **OP** ($r_s=0,755$, $r_s=0,705$) un **OC** izdale ($r_s=0,701$) uzrādot statistiski ticamu ciešu korelāciju, bet vidēji ciešu korelāciju ar **IL-1** saturošo šūnu skaitu (0,698); **4,5 mēnešus** pēc implantācijas **β Def-2** saturošo šūnu skaits cieši korelēja ar **OC** saturošo šūnu skaitu ($r_s=0,711$), vidēji cieši ar **BMP-2/4** saturošo šūnu skaitu ($r_s=0,682$); β Def-2 ar pārējiem faktoriem korelācijas bija vidēji vai vāji izteiktas un bez statistiskas ticamības;

2. Pieaugot **IL-1** izdarei osteocītos **3 mēnešus** pēc implantācijas, pieauga arī **IL-10** izdare, uzrādot statistiski ticamu ciešu korelāciju ($r_s=0,810$); pieaugot **IL-1** saturošo osteocītu skaitam **4,5 mēnešus** pēc implantācijas, pieauga arī **OC** saturošo osteocītu skaits ($r_s=0,739$), uzrādot ciešas korelācijas; **IL-1** korelācijas ar pārējiem faktoriem bija vidēji vai vāji izteiktas un bez statistiskas ticamības, bet pēc **8 mēnešiem** tās netika konstatētas;
3. Palielinoties **IL-6** ekspresējošo osteocītu skaitam pēc **3 mēnešiem**, pieauga arī **OP** ekspresējošo osteocītu skaits, uzrādot statistiski ticamu ciešu korelāciju ($r_s=0,738$); ar citiem faktoriem, kā arī pēc **4,5 mēnešiem** citas statistiski ticamas korelācijas šim faktoram netika konstatētas;
4. **IL-8** izdalē korelācijas ar citiem faktoriem bija vidējas vai vāji izteiktas un bez statistiskas ticamības **3 un 8 mēnešus** pēc implantācijas, bet pēc **4,5 mēnešiem** tās netika konstatētas;
5. Pieaugot **IL-10** saturošo osteocītu skaitam **3 mēnešus** pēc implantācijas, pieauga arī **OP** ($r_s=0,780$) un **OC** ($r_s=0,683$) saturošo osteocītu skaits, uzrādot ciešu korelāciju; pēc **3 mēnešiem** vidēji ciešu korelāciju uzrādīja **IL-10** un **OC** ($r_s=0,683$); ar pārējiem faktoriem šajā pēcimplantācijas laikā, kā arī, pēc **4,5 un 8 mēnešiem**, **IL-10** uzrādīja vidēji ciešas vai vājas korelācijas bez statistiskas ticamības;
6. Pieaugot **OP** ekspresējošo osteocītu skaitam **3 mēnešus** pēc implantācijas, ciešā korelācijā pieauga arī **OC** ($r_s=0,944$) ekspresējošo osteocītu skaits. Citas statistiski ticamas korelācijas, izņemot, kas norādītas saistībā ar citokīnu un β Def-2 izdali pēc **3 un 8 mēnešiem**, netika konstatētas; pēc **4,5 mēnešiem** korelācijas nekonstatējām;
7. Bez minētās **OC** izdales korelācijas ar β Def-2 un **OP** izdali **3 mēnešus** pēc implantācijas, konstatējām arī vidēji ciešu korelāciju **OC un IL-10** ($r_s=0,683$) izdalē, kā arī, bet ne statistiski ticamu korelāciju, **OC un IL-1** ($r_s=0,621$) saturošo šūnu skaita pieaugumā; savukārt bez minētās **OC** izdales korelācijas ar β Def-2 un **IL-1** izdali pēc **4,5 mēnešiem**, konstatējām arī vidēji ciešu statistiski ticamu korelāciju ar **BMP-2/4** saturošo šūnu skaita pieaugumu ($r_s=0,604$); ar pārējiem faktoriem tika konstatētas vājas korelācijas, bet pēc **8 mēnešiem** tās netika konstatētas;
8. Bez minētās **BMP-2/4** izdales ciešās korelācijas ar **IL-6, IL-8 un IL-10** izdali **8 mēnešus** pēc implantācijas, konstatējām arī vidēji ciešu, bet ne statistiski ticamu korelāciju **BMP-2/4** un **IL-8** izdalē ($r_s=0,494$), **IL-10** ($r_s=0,333$), un **OPG** izdalē ($r_s=0,659$) **3 mēnešus** pēc implantācijas; vidēji ciešu statistiski ticamu korelāciju konstatējām **BMP-2/4** un β Def-2 izdalē ($r_s=0,682$), **OC** ($r_s=0,604$), **IL-1** ($r_s=0,342$) un **IL-10** ($r_s=0,488$) izdalē **4,5 mēnešus** pēc implantācijas; ar citiem faktoriem tika konstatētas vājas korelācijas;

9. Statiski ticamas korelācijas *OPG* izdalē saistībā ar citiem faktoriem netika iegūtas, bet tika konstatēta vidēja korelācija *OPG* un *βDef-2* saturošo šūnu skaita pieaugumā ($r_s=0,301$) **3 mēnešus** pēc implantācijas, *OPG* un *IL-1* ($r_s=0,500$), *OPG* un *IL-8* ($r_s=0,500$) saturošo šūnu skaita pieaugumā pēc **8 mēnešiem**, bet abos minētajos pēcimplantācijas laikos – **3 un 8 mēnešos** *OPG* un *IL-6* ($r_s=0,500$), *IL-10* ($r_s=0,500$), *OP* ($r_s=0,500$) un *BMP-2/4* ($r_s=0,500$) saturošo šūnu skaita pieaugumā; pēc **4,5 mēnešiem** *OPG* izdale vidēji cieši korelēja ar *IL-1* izdali ($r_s=0,313$).

Analizēto faktoru savstarpējo korelāciju koeficienti (r_s) eksperimenta audos dažādos pēcimplantācijas periodos pēc dažādu biomateriālu implantācijas

Pēcimpl. mēneši	Faktors	β Def-2	IL-1	IL-6	IL-8	IL-10	OP	OC	BMP-2/4	OPG
3	β Def-2	-	-0,325	0,539	-0,400	0,347	0,755*	0,156	-0,204	0,301
3		-	0,698*	-0,044	-0,167	0,703*	0,705*	0,701*	-0,309	-0,187
4,5		-	0,402	.	.	.	-0,172	.	0,711**	0,682*
8	IL-1
3		-0,325	-	0,347	0,212	-0,228	0,036	-0,084	-0,228	-0,0090
3		0,698*	-	0,091	0,291	0,810**	0,603	0,621	-0,302	0,167
4,5		0,402	-	.	.	-0,091	.	0,739**	0,342	0,313
8		.	-	-0,500	-0,500	-0,500	1,000**	-0,500	-0,500	0,500
3	IL-6	0,539	0,347	-	-0,145	0,429	0,738*	0,167	0,190	0,695
3		-0,044	0,091	-	-0,349	0,113	-0,222	-0,312	-0,599	0,264
4,5	
8		.	-0,500	-	1,000**	1,000**	1,000**	-0,500	1,000**	0,500
3		-0,400	0,212	-0,145	-	-0,374	-0,145	-0,205	0,494	0,236
3	IL-8	-0,167	0,291	-0,349	-	0,117	0,294	0,292	0,530	0,249
4,5	
8		.	-0,500	-	1,000**	1,000**	1,000**	-0,500	1,000**	0,500
3		-0,400	0,212	-0,145	-	-0,374	-0,145	-0,205	0,494	0,236
3		-0,167	0,291	-0,349	-	0,117	0,294	0,292	0,530	0,249
4,5	IL-10
8		.	-0,500	1,000**	-	1,000**	1,000**	-0,500	1,000**	0,500
3		0,347	-0,228	0,429	-0,374	-	0,452	0,190	0,333	0,491
3		0,703*	0,810**	0,113	0,117	-	0,780**	0,683*	-0,112	-0,296
4,5		-0,172	-0,091	.	.	-	.	-0,134	0,488	-0,208
8	.	-0,500	1,000**	1,000**	1,000**	-	-0,500	1,000**	0,500	

Pēcimpl.mēneši – pēcimplantācijas laiks mēnešos; *, ** – statistiski ticama korelācija; vērtība no 0,1–0,3 – vāja korelācija, no 0,3–0,7 – vidēja korelācija, **0,7–0,9 – cieša korelācija**

4.17. tabulas nobeigums

Pēcimpl. mēneši	Faktors	β_{Def-2}	IL-1	IL-6	IL-8	IL-10	OP	OC	BMP-2/4	OPG
3	OP	0,755 *	0,036	0,738 *	-0,145	0,452	-	0,548	0,167	0,407
3		0,705 *	0,603	-0,222	0,294	0,780 **	-	0,944 **	0,274	-0,198
4,5	
8	OC	.	1,000**	-0,500	-0,500	-0,500	-	-0,500	-0,500	0,500
3		0,156	-0,084	0,167	-0,205	0,190	0,548	-	0,238	-0,012
3		0,701 *	0,621	-0,312	0,292	0,683*	0,944 **	-	0,276	0,007
4,5	0,711 **	0,739 **	.	.	.	-0,134	.	-	0,604*	0,109
8	BMP-2/4	.	-0,500	-0,500	-0,500	-0,500	-0,500	-	-0,500	-1,000**
3		-0,204	-0,228	0,190	0,494	0,333	0,167	0,238	-	0,659
3		-0,309	-0,302	-0,599	0,530	-0,112	-0,112	0,274	0,276	-
4,5	0,682*	0,342	.	.	.	0,488	.	0,604*	-	-0,047
8	OPG	.	-0,500	1,000**	1,000**	1,000**	-0,500	-0,500	-	0,500
3		0,301	-0,090	0,695	0,236	0,491	0,407	-0,012	0,659	-
3		-0,187	0,167	0,264	0,249	-0,296	-0,296	-0,198	0,007	-0,205
4,5	0,236	0,313	.	.	.	-0,208	.	0,109	-0,047	-
8	.	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	-1,000**	0,500	-

Pēcimpl.mēneši – pēcimplantācijas laiks mēnešos; *, ** – statistiski ticama korelācija; vērtība no 0,1–0,3 – vāja korelācija, no 0,3–0,7 – vidēja korelācija, **0,7–0,9** – cieša korelācija

Analizējot Spīrmena rangu korelāciju koeficientus starp imūnhistoķīmiskajiem rādītājiem **kontroles kaulaudos** (4.18. tabula) konstatējām sekojošas korelācijas un sakarības:

1. Pieaugot **IL-1** izdarei osteocītos, konstatējām statistiski ticamu ciešu korelāciju ($r_s=0,880$) ar **OP** izdali **3 mēnešus** pēc implantācijas;
 2. Palielinoties **IL-6** izdarei osteocītos, pieauga arī **OPG** izdare, uzrādot statistiski ticamu ciešu korelāciju ($r_s=0,897$) **3 mēnešus** pēc implantācijas;
 3. Pieaugot **IL-8** saturošo osteocītu skaitam, palielinājās arī **β Def-2** saturošo osteocītu skaits, uzrādot statistiski ticamu ciešu korelāciju ($r_s=0,897$) **3 mēnešus** pēc implantācijas;
- Pārējiem faktoriem noteiktās savstarpējās korelācijas bija vidēji ciešas vai vāji izteiktas un tās nebija statistiski ticamas.

Analizēto faktoru savstarpējo korelāciju koeficienti (r_s) kontrolēs audos dažādos pēcimplantācijas periodos pēc dažādu biomateriālu implantācijas

Pēcimpl.mēneši	Faktors	βDef-2	IL-1	IL-6	IL-8	IL-10	OP	OC	BMP-2/4	OPG
3	βDef-2	-	0,092	-0,377	0,897*	-0,221	-0,058	-0,058	0,348	-0,058
3		-	1,000	1,000	.	-1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
4,5	
8	IL-1	-	-0,500	0,500	0,866	-0,866	-0,500	1,000**	-0,500	-0,500
3		0,092	-	0,213	0,400	-0,031	0,880*	-0,516	-0,334	0,516
3		1,000**	-	1,000	.	-1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
4,5
8	IL-6	-0,500	-	-1,000**	0,000	0,000	1,000**	-0,500	-0,500	-0,500
3		-0,377	0,213	-	-0,290	0,058	0,371	0,600	0,029	0,886*
3		1,000**	1,000**	-	.	-1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
4,5
8	IL-8	0,500	-1,000**	-	0,000	0,000	-1,000**	0,500	0,500	0,500
3		0,897*	0,400	-0,290	-	0,029	0,348	-0,145	-0,058	0,116
3	
4,5
8	IL-10	0,866	0,000	0,000	-	-1,000**	0,000	0,866	-0,866	-0,866
3		-0,221	-0,031	0,058	0,029	-	0,203	0,203	-0,783	-0,058
3		-1,000**	-1,000**	-1,000**	.	-	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000
4,5
8	-0,866	0,000	0,000	-1,000**	0,000	-	0,000	-0,866	0,866	0,866

Pēcimpl. mēneši – pēcimplantācijas laiks mēnešos; *, ** – statistiski ticama korelācija; vērtība no 0,1–0,3 – vāja korelācija, no 0,3–0,7 – vidēja korelācija, **0,7–0,9 – cieša korelācija**

4.18. tabulas nobeigums

Pēcimp.mēneši	Faktors	βDef-2	IL-1	IL-6	IL-8	IL-10	OP	OC	BMP-2/4	OPG
3	OP	-0,058	0,880 *	0,371	0,348	0,203	-	-0,200	-0,600	0,657
3		1,000**	1,000**	1,000**	.	-1,000**	-	1,000	1,000	1,000
4,5	
8	OC	-0,500	1,000**	-1,000**	0,000	0,000	-	-0,500	-0,500	-0,500
3		-0,058	-0,516	0,600	-0,145	0,203	-0,200	-	0,143	0,429
3		1,000**	1,000**	1,000**	.	-1,000**	1,000**	1,000**	1,000	1,000
4,5	
8	BMP-2/4	1,000**	-0,500	0,500	0,866	-0,866	-0,500	-	-0,500	-0,500
3		0,348	-0,334	0,029	-0,058	-0,783	-0,600	0,143	-	-0,029
3		1,000**	1,000**	1,000**	.	-1,000**	1,000**	1,000**	-	1,000
4,5	
8	OPG	-0,500	-0,500	0,500	-0,866	0,866	-0,500	-0,500	-	1,000**
3		-0,058	0,516	0,886 *	0,116	-0,058	0,657	0,429	-0,029	-
3		1,000**	1,000**	1,000**	.	-1,000**	1,000**	1,000**	1,000	-
4,5	
8		-0,500	-0,500	0,500	-0,866	0,866	-0,500	-0,500	1,000**	-

Pēcimp. periods – pēcimplantācijas laiks mēnešos; * ** – statistiski ticama korelācija; vērtība no 0,1–0,3 – vāja korelācija, no 0,3–0,7 – vidēja korelācija, **0,7–0,9 – cieša korelācija**

5. DISKUSIJA

5.1. Rutīnās izmeklēšanas morfoloģiskā atrade dažādos laika periodos pēc biomateriālu implantācijas

Biomateriālu implantācija ķirurģiskā izpratnē ir lokāla medicīniska manipulācija, bet organisma reakcija uz to ir uzskatāma par kompleksu reakciju. Jebkuras substances implantācija bioloģiskos audos, kā aprakstījuši arī *Konig et al.* (1999) un *Leite et al.* (2008), noris ar audu mehānisku bojājumu, kam seko atbildes reakcija – audu dzīšanas un reģenerācijas process, kura ilgumu ietekmē individuālās imūnās aizsardzības sistēmas mehānismi un kas var variēt arī atkarībā no skarto audu lokalizācijas. Savukārt imūnsistēmas reakcija un tas, cik intensīva ir lokālā audu reakcija uz svešķermeni, t. sk. brūču sadzīšanas process, atkarībā no laika, cik pagājis pēc implantācijas, un no biomateriāla īpašībām veido biosaderību jeb biomateriāla atbilstību audiem (*Yamaguchi et al.*, 1997; *Anderson*, 2001).

Mūsu pētījumā mīkstajos audos **3 mēnešus** pēc biomateriālu implantācijas tika konstatētas tādas nespecifiskas audu reakcijas izpausmes kā audu tūska un atsevišķu limfocītu infiltrācija, ko var saistīt ar iekaisuma procesu. Izteiktas minētās morfoloģiskās izmaiņas bija vērojamas gan tīra hidroksiapatīta (HAP), gan ar polikaprolaktonu (PCL) pārklātas HAP tabletes, gan polimetilmetakrilāta (PMMA) kaulu cementa rajonos. Savukārt mīkstajos audos pēc **4,5 mēnešiem** aktīva iekaisuma process bija mazinājies, bet tika konstatētas tā sekas granulācijas audu un fibrozes veidā. Visizteiktākie granulācijas audi un fibroze implantācijas apvidū bija pēc implantācijas ar α -TCP (ar pH 6,0, pH 7,0 un pH 8,0), liecinot, ka arī ap šiem implantātiem, iespējams, bijis katarāls iekaisums. Turklāt **6 un 8 mēnešus** pēc apdedzināta HAP-2 implantācijas bija vērojama pat atsevišķu muskuļu šķiedru distrofija ar atsevišķu limfocītu infiltrācijas rajoniem, kas savukārt liecina par deģeneratīvām audu pārmaiņām.

Minētās morfoloģiskās izmaiņas, bet mazāk izteiktas, tika konstatētas arī kontroles rajona mīkstajos audos, taču tikai dažos redzeslaukos. Mūsu pētījumā morfoloģiskā atrade implantācijas periodos liecina par audu nespecifisku atbildes reakciju uz biomateriālu implantāciju, kas atsevišķos (piemēram, apdedzināta HAP-2) gadījumos pāriet pat deģeneratīvās izmaiņās.

Mūsu atrade sakrīt ar citu autoru datiem par to, ka brūču dzīšana un svešķermeņu radītas audu reakcijas tiek uzskatītas par vispārējām audu reakcijām uz bojājumu. *Shaposhnikov* (1997) un *Robbins et al.* (2005) atzīmējuši, ka, sākot jau no 2–3 nedēļām, tiek novērotas tādas mīksto audu sadzīšanas pazīmes kā rētošanās un granulācijas audu

veidošanās, kas var noritēt ar jaunu asinsvadu veidošanos un stromas fibrozēšanos. Šeit interesanti atzīmēt arī citu autoru novērojumus. Piemēram, *Miyatake et al.* (1989) novēroja, ka pacientiem pēc HAP implantācijas brūces sadzija un iekaisums izzuda viena mēneša laikā pēc operācijas. *Jones et al.* (2001) 8 nedēļas pēc nepārklāta polietilēna un ar PMMA daļiņām pārklāta polietilēna implantācijas suņu apakšstilbā novēroja fibrozās kapsulas veidošanos ap implantātiem, kas palielinājās, pieaugot pēcimplantācijas laikam, t. i., pēc 12 un 24 nedēļām. Viņš konstatēja arī citokīnu IL-1 un IL-6 ekspresiju audos, kas bija saistāma ar imūnsistēmas atbildes reakciju uz osteolīzi. *Bagambisa et al.* (1994) un *Anderson* (2008) konstatējuši, ka iekaisuma veidošanās implantāta rajonos ir saistāma ar to, ka tajos attīstās akūts vai hronisks iekaisums, kas lielākoties ir atkarīgs no implantāta fizikāli ķīmiskajām īpašībām. Savukārt *Mosser and Edwards* (2008), *Brown et al.* (2012) šai sakarā norāda arī uz proinflatōro citokīnu aktivitātes, audu sadzīšanas un fibrozes norises intensitātes saikni ar konkrēto audu lokālo stāvokli un implantāta ķīmiskajiem signāliem, kas, jādōmā, bija arī noteicošais mūsu pētījumā. Viņi arī atzīmē, ka, jo biosaderīgāks ir implantāts, jo organisma atbildes reakcijas ir mazāk izteiktas.

Kopumā morfolōģiskā atrade mūsu pētījumā ir saistāma ar individuālu mīksto audu atbildes reakciju uz traumu un daļēji arī selektīvu mīksto audu reakciju uz kādu noteiktu biomateriālu (apdedzinātu HAP-2). Atbildes reakcijas izpausmes intensitāte ir atkarīga arī no izvēlēta biomateriāla atbilstības un/vai audu bojājumu dziļuma implantācijas procedūras laikā.

Mūsu pētījumā kaulaudu reģeneratīvās izmaiņas, t. i., jauna kaula veidošanās, tika novērota jau **3 mēnešus** pēc implantācijas. Kaulaudos 3 mēnešus tieši pēc nepārklātas HAP tabletes, ar PCL pārklātas HAP tabletes, PMMA cementa un neapdedzinātu HAP granulu implantācijas tika konstatētas plašas jaunā kaula veidošanās zonas. Pārējo biomateriālu rajonā šinī pēcimplantācijas periodā jaunveidota kaula zonas nebija izteiktas, bet pēc **4,5 mēnešiem** tādās atradām arī α -TCP ar pH 6,0, pH 7,0 un pH 8,0 implantācijas gadījumā. Bet **6 un 8 mēnešus** pēc implantācijas apdedzināta HAP rajonā jauna kaula veidošanās pazīmes nekonstatējām.

Atrade mūsu pētījumā liecina par kaulaudu reģenerācijas prevalējošu norisi **3 mēnešu** pēc implantācijas, kas saskan ar citu autoru sniegtiem datiem par kaulaudu pēcimplantācijas reģenerāciju. Tomēr dažādu biomateriālu implantācijas gadījumos kaulaudu reģenerācijas sākums tiek novērots dažādos laika intervālos, un dažkārt ir atrodami arī pretrunīgi dati par osteoģenēzes sākumu konkrētu biomateriālu apvidū. Piemēram, *Harada et al.* (1989), truša žokļa kaulā implantējot HAP/TCP, jau vienu nedēļu pēc implantācijas novēroja jauna kaula veidošanās pazīmes uz implantāta virsmas, bet pēc 48 nedēļām – jauna kaula iesaģšanu starp

HAP porām. *Shaposhnikov (1997), Robbins et al. (2005), Chen et al. (2015)* ir novērojuši, ka dažāda rakstura balstaudu bojājuma gadījumos kaulaudu rumbēšanās un jaunā kaula veidošanās notiek, sākot no 2–3 nedēļām. Interesanti atzīmēt arī *Chazono et al. (2008)* pētījumu, kurā viņš 2 un 4 nedēļas pēc β -TCP implantācijas Jaunzēlandes trušu augšstilba kaulā konstatēja limfocītu, monocītu un gigantisko šūnu uzkrāšanos uz jaunveidotā kaula virsmas blakus biomateriālam, bet pēc 4 nedēļām – jauna kaula veidošanos ar β -TCP mikroporām tajā. Savukārt *Tsai et al. (2010)* un *Lee et al. (2011)* aprakstījuši, ka jaunā kaula veidošanās pēc HAP implantācijas konstatēta gan 3 mēnešus, gan 6–12 mēnešus pēc biomateriāla implantācijas. *Baslé et al. (1993)* un *Roldán et al. (2010)*, izmantojot kalcija fosfāta implantātus, konstatēja kaula veidošanās pazīmes ne tikai 3 mēnešus pēc implantācijas (kā mūsu gadījumā pēc HAP, ar PCL pārklātas HAP tabletes, PMMA cementa un neapdedzinātu HAP granulu implantācijas), bet arī daudz agrīnākā periodā, t. i., vienu nedēļu pēc implantācijas. Interesants ir *Moghadam et al. (2004)* novērojums par jauna kaula veidošanos, ko autori atzīmē gan 6, gan 12 nedēļas pēc kalcija fosfāta cementa materiālu implantācijas Jaunzēlandes trušu galvaskausā, bet vairāk izteikta, taču bez būtiskas atšķirības implantāta un kontroles rajonā, tā tika novērota 12 nedēļu jeb 3 mēnešu implantācijas periodā. Pētījumā ar bifāzisku kalcija fosfātu *Froum et al. (2008)* 6–8 mēnešus pēc biomateriāla implantācijas pacientu trepāna biopsijas materiāla histomorfometriskā izmeklēšanā novēroja jauna kaula veidošanos, tādējādi izceļot šī biomateriāla osteokondukcijas īpašības. Mūsu pētījumā arī bifāziska kalcija fosfāta materiālu – HAP/ β -TCP-1 un HAP/ β -TCP-2 – apvidū novērojām kaula veidošanos, bet maz izteiktu pēc **3 mēnešiem**. *Tsai et al. (2010)* 6–12 mēnešu periodā pēc HAP implantācijas pacientiem ar šķembainiem kaulu lūzumiem, labdabīgiem kaulu audzējiem ar dobumu veidošanos novēroja, ka 81,8% gadījumu radiogrāfiski tika konstatēta kaulaudu masas veidošanās un mikroskopiski – jauna kaula veidošanās uz implantētā HAP materiāla.

Kopumā vērtējot, kaulaudu jaunveidošanās noris galvenokārt **3 un 4,5 mēnešu** laikā pēc biomateriālu implantācijas, norādot uz kaulaudu reģenerācijas sākšanos prevalējoši **3 mēnešos** pēc implantācijas.

5.2. Imūnhistokīmiskās atrades dati dažādos pēcimplantācijas periodos pēc dažādu biomateriālu implantācijas

5.2.1. Kaula morfoģenētiskais proteīns-2/4 (BMP-2/4)

Mūsu eksperimenta dzīvniekiem pētījuma četros eksperimentos pēc dažādu biomateriālu implantācijas BMP-2/4 ekspresējošās šūnas bija vienas no visvairāk konstatētajām šūnām, salīdzinot ar citus biomarkierus ekspresējošo šūnu skaitu. Tomēr BMP-2/4 ekspresējošo osteocītu skaits dzīvnieku kaulaudos bija variabls, ar vislielāko pārsvaru **3 mēnešus** pēc implantācijas ar PCL pārklātas HAP tabletes rajonā, tad β -TCP un neapdedzinātu HAP granulu rajonā. BMP-2/4 saturošo osteocītu skaits eksperimenta un kontroles grupā **3 mēnešos** arī statistiski ticami atšķīrās, ko nenovērojām citos implantācijas periodos. Vislielākais BMP-2/4 ekspresējošo šūnu skaits, kas tika novērots salīdzinoši agrīni pēc implantācijas, t. i., **3 mēnešus** pēc tās, līdzinās arī citu autoru novērojumiem par BMP aktivitāti un liecina par BMP stimulējošo lomu kaulaudu dzīšanas procesā. *Aebli et al.* (2005), *Saito et al.* (2005) pētījumos par BMP stimulējošo ietekmi uz kaulaudu reģenerāciju un *Fu et al.* (2008) pētījumā par kaulaudu segmentālu defektu sadzīšanu novērojuši, ka HAP daļiņas regulē BMP-2 atbrīvošanos un HAP augstā koncentrācijā pat veicina to. Arī *Yu et al.* (2010) norādījuši, ka viena no BMP būtiskākajām lomām ir dalība osteoblastu diferenciācijas un kaula veidošanas procesā, un tas ir būtisks tieši lūzumu sadzīšanas agrīnās stadijās, kad BMP aktivizē kaula priekšteču šūnas periostā un endostā. Minētie *Yu et al.* (2010) novērojumi atbilst arī mūsu atradei **3 mēnešus** pēc implantācijas, kas vidēji atbilst agrīnai lūzuma sadzīšanas fāzei.

4,5 mēnešus pēc implantācijas BMP-2/4 pozitīvo osteocītu skaits jau bija mazākā daudzumā, tomēr visos paraugos ar dažādu pH α -TCP. Jāatzīmē, ka **4,5 mēnešus** pēc implantācijas novērojām vidēji ciešu statistiski ticamu korelāciju starp BMP-2/4 un β Def-2, OC, IL-1 un IL-10 izdali, kaut arī šajā laikā šo faktoru izdale bija salīdzinoši maz izteikta un tas raksturo funkciju izsīkumu. Mūsu pētījumā **6 mēnešus** pēc apdedzināta HAP-2 implantācijas augšanas faktoru ekspresējošie osteocīti ar nelielu pārsvaru, t. i., vidēji daudz, tika novēroti biomateriāla implantācijas apvidū, bet pēc **8 mēnešiem** tie pārsvarā bija kontroles audu rajonā. Statistiski ticamas atšķirības šī faktora saturošo šūnu skaitā, kā arī statistiski ticamas korelācijas ar citiem faktoriem **6 un 8 mēnešos** nenovērojām. Salīdzinoši mazāks BMP-2/4 pozitīvo osteocītu skaits **4,5, 6 un 8 mēnešus** pēc implantācijas, mūsuprāt, norāda uz traumas jau izzūdošo ietekmi uz audiem.

Mūsu pētījumā novērotais variablais BMP saturošo osteocītu skaits, iespējams, liecina par BMP selektivitāti atkarībā no biomateriāliem. *De Jong et al.* (2002) aprakstījuši, ka, neskatoties uz pētījumu datiem par augšanas faktoru, t. sk. BMP receptoriem, un BMP kā vadošo osteoblastu diferenciācijas faktoru, tomēr ir maz zināms, kā tiek kontrolēta šī faktora bioloģiskā atbilde un tās selektivitāte. Par BMP selektivitāti kalcija fosfātu un polimēru tipa implantātiem atrodami tikai nedaudzi pētījumi, kuros aprakstītas BMP aktivitātes izpausmes pēc HAP un HAP/TCP implantācijas periodā tikai līdz diviem mēnešiem. Tā, *Murata et al.* (2007) divas nedēļas pēc funkcionāli gradēta HAP subkutānas implantācijas žurkām novēroja materiāla virsmas un apmēra intensīvu degradāciju un gigantisko šūnu infiltrāciju biomateriāla rajonā, bet 4 nedēļas pēc implantācijas konstatēja albumīna saturoša šķidrums uzkrāšanos biomateriālā, ko autori izskaidro ar BMP-2/4 intensīvu ietekmi uz jauna kaula veidošanās procesu. Interesanti, ka agrīna pēcimplantācijas perioda pētījumā augsta BMP-2/4 aktivitāte ir novērota jau divas nedēļas pēc HAP implantācijas truša apakšžoklī (*Salma et al.*, 2009). *Ruhé et al.* (2009) divas un četras nedēļas pēc piesātinātas ar BMP kalcija fosfāta keramikas implantācijas truša galvaskausā, salīdzinot ar kontroles rajoniem, novēroja kaula struktūru intensīvāku veidošanos un norādīja uz BMP būtisko lomu kaulaudu reģenerācijas procesā. Arī *Yang et al.* (2012) 4 un 8 nedēļas pēc piesātināta ar rekombinanto cilvēka BMP bifāziskā HAP/TCP materiāla implantācijas žurku augšstilba kaulos novēroja audu reģeneratīvās izmaiņas – jauna kaula veidošanos, tomēr salīdzinoši izteiktāku eksperimenta audos pēc 8 nedēļām. Savukārt *Liporace et al.* (2015), implantējot analogu materiālu žurkām, novēroja palielinātu kaula blīvumu gan pēc 4, gan 8 nedēļām. Gan *Yang et al.* (2012), gan arī *Liporace et al.* (2015) secinājuši, ka HAP/TCP var tikt izmantots kā efektīva šī osteoinduktīvā proteīna pievades un kaulaudus reģenerējoša sistēma.

Kopumā minētā BMP-2/4 marķiera morfoloģiskā atrade mūsu pētījumā skaidrojama ar intensīvu audu reģenerēšanos, kas visaktīvāk noris **3 mēnešu** laikā, samazinās pēc **4,5 mēnešiem**, bet turpinās vēl **6 un 8 mēnešus** pēc biomateriāla implantācijas, un kura, iespējams, selektīvi ir labāka, izmantojot ar PCL pārklātu HAP, β -TCP un neapdedzinātu HAP.

5.2.2. Osteoproteģerīns (OPG)

OPG saturošas šūnas skaita ziņā bija otras visbiežāk novērotās šūnas visu eksperimentu kaulaudos, kaut arī to skaits bija variabls. Tā **3 mēnešus** pēc implantācijas OPG ekspresējošus osteocītus ar lielāku pārsvaru konstatējām α -TCP cementa I un ar PCL pārklātas HAP tabletes rajonā, bet to skaits bija mazāks apdedzinātu HAP-1 un HAP-2

granulu, nepārklātas HAP tabletes, HAP/ β -TCP-2, β -TCP rajonā. **4,5 mēnešus** pēc implantācijas OPG saturošo osteocītu skaits bija salīdzinoši neliels gan eksperimenta audos ar dažādu pH α -TCP, gan kontroles audos. Savukārt pēc **6 mēnešiem** OPG ekspresija biomateriāla rajonā bija pilnībā izzūdis, bet pēc **8 mēnešiem** implantātu rajonā tika konstatēta OPG ekspresijas atjaunošanās. Statistiski ticamas atšķirības OPG izdalē eksperimenta un kontroles audos nekonstatējām, bet novērojām statistiski ticamu OPG un IL-6 saturošo struktūru korelāciju kontroles audos **3 mēnešus** pēc implantācijas.

Minētā atrade mūsu pētījumā liecina, ka osteocītiem pēc **3, 4,5 mēnešiem, 6 un 8 mēnešiem** pēc kalcija fosfāta tipa un polimērus saturošu biomateriālu implantācijas ir dažāda funkcionālā aktivitāte implantācijas un arī kontroles audos. Tādējādi pieņemam, ka dažādiem implantācijas materiāliem piemīt selektīva īpašība rosināt šūnu aktivitāti un kaulu resorbciju neatkarīgi no pēcimplantācijas laika. Pie šādiem materiāliem pieder monofāziski un bifāziski HAP un TCP materiāli.

OPG kā kaulu šūnu aktivitātes marķieris ir aprakstīts un novērtēts arī citu autoru darbos. *Nakagawa et al.* (1998) pētījumā ir pierādīts, ka OPG ir receptors, kas var piesaistīties RANKL, inhibēt RANKL un preosteoklastos un osteoklastos esošā receptora RANK savstarpējo mijiedarbību. *Lacey et al.* (1998) apgalvo, ka šis receptors galvenokārt nosaka osteoklastu formēšanos un aktivitāti. Arī *Crotti et al.* (2004) atzīmējuši, ka RANKL, tā receptors RANK un to inhibitors OPG tiek uzskatīti par osteoklastu formēšanās vadošajiem regulatoriem gan veselos, gan patoloģiski izmainītos kaulaudos. Literatūrā gandrīz nav atrodami pētījumi par OPG ekspresiju konkrētos implantācijas periodos, ir tikai nedaudz datu par OPG ekspresijas novērojumiem pēc kalcija fosfāta un polimēra tipa biomateriālu implantācijas, tostarp to zaudējumu gadījumos (kas gan netika novērots mūsu pētījumā). Piemēram, *Jiranek et al.* (1993), *Goodman et al.* (1998), *Haynes et al.* (2001) gadījumos ar zaudētiem implantātiem un osteolītiskās zonās periimplanta audos (audos ap implantu) novērojuši paaugstinātu OPG un RANKL ekspresiju un aktivitāti. Turklāt *Jiranek et al.* (1993) un *Goodman et al.* (1998) norādījuši, ka arī TNF alfa un IL-1 beta regulē OPG un RANKL ekspresiju un aktivitāti. *Arikan et al.* (2008), nosakot OPG ekspresiju periimplanta audos pacientiem ar saknes tipa dentāliem implantātiem, izpētījuši, ka OPG varētu būt marķieris audu fizioloģiski morfoloģiskā veseluma novērtēšanai ap implantātiem. Citu autoru pētījumos par kaulaudu aktivitātes asociētā proteīna OPG ekspresiju, izmantojot dažāda veida biomateriālus, t. sk. kalcija fosfāta un sintētiskos, ir norādīti atšķirīgi dati, un OPG ekspresija ir novērota gan implantātu, gan kontroles audu rajonos. Piemēram, *Crotti et al.* (2004) pētījumā par cilvēkiem ar locītavas implantātiem tika novērots, ka OPG ekspresija maz

atšķiras periimplanta zonas audos pacientiem ar osteolīzi, sinoviālajos audos pacientiem ar osteoartrītiski izmainītām locītavām un veselos, vizuāli neizmainītos, audos. *Endres et al.* (2006), izmantojot titāna implantātus ar dažādu virsmas porozitāti, novērojuši, ka visi implantāti veicina kaulu asociēto proteīnu – OPG, OC un sārmainās fosfatāzes – ekspresiju, bet būtiski izteikta tā bija audos ap implantātiem, kuri bija pārklāti ar HAP. Jāatzīmē, ka arī mūsu pētījumā tika konstatēta augsta OPG ekspresija HAP materiāla implantācijas apvidos.

Iespējams, ka mūsu pētījumā novērotais šūnu aktivitātes papildu paaugstinātājs bija iekaisums, par ko liecina salīdzinoši augsta, bet statistiski ticami savā starpā nekorelējoša gan citokīnu, gan OPG ekspresija kaulaudos ar identisku biomateriālu, kaut nevar izslēgt arī individuālu atbildes reakciju uz implantēto materiālu. OPG ekspresijas saistību ar iekaisumu aprakstījuši arī citi autori. Tā, *Wang et al.* (2015) pacientiem ar periimplantītu novēroja paaugstinātu, bet ne statistiski ticamu gan citokīna IL-1, gan OPG ekspresiju, kas savukārt netika konstatēts kontroles grupas pacientiem. Viņš uzskata, ka marķieru paaugstinātā ekspresija ir tieši saistāma ar iekaisuma procesu. Arī *Crotti et al.* (2004; 2015) ir aprakstījis OPG ekspresijas saistību ar iekaisumu, ko skaidro ar proinflatōro citokīnu regulējošo ietekmi uz osteoklastu aktivitāti, kas noris paaugstinātas OPG līdzīgā NFkappaB ligandu receptoru aktivatora (RANKL) ekspresijas dēļ. Uz RANK-RANKL-OPG sistēmas aktivāciju kaulu-locītavu sistēmas iekaisīgu saslimšanu un periimplantītu ir norādījuši arī *Yun et al.* (1998), *Theodore et al.* (2001), *Holding et al.* (2006), *Jiang et al.* (2015). Domājams, ka biomateriālu implantācijas gadījumos iespējama arī individuāla atbildes reakcija šī faktora izdalē, kas bija novērojama atsevišķiem mūsu eksperimenta dzīvniekiem.

5.2.3. Osteopontīns (OP)

Mūsu eksperimenta dzīvniekiem pēc dažādu biomateriālu implantācijas tika novērots variabls, galvenokārt palielināts, kaulu matrices proteīna OP ekspresējošo šūnu skaits visos eksperimenta paraugos ar kalcija fosfāta (β -TCP un HAP) un polimēra tipa implantātiem un kontroles paraugos **3 mēnešus** pēc implantācijas. Tad pat šādas šūnas bija atrodamas ar PCL pārklātas HAP tabletes implantācijas rajonā. Iepriekš minētais norāda uz iespējamu traumas un materiāla selektivitātes ietekmes kombināciju, kad trauma samazina kaulu šūnu mineralizācijas spēju, kas saglabājas tikai HAP (dabīgo audu analoga) tuvumā un selektīvi kalcija fosfāta (β -TCP) un polimēru implantātiem.

Interesanti, ka mūsu eksperimenta dzīvniekiem **3 mēnešus** pēc implantācijas kaulaudos ap implantātu ar lielu OP saturošo šūnu skaitu tika atrasts arī liels, ar to statistiski

ticami cieši korelējošs, IL-6 šūnu skaits, norādot uz citu citokīnu slēptu aktivāciju (*Feurino et al.*, 2007). To apstiprina arī *Zhang et al.* (2014), norādot, ka IL-6 ir iekaisuma I fāzes citokīns.

Mūsu dzīvniekiem **4,5 mēnešus** pēc α -TCP implantācijas OP saturošas kaulu šūnas netika konstatētas. Savukārt **6 mēnešus** pēc implantācijas OP faktoru uzrādīja vidēji daudz kontroles audu šūnu, bet pēc **8 mēnešiem** OP saturēja arī eksperimenta kaulaudi. Kaut gan **3, 6 un 8 mēnešus** pēc implantācijas OP saturošo šūnu vidējais skaits eksperimenta un kontroles grupās neatšķīrās, minētie dati, mūsaprāt, atklāj interesantu tendenci OP izdalē, proti, **4,5 mēneši** pēc implantācijas ir iespējama laiks, kad šūnas ir visneaktīvākās (to pamato arī OPG vismazākā atrade un dažādu, tostarp citokīnu un antimikrobās aizsardzības proteīnu trūkums šūnās tieši šinī periodā), savukārt pēc **6 mēnešiem** praktiski zūd traumas ietekme uz balstaudiem, bet **8 mēneši** pēc implantācijas ir laiks, kad balstaudi atjauno savu funkcionālo aktivitāti un antimikrobo aizsardzību. Šeit arī interesanti atzīmēt, ka datu analīzē **3 mēnešus** pēc implantācijas eksperimenta grupā konstatējām ciešu statistiski ticamu korelāciju starp **OP un OC, β Def-2, IL-6 un IL-10** izdali, bet kontroles audos starp **OP un IL-1, IL-8 un β Def-2** izdali. Un tikai pēc **8 mēnešiem** novērojām ciešu statistiski ticamu korelāciju starp **OP un β Def-2** izdali. Visas šīs pārmaiņas korelē ar biomateriāla tiešu ietekmi uz audiem, kas vislabākā ir HAP un tā analogiem.

Būtisks un diskutabls joprojām ir jautājums par OP funkcijām kaulaudos, jo te faktoram tiek piedēvēta nozīme gan kaulaudu remodelēšanā, gan imūnās sistēmas atbildes reakcijās. *Nanci* (1999) un *Launey et al.* (2010) kaulaudos OP atraduši ārpusšūnu matricē starp mineralizētām kolagēna šķiedrām. *Fantner et al.* (2005) atklājis interesantu faktu, ka OP kā nekolagenozs faktors kaulaudos darbojas arī kā adhezīvs materiāls. Savukārt *Sodek et al.* (2000) norāda uz OP nozīmi un ekspresijas atšķirībām kaulaudu attīstības, reģenerācijas, resorbcijas un kalcifikācijas procesos, minot, ka OP ir būtiska nozīme osteoklastu formēšanās norisē, migrācijā un šūnu resorbīvajā aktivitātē. *Scatena et al.* (2007) uzskata, ka OP tomēr spēj arī inhibēt mineralizāciju, pasargājot organismu no ektopiskas kaulaudu veidošanās. *Sodek et al.* (2000) atzīmē arī OP proinflamatorās īpašības, kuru dēļ tas ir iesaistīts imūnās sistēmas atbildes reakcijās. Izrādās, ka OP stimulē imūno šūnu spēju izdalīt IL-1, IL-6 un TNF, bet inhibē apoptozi. Tomēr *Choi et al.* (2008) ankilizējošā spondilīta pacientiem atraduši augstāku OP līmeni asins serumā un norāda, ka OP prevalējošā loma ir kaula remodelēšanas procesā, kā sekundāru atstājot faktora nozīmi iekaisuma uzturēšanā. Dubultfunkcijas – proti, OP kā fosforilāciju veicinoša faktora iesaisti biomineralizācijā kaulaudu remodelēšanā un imūnās sistēmas atbildes reakcijas uzturēšanā – norāda arī *Li et al.* (2015). Nenoliedzot abas funkcijas, kas acīmredzot eksistē arī mūsu pētījumā, gribam uzsvērt,

ka piekrītam arī *Hunter* (2013) un *Holm et al.* (2014) viedoklim, ka joprojām ir neskaidra OP kā mineralizēto struktūru ārpusšūnu matricēs komponenta inhibējošā vai stimulējošā ietekme uz minerāla – hidroksiapatīta – veidošanos. Nav minēta selektīva dažādu biomateriālu ietekme uz OP izdali, jo nav veikti tik plaši pētījumi, taču iespējams aplūkot mūsu rezultātus kontekstā ar solitāriem pētījumiem. Mūsu dati sakrīt ar atsevišķu pētījumu (*Lee et al.*, 2011) par kalcija fosfāta tipa biomateriālu stimulējošu ietekmi uz OP ekspresiju šūnās. *Lee et al.*, 2011) apraksta arī interesantu novērojumu, ka ar HAP pārklāti titāna implantāti izraisa gan OP, gan OC paaugstināšanos implantācijas rajonos jau **3 mēnešus** pēc implantācijas. Atklāts, ka būtisks biomateriālu sastāva komponents ir tieši HAP, turklāt nav nozīmes, cik liels ir HAP īpatsvars biomateriālā (*Ruckh et al.*, 2012), jo jau 3 nedēļas pēc dažādas koncentrācijas (1% un 10%) HAP un PCL kompozītu implantācijas kaulaudos atrodami ievērojami OP perēkļi. Tādējādi mūsu atrade par OP saturošām šūnām tiešā HAP tuvumā ir būtiska un apstiprina *Zheng et al.* (2014) apgalvoto, ka HAP un OP ir augsts savstarpējās mijiedarbības potenciāls.

Tādējādi pieņemam, ka visos mūsu eksperimentos, kur analizējam OP, iezīmējas šādas būtiskas lietas: 1) iniciālā trauma kā OP ekspresiju samazinošs faktors; 2) HAP saturošs materiāls, kā arī kalcija fosfāta un polimēru implantāti kā selektīvi OP ekspresiju veicinoši faktori un 3) būtiskie **3 un 8 mēneši** pēc implantācijas, no kuriem pirmais laiks saistāms vēl ar audu atbildes reakciju uz implantācijas traumu, bet otrs norāda uz pilnīgu kaulaudu faktoru ekspresijas atjaunošanos.

5.2.4. Osteokalcīns (OC)

Mūsu eksperimenta dzīvniekiem pēc dažādu biomateriālu implantācijas tika novērots variabls arī kaulu matricēs proteīna OC saturošo šūnu skaits, galvenokārt **3 mēnešus** pēc HAP-1 granulu, ar PCL pārklātas HAP tabletes, β -TCP-2 un nekomerciālā PMMA cementa implantācijas. Implantācijas laikam pieaugot no 4,5 līdz 8 mēnešiem, OC saturošas šūnas tika konstatētas mazākā daudzumā. Datu analīzē statistiski ticamas OC saturošo šūnu vidējā skaita atšķirības nenovērojām, bet to skaita pieaugums pēc **3 mēnešiem** statistiski ticami cieši korelēja ar OP un β Def-2 ekspresējošo šūnu skaitu, bet **4,5 mēnešus** pēc implantācijas OC ekspresējošo šūnu skaits statistiski ticami cieši korelēja ar IL-1 un β Def-2 ekspresējošo šūnu skaitu.

Minētā atrade liecina par aktīvāku kaulaudu mineralizāciju **3 mēnešus** pēc implantācijas, kas saistāma ar, iespējams, selektīvu biomateriālu ietekmi uz kaulaudu mineralizāciju. Tāda tika konstatēta kaulu matricēs proteīna OP ekspresijas analīzē, kurā novērojām izteiktu OP ekspresiju **3 mēnešus** pēc kalcija fosfāta un polimēra implantācijas.

Minētais gan neizslēdz arī iespējamu traumas un materiāla selektivitātes ietekmes kombināciju, kad trauma samazina kaulu šūnu mineralizācijas spēju, kas saglabājas tikai HAP apvidū un selektīvi kalcija fosfāta un polimēru implantātu rajonos.

Līdz ar kaula matricē proteīnu atradi mūsu pētījumā būtiski ir atzīmēt arī citu autoru darbos minētās OC funkcijas un lomu. Piemēram, *Lee* (2000) un *Lombardi et al.* (2015) aprakstījuši, ka OC atrodams osteoblastos, odontoblastos, cementoblastos un hondrocītos. *Davis* (2006), *Lee* (2007), *Lombardi et al.* (2015) norādījuši uz OC intensīvu iesaistīšanos kaula vielmaiņas procesā un osteogēnēzē. Mūsaprāt, šeit svarīgi atzīmēt arī *Robey et al.* (1993), *Young* (2003), *Hamada et al.* (2008) novērojumu, ka kaula matricē proteīniem – OP un OC – ir galvenā loma kolagēna I integrācijas procesā ar HAP kristāliem kaula matricē. Salīdzinoši izteiktā OP un OC ekspresija mūsu eksperimenta kaulaudu paraugos un tieši atrade HAP un kalcija fosfāta implantātu rajonos mūsu pētījumā norāda uz šo materiālu selektīvo ietekmi uz OP un OC ekspresiju, ko pamato *Robey et al.* (1993), *Young* (2003), *Hamada et al.* (2008) novērojumi. Interesanti, ka mūsu pētījumā paaugstinātā temperatūrā (1150 °C) apdedzinātu HAP-2 granulu gadījumā OC saturošo osteocītu skaits samazinājās (līdztekus apoptozei), kamēr zemākā temperatūrā (1000 °C) apdedzinātu HAP-1 granulu implantācijas apvidū atradām gan daudz OC saturošus osteocītus, gan arī apoptotiskus osteocītus. Par cik literatūrā nav skaidrojuma šādai atradei, ar zināmu piesardzību pieņemam, ka temperatūra, kādā tiek veidoti biomateriāli, arī varētu būt svarīga biomateriāla izraisītajām audu reakcijām.

Literatūrā nav minēta selektīva dažādu biomateriālu ietekme arī uz OC izdali, jo nav veikti plaši pētījumi kalcija fosfāta un polimēru tipa biomateriālu implantācijā attiecībā uz kaulu matricē proteīnu ekspresiju. Taču, neskatoties uz to, iespējams aplūkot mūsu rezultātus kontekstā ar atsevišķiem citu autoru pētījumiem, kas tomēr netieši pamato un atspoguļo HAP implantāta stimulējošo ietekmi arī uz OC ekspresiju. Tā *Endres et al.* (2006), izmantojot titāna implantātus ar dažādu virsmas porozitāti, novēroja, ka visi implantāti veicināja kaulu asociēto proteīnu – OPG, OC un sārmainās fosfatāzes – ekspresiju, bet vairāk izteikta tā bija audos ap implantātiem, kuri bija pārklāti ar HAP. *Santarelli et al.* (2014) dabīgā, no liellopa iegūtā HAP un sintezēta nanokristālu hidroksiapatīta biosaderības pētījumā *in vitro*, izmantojot MG-63 šūnu līniju (cilvēka osteosarkomas šūnu līnija), konstatēja variablu osteogēno marķieru OC un OP ekspresiju eksperimenta un kontroles audos.

Mūsu pētījumā tika novērota polimēru tipa implantāta PMMA stimulējoša ietekme uz OC ekspresiju, kas aprakstīta arī citu autoru darbos. Tā *Zambonin et al.* (1998) cilvēka osteoblastu kultūrā *in vitro* pētījumā novēroja paaugstinātu OC un IL-6 ekspresiju PMMA

pulverveida daļiņu implantācijas apvidos un vienlaikus atzīmēja nomāktu osteoblastu proliferāciju un kolagēna sintēzi. Viņš arī norādījis, ka PMMA daļiņas, ietekmējot osteoblastu aktivitāti, kopā ar citiem faktoriem var izraisīt periprostētisku osteolīzi (osteolīzi audos ap locītavu implantātiem) sekojošos veidos: 1) samazināta osteoblastu proliferācija un kolagēna sintēze palēlina kaula formēšanos; 2) ar osteoblastu nomākumu saistītā osteoklastiska kaula resorbcijas aktivācija noris saistībā ar pastiprinātu OC un IL-6 sintēzi. *Zambonin et al.* (1998) arī secinājis, ka OC spēj veicināt osteoklastu uzkrāšanos uz kaula virsmas un IL-6 – izraisīt osteoklastoģenēzi. IL-6 saistība ar osteoklastoģenēzi vairāku autoru darbos tiek skaidrota ar tā regulējošo ietekmi uz osteoklastu aktivitāti paaugstinātas OPG līdzīgā NFkappaB ligandu receptoru aktivatora (RANKL) ekspresijas dēļ (*Holt et al.*, 2007; *Polzer et al.*, 2010; *Crotti et al.* 2015). IL-6 pastiprināta izdala implantāciju gadījumos tiek saistīta ar pašu implantātu aktivēto makrofāgu IL-1 un TNF- α izdali (*Schmidt et al.*, 2003). *Ohsawa et al.* (2001) pēc PMMA daļiņu implantācijas žurkas stilba kaulā arī novēroja PMMA stimulējošo ietekmi uz OC ekspresiju, kas noritēja vienlaikus ar osteonektīna ekspresiju. Savukārt mūsu pētījumā salīdzinoši liels OC ekspresējošo šūnu skaits tika novērots **3 mēnešus** pēc implantācijas arī monofāziska β -TCP un bifāziska HAP/ β -TCP rajonā, kaut gan IL-6 ekspresēto šūnu skaits bija salīdzinoši neliels, kas, iespējams, norāda uz to, ka IL-6 tomēr nepiedalās osteoklastoģenēzē. Ņemot vērā, ka liels gan OC ekspresējošo šūnu skaits, gan arī IL-6 ekspresējošo šūnu skaits tika novērots **3 mēnešus** arī pēc komerciālā un nekomerciālā PMMA cementa un ar PCL pārklātas HAP tabletes implantācijas, minētā atrade mūsu pētījumā norāda, ka osteoklastoģenēze noris selektīvi.

Mūsu eksperimentos, kur analizējām OP un OC, iezīmējas šiem marķieriem kopīgas, būtiskas pazīmes: iniciālā trauma ietekmē gan OP, gan OC ekspresiju; HAP saturošs materiāls, kā arī kalcija fosfāta un polimēru implantāti ir selektīvi OP un OC ekspresiju veicinoši faktori; OP un OC izteiktākā ekspresija **3 mēnešus** pēc implantācijas saistāma vēl ar audu atbildes reakciju uz implantācijas traumu, bet vēlākais laiks – **8 mēneši** pēc implantācijas – norāda vienlaikus gan uz OP, gan OC ekspresijas atjaunošanos.

5.2.5. Proinflammatorie (iekaisumu veicinošie) citokīni interleikīns-1 (IL-1), interleikīns-6 (IL-6) un interleikīns-8 (IL-8)

Mūsu pētījumā proinflammatoro citokīnu IL-1, IL-6 un IL-8 ekspresija tika novērota visos pēcimplantācijas mēnešos gan eksperimenta, gan kontroles audos, izņemot **4,5 mēnešus** pēc implantācijas. Savukārt statistiski ticamu šūnu skaita atšķirību konstatējām tikai IL-1 **3 mēnešus** pēc implantācijas, kad arī vairāk IL-1 pozitīvo osteocītu tika novērots pēc α -TCP

cementa I, bet IL-6 – pēc komerciālā PMMA cementa (arī IL-8 saturošas šūnas), α -TCP cementa I un ar PCL pārklātas HAP tabletes implantācijas. Turklāt šo faktoru savstarpējā korelāciju analizē statistiski ticamas korelācijas nevienā no pēcimplantācijas periodiem ne eksperimenta, ne kontroles audos neiegūvām.

Nemot vērā minēto atradi, uzskatām, ka izteiktākais (objektīvi – IL-1, subjektīvi – arī IL-6 un IL-8) šūnu skaits pirmajos **3 mēnešos** norāda uz slēptu iekaisumu kā atbildes reakciju gan uz audu traumatizāciju, gan arī, iespējams, uz biomateriālu, kas norimst vēlākā laika periodā.

Ar audu traumatizāciju saistāmais iekaisums skatīts arī citu autoru darbos, bet kopumā zināms, ka iekaisuma apvidū infiltrējošo makrofāgu izdalītajiem citokīniem, īpaši IL-1, piemīt izšķiroša loma lokāla iekaisuma un audu bojājuma patoģenēzē, kas skaidrojama ar IL-1 stimulējošo ietekmi uz adhēzijas molekulu ekspresiju no endotelioģītiem (*Dinarello*, 1988, 1994; *Tracey*, 1989). Savukārt citokīns IL-6 stimulē citu citokīnu izdali (*Feurino et al.*, 2007), un, kā apraksta *Zhang et al.* (2014), darbojas kā iekaisumu stimulējošs citokīns, ir iekaisuma sākumfāzes vadošais citokīns traumas izraisītā iekaisumā, kas, mūsaprāt, būtu attiecināmi arī uz biomateriālu implantāciju. IL-6 sekretē T limfocīti un aktivēti makrofāgi asinsvadu sienā, tādējādi stimulējot imūnsistēmas atbildes reakciju uz traumu, apdegumiem un citiem audu bojājumiem, kas noris ar iekaisuma reakciju (*Ostriker*, 2014). Citokīns IL-8 kā hemokīnproteīns (*Oppenheim et al.*, 1989; *Baggiolini et al.*, 1992) ar iekaisumu veicinošu iedarbību un raksturīgo hemotakses ietekmes funkciju ir viens no galvenajiem citokīniem, kas iekaisuma gadījumā aktivizē neitrofilos leukocītus (*Bickel*, 1993; *Rosenthal et al.*, 1994; *Gilmour et al.*, 2003) un nodrošina organisma atbildes reakciju uz bojājumu. Vienlaikus *Qazi et al.* (2011) ir aprakstījis IL-1 un IL-8 savstarpējās ietekmes saistību un norādījis, ka IL-8 sintēze ir cieši saistīta ar IL-1 un TNF- α stimulējošo ietekmi.

Vēl kaulaudu morfoloģisko izmaiņu izpētē svarīgi ir novērtēt proinflaturo citokīnu IL-1 un IL-6 ekspresiju, jo literatūrā atrodamas liecības par IL-1 un IL-6 piemītošām osteoklastoģenēzi veicinošām īpašībām ar sekojošu kaulaudu resorbciju (*Holt et al.*, 2007; *Polzer et al.*, 2010) un implantāta fiksācijas zaudējumu (*Holt*, 2007). Zināms arī, ka pašu implantātu aktivēti makrofāgi atbrīvo IL-1 un TNF- α , kas savukārt stimulē osteoblastus un var veicināt IL-6 un prostaglandīnu E-2 sekrēciju (*Schmidt et al.*, 2003). Tādējādi kopumā tiek aktivēti arī osteoklasti ar sekojošu kaula resorbciju un implantāta fiksācijas zudumu. Mūsu pētījumā implantāta zaudējuma pazīmes dzīvniekiem nenovērojām nevienā no implantācijas periodiem, lai gan pēc 3 mēnešiem konstatējām salīdzinoši daudz gan IL-6, gan OC pozitīvus osteocītus. Daudz IL-6 pozitīvo šūnu un vienlaikus ļoti daudz OC pozitīvo šūnu

konstatējām apdedzināta HAP-1 implantācijas rajonā, bet monofāziska β -TCP rajonā – vidēji daudz IL-6 saturošu šūnu un ļoti daudz OC šūnu. Turklāt **3 mēnešus** arī pēc PMMA cementa, ar PCL pārklātas HAP tabletes implantācijas tika konstatēts ļoti daudz IL-6 saturošu šūnu. Acīmredzot minētā atrade mūsu pētījumā skaidrojama ar biomateriālu mazāk agresīvu un selektīvu ietekmi uz šo biomarķieru ekspresiju un no tās izrietošām sekām.

Tomēr literatūrā maz aprakstīti mums līdzīgi pētījumi par šo iepriekšminēto faktoru ekspresiju no paša kaula implantātu rajonos. Tā *Ninomiya et al.* (2001) norāda, ka HAP un bifāziskais HAP/ β -TCP stimulē kaula IL-6 un proteāžu ekspresiju, tā paaugstinot kaula resorbciju, osteolīzi un iespēju zaudēt implantātu. Savukārt *Eyckmans et al.* (2013) atzīmē izteiktu osteoblastu IL-6 un BMP ekspresiju Ca-P implantācijas gadījumā. Minēto pētījumu dati atbilst mūsu atradei par salīdzinoši lielu IL-1 un IL-6 saturošo šūnu skaitu kalcija fosfātu saturošu biomateriālu rajonos, liecinot gan par slēptu iekaisuma norisi, gan arī par IL-6 stimulētu citu citokīnu izdali (*Feurino et al.*, 2007). Tomēr uzskatām, ka IL-1 un IL-6 izdala vien norāda uz iekaisumu bez vizuālas iekaisuma šūnu atrades, kas laika gaitā samazinās.

Schminke et al. (2015) aprakstījuši, ka 30% implantāciju gadījumu kā nopietna pēcimplantācijas komplikācija pacientiem attīstās periimplantīts, kas izraisa balstaudu zaudējumu. Autori arī norādījuši, ka šajā gadījumā audos izteikti paaugstinās IL-8 ekspresija. Savukārt *Kontinen et al.* (2006) periimplantīta un hroniska periodontīta pacientiem atraduši pastiprinātu citu citokīnu – IL-1 un IL-6 – atbrīvošanos un osteoklastu aktivāciju. *Svenson et al.* (2015) audos, kur titāna virsma bija inficēta ar *Staphylococcus aureus*, konstatējuši paaugstinātu IL-6, IL-8 un TNF- α ekspresiju, izvērtējot pēdējo kā biomateriālu asociētu infekciju. Mūsu eksperimentos **3 mēnešus** pēc implantācijas tikai komerciālā PMMA cementa apvidū novērojām mazizteiktu iekaisumu ar vienlaikus paaugstinātu IL-8 ekspresiju, turklāt citokīnu saturošo šūnu skaits šinī gadījumā būtiski neatšķīrās no šūnu skaita audos ar citiem implantātiem.

Literatūrā atrodamas liecības, ka biomateriāla sastāvs nozīmīgi neietekmē šo citokīnu izdali, ja virsmas pārklājums ir līdzīgs (*Schmidt et al.*, 2003). *De Wilde et al.* (2015) mīkstajos un cietajos audos 8 nedēļas pēc tīra un ar nano-hidroksiapatītu pārklāta titāna implantācijas statistiski ticamas atšķirības IL-1, IL-6 un IL-8 ekspresijā nekonstatēja, norādot, ka biomateriāli ar HAP pārklājumu varētu būt biosaderīgāki. Mūsu pētījumā vislielākais IL-1 induktors bija α -TCP cements I un IL-6 induktors – komerciālais PMMA cements, α -TCP cements I un ar PCL pārklātais HAP, kas pamato mūsu jau pieminētā slēptā iekaisuma norisi.

Kopumā jāatzīmē, ka mūsu pētījuma atrade proinflatōro citokīnu ekspresijā – IL-1 saturošo šūnu skaita samazināšanās **4,5 mēnešus** un ilgākā laikā pēc implantācijas, pilnīgs

IL-6 un IL-8 saturošo šūnu skaita izsīkums **4,5 mēnešus** pēc implantācijas, bet tā atjaunošanās **6 un 8 mēnešus** pēc implantācijas skaidrojama ar implantācijas traumas ietekmes mazināšanos, selektīvu organisma atbildes reakciju uz traumu un biomateriālu. Šis fakts arī norāda uz IL-6 un IL-8 nozīmi ilgākā reģenerācijas periodā. Interesanti atzīmēt par trikalcija fosfāta materiālu, proti, jau **3 mēnešus** pēc implantācijas β -trikalcija fosfāta materiāla rajonā bija vērojama variabla IL-6 ekspresija un salīdzinoši maz izteikta arī IL-8 ekspresija. Savukārt **4,5 mēnešus** pēc implantācijas bija vērojama IL-6 un IL-8 saturošo šūnu skaita samazināšanās un izsīkums, kas, iespējams, norāda uz trikalcija fosfāta selektīvo ietekmi citokīnu ekspresijā. Ņemot vērā to, ka pēc **4,5 mēnešiem** mūsu pētījumā konstatēta arī OP aktivitātes samazināšanās un pat izsīkums, tad šī atrade būtu saistāma ar jau citu autoru darbos norādīto OP un proinflatōro citokīnu ekspresijas savstarpējo saistību (*Sodek et al.*, 2000), kur autori atzīmējuši OP stimulējošo ietekmi uz imūno šūnu spēju izdalīt IL-1 un IL-6. Šeit interesanti atzīmēt arī *Podaropoulos et al.* (2009) novēroto mazizteikto jaunā kaula veidošanos 4 mēnešus pēc β -trikalcija fosfāta implantācijas, kur vienlaikus autori atzīmē arī neviennozīmīgo, β -trikalcija fosfātā esošo, kalcija jonu ietekmi uz kaulaudu reģenerāciju. Minēto apstiprina novērojumi, ka biomateriāla resorbcijas laikā palielinātais atbrīvoto kalcija jonu skaits no vienas puses var stimulēt osteoklastu aktivitāti (*Yamada et al.*, 1997), bet no otras puses – tas nodrošina labu mikrovidi osteogēnēzei (*Fujita et al.*, 2003). Tomēr jāatzīmē, ka **4,5 mēneši** pēc implantācijas ir šūnu funkcionālās aktivitātes samazināšanās laiks, ko pamato arī OPG vismazākā atrade mūsu pētījumā. Savukārt **6.** pēcimplantācijas **mēnesī** nomainās šūnu funkcionālā aktivitāte, zūdot traumas ietekmei uz balstaudiem, un **8 mēneši** pēc implantācijas ir laiks, kad balstaudu funkcionālā aktivitāte pēc implantācijas procesa ir atjaunota, par ko liecina OPG, OP un OC ekspresijas aktivitātes atjaunošanās. Paralēli noris arī proinflatōro citokīnu un antimikrobās aizsardzības proteīnu izdales atjaunošanās (kaut arī maz izteikta). Minēto pamato atrastās šo faktoru savstarpējās korelācijas, proti, ciešā statistiski ticamā korelācija starp OP un β Def-2 izdali un starp OP un IL-6 izdali eksperimenta grupā un OP un IL-1, IL-8 un β Def-2 izdali kontroles audos **3 mēnešus** pēc implantācijas, bet **8 mēnešus** pēc implantācijas starp OP un β Def-2 izdali kontroles audos.

5.2.6. Antiinflatōrais (pretiekaisuma) citokīns interleikīns-10 (IL-10)

IL-10 ekspresija tika konstatēta visos pēcimplantācijas periodos, izņemot pēc **4,5 mēnešiem** abos – gan eksperimenta, gan kontroles – audos, un šo faktoru saturošo šūnu skaits **3, 6 un 8 mēnešus** pēc implantācijas statistiski ticami neatšķīrās. Savukārt datu korelāciju analīze uzrādīja statistiski ticamu ciešu korelāciju starp antiinflatōrā citokīna IL-10 un

proinflatōrā citokīna IL-1 izdali, kā arī IL-10, βDef-2 un IL-10 un kaula matricēs proteīna OP izdali eksperimenta kaulaudos **3 mēnešus** pēc implantācijas. Šajā pēcimplantācijas periodā arī visvairāk IL-10 pozitīvi osteocīti tika atrasti pēc komerciālā PMMA cementa, β-TCP, ar PCL pārklātas HAP un nepārklātas HAP tabletes implantācijas. Savukārt kontroles audos IL-10 korelācijas ar citiem faktoriem nenovērojām.

Minētā atrade liecina par saglabātu audu lokālo atbildes reakciju, cenšoties nomākt iekaisumu, jo IL-10 ir 2. tipa citokīns, kas tiek uzskatīts par pretiekaisuma citokīnu, kuram ir nozīmīga loma imūnsistēmas regulācijā un iekaisuma procesā (*Eskdale, 1997*), kuru producē tādas imūnās sistēmas šūnas kā T šūnas (Th2, Th1, Th17) (*McGuirk and Mills, 2002*), monocīti, makrofāgi, dendrītiskās šūnas (*Fillatreau et al., 2008*), granulocīti, t. sk. eozinofīlie leukocīti un tuklās šūnas (*Ryan et al., 2007*).

Savukārt IL-10 trūkums **4,5 mēnešus** pēc implantācijas skaidrojams ar proinflatōro citokīnu aktivitātes samazināšanos, kad maz izteikta bija arī IL-1 ekspresija.

Sešus un 8 mēnešus pēc implantācijas vērojamā IL-10 ekspresijas atjaunošanās būtu skaidrojama ar IL-10 kā imūnsistēmas regulatora lomu, ko arī savā darbā atzīmējis jau minētais *Eskdale (1997)*, un kas saglabājas ilgstošā laika periodā – **6 un 8 mēnešus** pēc biomateriālu implantācijas.

Pārsvarā atrodami pētījumi par imūnsistēmas vispārējām reakcijām implantātu rajonos, bet ne par konkrētu citokīnu ekspresiju no paša kaula, tādēļ mūsu atrade vērtējama kā jauna un oriģināla, kas pierāda paša kaula lomu lokāla iekaisuma vājināšanā. Šo mūsu pieņēmumu apstiprina *Numerof et al. (2006)* aprakstītā IL-10 antagoniskā ietekme uz proinflatōro citokīnu TNF-α, IL-1, IL-8, IL-12 izdali un stimulējošā ietekme uz B limfocītu proliferāciju un antivielu produkciju, kā arī *Zhou et al. (2005)* pētījums par IL-10 izteikti supresīvu ietekmi uz iekaisuma mediatoru produkciju.

Neskaidra un maz pētīta ir citokīna IL-10 ekspresija korelācijā ar implantācijas laiku. Tā *Salma et al. (2009)* jau 2 nedēļas pēc ar deksametazonu un lidokaīnu piesūcināta HAP implantācijas atradusi šī faktora izdali, kas, iespējams, saistās ar zāļu primāro nomācošo ietekmi uz implantātam apkārtējiem audiem. Savukārt *Reinis et al. (2011)* divas un 4 nedēļas pēc stikla-kalcija fosfāta keramikas implantācijas trušiem novēroja paaugstinātu IL-10 ekspresiju ap biomateriālu, kas bija apstrādāts ar *P. aeruginosa* kultūru, kā arī to, ka divu un četru nedēļu implantācijas laiks neietekmē IL-10 ekspresiju biomateriālu implantācijas gadījumos. Interesanti šeit atzīmēt *Velard et al. (2013)* pētījumu, kurā autori norāda uz biomateriāla sastāva lomu audu reģenerācijā, proti, HAP un β-trikalcija fosfātam piemītošo augsto osteoindukciju un to, ka šo biomateriālu un apkārtējo audu savstarpējās iedarbības

rezultātā var tikt inducēta imūnsistēmas šūnu atbildes reakcija, kas var būt dažādi izteikta. Būtiski ir atzīmēt arī *Hoene et al.* (2015) pētījumu, kurā 56 dienas pēc virsmas modificēta titāna intramuskulāras implantēšanas žurkām autori novēroja statistiski nozīmīgu korelāciju starp proinflatōro citokīnu interferona γ un IL-2 ekspresiju un CD-68 pozitīvu monocītu infiltrācijā, kamēr korelācija netika novērota starp pretiekaisuma citokīnu IL-10, IL-4 ekspresiju un iekaisuma šūnu infiltrāciju.

Kopumā, balstoties uz mūsu relatīvi viendabīgo faktora reakcijas atradi, uzskatām, ka IL-10 ir viens no universāliem ilgstoša iekaisuma nomākšanas faktoriem, kas izzūd šūnu funkcionālās aktivitātes zuduma laikā (**4,5 mēnešus** pēc biomateriālu implantācijas) un ir relatīvi dažādu biomateriālu selektīvi inducēts.

5.2.7. β Defensīns-2 (β Def-2)

Vislielākais antimikrobo proteīnu β Def-2 saturošo osteocītu skaits biomateriālu implantācijas rajonos bija vērojams **3 mēnešus** pēc implantācijas. Minētā atrade liecina par iekaisuma aktīvāku norisi šajā laika periodā, kas atbilst arī citu autoru datiem par akūta iekaisuma attīstību ap implantātiem, kuros norādīts, ka tas parasti attīstās līdz 3 mēnešiem (*Jones et al.*, 2001; *Trampuz et al.*, 2005; *Higgins et al.*, 2009). Mūsu pētījumā vislielāko β Def-2 saturošo osteocītu skaitu pārsvarā novērojām nepārklātas HAP tabletes implantācijas apvidū, kas, iespējams, liecina par šī faktora izdales selektivitāti HAP materiālam salīdzinoši agrīnā pēcimplantācijas periodā. **4,5 mēnešus** pēc α -TCP (ar dažādu pH) implantācijas β Def-2 audos tika atrasts tikai retu β Def-2 saturošu šūnu veidā α -TCP ar pH 8,0 un pH 6,0 rajonā, bet **6 un 8 mēnešus** pēc implantācijas ar HAP-2 materiālu β Def-2 pozitīvas šūnas vispār netika novērotas. Faktoru korelāciju analīze uzrādīja statistiski ticamu ciešu korelāciju starp β Def-2 un antiinflatōrā citokīna IL-10 izdali, bet statistiski ticamu vidēji ciešu korelāciju – starp β Def-2 un proinflatōrā citokīna IL-1 izdali eksperimenta audos **3 mēnešus** pēc implantācijas.

Minētā β Def-2 saturošo šūnu atrade ir saistāma ar proinflatōro un antiinflatōro proteīnu aktivitāti tieši **3 mēnešus** un šūnu funkcionālās aktivitātes izsīkumu **4,5 mēnešus** pēc implantācijas, kas nozīmē aktīvāku iekaisuma procesu audos salīdzinoši agrīnā pēcimplantācijas periodā. Tādēļ arī domājams, ka β Def-2, proinflatōro un antiinflatōro proteīnu ekspresija samazinās, izzūdot iekaisumam, kad atjaunojas arī audu reģenerācijas process.

β -defensīnu loma un funkcijas organisma antimikrobās aizsardzības sistēmā ir samērā plaši aprakstītas (*Crovella et al.*, 2005; *Veerayutthwilai et al.*, 2007; *Vordenbäumen et al.*,

2010; *Nakatsuji and Gallo, 2012*), tomēr ir maz un turklāt pretrunīgi dati par defensīnu izdalīšanos iekaisuma skartajos audos, īpaši kaulaudos biomateriālu implantācijā. Pētījumā par pacientiem ar periodontītu un periimplantītu (*Bissell et al., 2004*) norādīts, ka augstāka β Def-2 ekspresija tika novērota tieši veselajos blakus audos, nevis periodontīta un periimplantīta zonās. Savukārt citā pētījumā par osteomielīta pacientiem (*Varoga et al., 2008*) atrasts, ka salīdzinoši lielāka β Def-2 ekspresija ir osteomielīta skartajās, nevis kontroles zonas audos. *Reinis et al. (2011)* divas un četras nedēļas pēc stikla-kalcija fosfāta keramikas implantācijas trušiem novēroja izteiktāku β Def-2 ekspresiju audos pēc divām nedēļām gan biomateriāla apvidū, gan kontroles audos. Tomēr atrade nesenākos pētījumos liecina, ka β Def-2 ekspresija pārsvarā norit implantācijas rajonā, nevis kontroles audos. Piemēram, *Ertugrul et al. (2014)* pētījumā pacientiem ar periimplantītu novērojuši augstāku β Def-2 līmeni periimplantāta audos, ko autori saista ar audu atbildes reakciju uz implantāciju (kas bija noteicošā arī mūsu pētījumā) un kaula resorbciju un mikrobu savairošanos audos ap implantātu. Interesanti atzīmēt arī *Warnke et al. (2013)* pētījumu, kurā, mezenhimālo šūnu, osteoblastu, keratinocītu šūnu kultūras inkubējot ar β Def-2, konstatēja labu biosaderību un pat šī proteīna stimulējošu ietekmi uz minēto šūnu proliferatīvo aktivitāti. Tomēr autori norāda, ka šī atrade nav pārliecinoša un būtu nepieciešami turpmāki pētījumi par dažādu šūnu proliferatīvo aktivitāti defensīnu ietekmē dentālo implantātu funkcionālajā virsmā.

Kopumā vērtējot atradi mūsu pētījumā, jāatzīmē, ka organisma galvenā antimikrobā proteīna β Def-2 sākotnēji izteiktā izdale kaulaudos **3 mēnešus** pēc implantācijas korelē ar iekaisuma norisi un, tam izzūdot, lēnām sāk atjaunoties **6. un 8.** pēcimplantācijas **mēnesī** un tikai kontroles audu rajonos. Šis fakts un biomateriālu ietekmes trūkums liecina, ka primāri kaulaudos tiek novērstas iekaisuma un posttraumatiskās pārmaiņas, kam seko gausa antimikrobā proteīna sintēzes atjaunošanās. Kopumā šī atrade vērtējama kā jauna un būtiska eksperimentālajā implantoloģijā.

5.2.8. Apoptozes atrade

Apoptotiskas šūnas tika konstatētas visos pēcimplantācijas periodos, bet prevalējoši agrīnā pēcimplantācijas laikā – **3 mēnešus** pēc implantācijas – to bija visvairāk neapdedzināta HAP un HAP-1, β -trikalcijs fosfāta un polimēra tipa implantātu rajonos. Minētajā laikā bija konstatēta arī izteiktāka antimikrobā proteīna, proinflatōro un antiinflatōro citokīnu ekspresija, no kurām, iespējams, tieši proinflatōro citokīnu ekspresija ir cieši saistīta ar apoptozes pieaugumu, par ko liecina arī statistiski ticami lielāks apoptotisko osteocītu skaits un proinflatōrā citokīna IL-1 saturošo osteocītu skaits implantātu apvidū šajā laika periodā.

Mūsu atrade sakrīt ar citu autoru datiem, kas skaidro gan apoptozes un iekaisuma savstarpēji neatkarīgu norisi, gan iekaisuma izraisītu šūnu apoptozi, gan to, ka apoptoze netieši pat inhibē iekaisuma attīstību. Piemēram, *Fadok et al.* (1998) un *Savil et al.* (2000) aprakstījuši, ka apoptozes jeb programmētās šūnu nāves ceļā šūnu komponentu pārstrādi nodrošina kā makrofāgi, tā dendrītiskās šūnas, bet netiek atbrīvoti intracelulārie komponenti, tādējādi neradot iekaisumu pašas apoptozes norises laikā. Šeit interesanti arī atzīmēt *Fadok et al.* (1998) un *Savil et al.* (2000) pieņēmumu, ka receptoru un opsonīnu piesaiste apoptotisko šūnu virsmas ligandiem nodrošina to atpazīšanu un modificē fagocitozi, un tādējādi tiek inhibēta iekaisuma mediatoru atbrīvošana un palielināta TGF- β 1 produkcija. Arī *Peng et al.* (2007) apstiprina minēto pieņēmumu, skaidrojot, ka dendrītiskajām šūnām, nonākot kontaktā ar apoptiskajām šūnām, tiek nomākta citokīnu izdāle un tās nenobriest, tādējādi iekaisuma rašanās netiek nekādi veicināta. Turpretī *Gamonal et al.* (2001) aprakstījuši, ka hroniska iekaisuma gadījumā aktivizējas apoptotiskais process un palielinās apoptotisko šūnu skaits, kas līdzinās atradei **3 mēnešus** pēc implantācijas mūsu pētījumā. Interesanti atzīmēt vairākus pētījumus par biomateriālu ietekmi uz apoptozi, kuru atrade sakrīt ar mūsu pētījumā novēroto, ka HAP veicina šūnu apoptozi. Piemēram, *Salma et al.* (2009) divas nedēļas pēc nepiesātināta un ar lidokaīnu piesātināta HAP implantācijas novēroja salīdzinoši daudz apoptotisko šūnu un arī TGF- β 1 saturošo osteocītu skaitu eksperimenta audos, bet vienmērīgi daudz IL-10 pozitīvo šūnu gan eksperimenta, gan kontroles audos. *Shi et al.* (2009) cilvēka osteoblastos *in vitro* novēroja, ka HAP daļiņas veicina apoptozi un tās intensitāte ir atkarīga no to izmēra, bet neatkarīgi no tā šim materiālam ir laba biosaderība. Arī *Xu et al.* (2012) dažāda izmēra, formas un virsmas HAP daļiņu pētījumā žurku osteoblastos *in vitro* novēroja, ka HAP nomāc minēto šūnu aktivitāti, bet vienlaikus veicina šūnu apoptozi, kuras izteiktība savukārt ir atkarīga no šo daļiņu izmēra un formas. Tajā pašā laikā ir atrodami dati, kas liecina, ka apoptozes saistība ar biomateriāla veidu agrīnā implantācijas periodā nav pārlicinoša. Piemēram, *Bombonato-Prado et al.* (2009) PMMA un HAP materiālu pētījumā, izmantojot cilvēka osteoblastu kultūru, pēc 7 dienām izmaiņas apoptozi regulējošo gēnu analīzē nenovēroja. Mūsu pētījuma vēlākos pēcimplantācijas laikos – **4,5, 6 un 8 mēnešus** pēc implantācijas – tika konstatēta apoptotisko šūnu skaita pakāpeniska samazināšanās no vidēja daudzuma (++) α -trikalcijs fosfāta ar dažādu pH rajonā līdz mazam daudzumam (+) pēc **6 un 8 mēnešiem** HAP rajonā. Minētā atrade būtu saistāma arī ar antimikrobo proteīnu, proinflaturo un antiinflaturo proteīnu ekspresijas samazināšanos **4,5, 6 un 8 mēnešus** pēc implantācijas, kas apliecina iekaisuma un apoptotiskā procesa savstarpējo saistību. Mazāk izteiktais apoptozes process mūsu pētījumā pēc **4,5 mēnešiem** būtu saistāms arī ar šūnu

funkcionālās aktivitātes izmaiņām (tās samazināšanos), ko pamato arī OPG samazinātā izdala mūsu pētījumā. Savukārt pēc **6 mēnešiem** nomainās šūnu funkcionālā aktivitāte, zūdot traumas ietekmei uz balstaudiem, un **8 mēneši** pēc implantācijas ir laiks, kad balstaudu funkcionālā aktivitāte pēc implantācijas procesa ir atjaunota, par ko liecina OPG, OP un OC ekspresijas aktivitātes atjaunošanās. Literatūrā praktiski nav atrodamu pētījumu par mūsu eksperimentā izmantotajiem biomateriāliem un apoptozes saistību šajos implantācijas laika periodos, bet saistībā ar 4 un 6 mēnešu pēcimplantācijas laiku interesanti atzīmēt *Ibares-Frías et al.* (2015) novērojumu aca audos, kurā autori apraksta aktīvu apoptozi implantācijas periodā līdz 72 stundām, bet vēlākā periodā, t. sk. pēc 1, 3, 4 un 6 mēnešiem novēroja tikai atsevišķas apoptotiskas šūnas, ko autori saista ar iekaisumu un aktīvāku audu reģenerāciju agrīnos pēcimplantācijas periodos. Literatūrā atrodami interesanti dati par OP, iekaisuma citokīnu un apoptozes procesa saistību. Izrādās, ka OP stimulē imūno šūnu spēju izdalīt IL-1, IL-6 un TNF, bet inhibē apoptozi (*Sodek et al.*, 2000). Mūsu pētījumā OP inhibējošā ietekme netika novērota, tieši pretēji – **3 mēnešu** periodā, kad tika konstatēta paaugstināta OP ekspresija, bija arī salīdzinoši liels, kaut arī variabls apoptotisko šūnu skaits. Acīmredzot šeit būtiska ir iekaisuma un biomateriāla ietekmes selektivitātes kombinācija, kas mūsu gadījumā ir attiecināma gan uz “tīru” HAP materiālu, gan trikalcijs fosfāta un polimēra tipa implantātiem.

Otrs svarīgs faktors biomateriālu implantāciju gadījumos ir traumatiskais bojājums. *Web et al.* (1997) un *Ratner et al.* (2013) norādījuši, ka biomateriālu implantācijas process ir saistīts ar tiešu mehānisku iedarbību uz audiem, kas ir viens no apoptozes procesa izraisīšanas iemesliem. *Bas et al.* (2012) kohleāru implantātu pētījumā šūnu apoptozi saista ar implantācijas traumas radītu iekaisumu un oksidatīvo stresu. Arī *Jia et al.* (2013) pārskata analizē par implantācijas traumas ietekmi uz apoptozi secinājuši, ka apoptozes process ir saistīts ar traumu un ar to saistīto iekaisumu, par ko liecināja proinflatōro citokīnu ekspresijas un apoptozes procesa korelācija pēcimplantācijas periodā. Domājams, ka minētā saistība ir attiecināma arī uz mūsu pētījumu, kurā konstatētās biomarkieru pārmaiņas – augsta antimikrobo proteīnu, proinflatōro un antiinflatōro citokīnu ekspresija un šūnu apoptotiska bojāeja – ir saistāmas ar audu traumatisku bojājumu biomateriālu implantācijas laikā, kas aktīvāk izpaudās tieši **3 mēnešus** pēc implantācijas. Nevar izslēgt arī biomateriāla kā ķīmiska substrāta izraisītu apoptozi, jo mūsu pētījumā novērojām selektīvu apoptozes norisi (atšķirīgu apoptotisko šūnu skaitu) gan “tīra” HAP materiāla, gan trikalcijs fosfāta un polimēra tipa implantātu rajonos. Tā arī *Kokesch-Himmelreich et al.* (2013) kalcija fosfāta cementu pētījumā novērojis, ka biomateriāla sastāvs ietekmē šūnu apoptozi, proti, ar stronciju

pārklāts kalcija fosfāta cements aktīvāk nekā “tīrs” cements nomāc apoptozi un turklāt arī veicina osteoblastu diferenciāciju.

Kopumā vērtējot, apoptozes norise mūsu pētījumā liecina, ka apoptoze biomateriālu implantācijas gadījumā noris traumatiska bojājuma radīta iekaisuma un biomateriāla selektivitātes kombinācijas ietekmē.

6. SECINĀJUMI

1. Biomateriālu implantācija mīkstajos audos izraisa nespecifisku audu lokālo atbildes reakciju uz traumu/implantāciju, ko raksturo audu tūska, limfocītu infiltrācija, retas perēkļveida granulācijas un fibrozes perēkļi neatkarīgi no implantētā materiāla veida. Balstaudos jauna kaula veidošanās notiek 3. pēcimplantācijas mēnesī pēc nepārklātas HAP tabletes, ar PCL pārklātas HAP tabletes, PMMA cementa un neapdedzinātu HAP granulu implantācijas bez plašām kaula resorbcijas zonām, kas liecina par minēto materiālu izteiktāku osteoinduktivitāti salīdzinājumā ar dažādiem trikalcija fosfāta cementiem (dažādā temperatūrā apdedzinātu β -TCP, ar dažādu pH monofāzisko α -TCP un bifāzisko HAP/ β -TCP) un apdedzinātām HAP granulām.
2. BMP-2/4 ir patstāvīgs kaula augšanu veicinošs faktors, kas kopumā kaulaudos palielinās no 3. pēcimplantācijas mēneša un šī tendence saglabājas arī 6 un 8 mēnešus pēc implantācijas. BMP-2/4 ekspresija selektīvi ir atkarīga no biomateriāla veida, kamēr faktora lēna atjaunošanās kontroles pusē liecina par traumas ietekmi uz dzīšanu.
3. Dažādā OPG ekspresija norāda uz selektīvu kaulaudu resorbcijas stimulēšanu. Kaulu resorbcija noris vienlaikus ar iekaisuma procesu, ko pierāda OPG izdales ciešā korelācija ar IL-6 izdali 3 mēnešus pēc implantācijas.
4. Trīs mēnešus pēc dažādu biomateriālu implantācijas palielinātais OP šūnu skaits līdztekus palielinātam IL-6 šūnu skaitam norāda uz slēptu, traumas un biomateriālu radītu iekaisumu. 4,5 mēneši pēc implantācijas ir šūnu funkcionālās aktivitātes samazināšanās laiks, ko pamato OPG vismazākā atrade un citokīnu trūkums, kas mainās 6. pēcimplantācijas mēnesī, zūdot traumas ietekmei uz balstaudiem. Astoņus mēnešus pēc implantācijas balstaudi atjauno savu funkcionālo aktivitāti.
5. Izteiktā kaulaudu pamatvielas proteīna OC saturošo šūnu vislielākais daudzums 3 mēnešus pēc apdedzinātu HAP granulu, ar PCL pārklāta HAP, β -TCP-2 un nekomerciālā PMMA implantācijas liecina par tieši šo biomateriālu selektīvu kaulaudu mineralizācijas stimulāciju.
6. Izteiktā proinflatōro citokīnu – IL-1, IL-6 un IL-8 ekspresija 3 mēnešus pēc dažādu biomateriālu implantācijas liecina par audu atbildes reakciju gan uz traumu, gan uz biomateriālu, kas rada šūnu funkcionālo izsīkumu 4,5 mēnešus pēc implantācijas, bet vēlāk atjaunojas, liecinot par slēptā iekaisuma pakāpenisku izzušanu.
7. Pretiekaisuma citokīnam IL-10 raksturīga pastāvīga izdāle kaulaudos pēc dažādu biomateriālu, selektīvi pēc komerciālā PMMA cementa, implantācijas. Vislielākā IL-10 saturošo šūnu atrade 3 mēnešus pēc implantācijas liecina, ka šajā laikā visaktīvāk tiek

nomākts biomateriālu radītais iekaisums, bet IL-10 saturošo šūnu trūkums pēc 4,5 mēnešiem liecina, ka šūnu lokālās aizsardzības sistēma ir izsīkususi.

8. Organisma galvenā antimikrobā proteīna β Def-2 sākotnēji izteiktā izdale kaulaudos 3 mēnešus pēc implantācijas korelē ar iekaisuma norisi un proinflammatoro un antiinflammatoro citokīnu izdali, un, iekaisumam izzūdot, lēnām sāk atjaunoties pēc 6 un 8 mēnešiem tikai kontroles pusē. Šī atrade kombinācijā ar biomateriālu selektīvu ietekmes trūkumu liecina par kaulaudos primāri norītošo iekaisuma/traumatisko pārmaiņu novēršanu ar sekojošu gausu antimikrobā proteīna izdales atjaunošanos.
9. Apoptoze biomateriālu implantācijas gadījumā noris traumatiska bojājuma radīta iekaisuma un biomateriāla selektivitātes kombinācijas ietekmē, kas aktīvāk izpaužas 3 mēnešus pēc implantācijas.
10. Audu reaktogenitātes/biosaderības morfoloģiskajā noteikšanā 3 mēnešus pēc implantācijas visbūtiskākais ir BMP-2/4 HAP un to saturošiem materiāliem un proinflammatorais citokīns IL-1 kalcija fosfāta un polimēra materiāliem, par ko liecina statistiski ticamā šo faktoru izdale eksperimenta kaulaudos; mazizteiktas faktoru izdales 4,5 mēnešus pēc implantācijas dēļ šis pēcimplantācijas laiks nebūtu iekļaujams diagnostikas algoritmā; apdedzināta HAP implantācijas gadījumā pēc 6 mēnešiem nosakāms proinflammatorais citokīns IL-8 un kaulu matricas proteīns OC, bet pēc 8 mēnešiem – proinflammatorais citokīns IL-6, antiinflammatorais citokīns IL-10 un kaulu šūnu aktivitātes marķieris OPG, jo minētajos laika periodos šo faktoru izdale atjaunojās normas robežās.

7. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Aebli N., Stich H., Schawalder P., et al. Effects of bone morphogenetic-2 and hyaluronic acid on the osseointegration of hydroxyapatite coated implants: an experiment study in sheep // *J Biomed Mater Res*, 2005; 73A: 295–302.
2. Aihara M., Tsuchimoto D., Takizawa H., et al. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced Interleukin-8 production by gastric cancer cell line, MKN45 // *Inf Immun*, 1997; 65: 3218–3224.
3. Ahn J. J., Cho S. A., Byrne G., et al. New bone formation following sinus membrane elevation without bone grafting: histologic findings in humans // *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2011; 26 (1): 83–90.
4. Albrektsson T., Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osteointegration // *Eur Spine J*, 2001; 10 (2): S96–101.
5. Alikhami M., Alikhami Z., He H. Lipopolyscharides indirectly stimulate apoptosis and global induction of apoptotic genes in fibroblasts // *J Biol Chem*, 2003; 278: 52901–52908.
6. Anderson J. M. Biological responses to materials // *Ann Rev Mater Research*, 2001; 31: 81–110.
7. Anderson J., Ekdahl K. N., Lambris J. D., Nilsson B. Binding of C3 fragments on top of adsorbed plasma proteins during complement activation on a model biomaterial surface // *Biomaterials*, 2005; 26: 1477–1485.
8. Anderson J. M., Rodriguez A., Chang D. T. Foreign-body reactions to biomaterials // *Semin in Immunology*, 2008; 20: 86–100.
9. Arikan F., Buduneli N., Kütükçüler N. Osteoprotegerin levels in peri-implant crevicular fluid // *Clin Oral Implants Res*, 2008; 19 (3): 283–288.
10. Bagambisa F. B., Kappert H. F., Schili W. Cellular and molecular events at the implant surface // *J Craniomaxillfac Surg*, 1994; 22: 12–17.
11. Baggolini M., Clark–Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine // *FEBS letters*, 1992; 307: 97–101.
12. Bantel H., Beikler T., Flemmig T. F., Schulce-Osthoff K. Caspase activation is invlved in chronic peridontitis // *FEBS Lett*, 2005; 579: 5559–5564.
13. Baroud G., Bohner M. Biomechanical impact of vertebroplasty – postoperative biomechanics of vertebroplasty // *Joint Bone Spine*, 2006; 76: 144–150.
14. Bas E., Gupta C., Van De Water T. R. A novel organ of corti explant model for the study of cochlear implantation trauma // *Anat Rec (Hoboken)*, 2012; 295 (11): 1944–1956. doi: 10.1002/ar.22585.
15. Baslé M. F., Chappard D., Grizon F., et al. Osteoclastic resorption of Ca-P biomaterials implanted in rabbit bone // *Calcif Tissue Int*, 1993; 53 (5): 348–356.
16. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation // *J Periodontol*, 1993; 64 (5): 456–460.
17. Bissell J., Joly S., Johnson G. K., et al. Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease // *J Oral Pathol Med*, 2004; 33 (5): 278–285.
18. Blouin S., Baslé M. F., Chappard D. Interactions between microenvironment and cancer cells in two animal models of bone metastasis // *Br J Cancer*, 2008; 98 (4): 809–815.
19. Bombonato-Prado K. F., Bellesini L. S., Junta C. M., et al. Microarray-based gene expression analysis of human osteoblasts in response to different biomaterials // *J Biomed Mater Res A*, 2009; 88 (2): 401–408. doi: 10.1002/jbm.a.31701.
20. Brånemark P. I. Osseointegration and its experimental backgroun // *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 1983; 50 (3): 399–410.
21. Broughton I. I. G., Jnais J. E., Attinger C. E. The basic science of wound healing // *Plastic and Reconstruction Surgery*, 2006; 117 (7): 12S–34S.

22. Brown B. N., Ratner B. D., Goodman S. B., et al. Macrophage polarization: an opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine // *Biomaterials*, 2012; 33 (15): 3792–3802.
23. Busscher H. J., van der Mei H. C., Subbiahdoss G, et al. Biomaterial-associated infection: locating the finish line in the race for the surface // *Sci Transl Med*, 2012; 4 (153): 153rv10.
24. Butler W. T., Ridal A., McKee M. D. Osteopontin // *Principles of bone biology* / Bilezikian J. P., Raisz L. G., Rodan G. A., editors. – San Diego, CA: Academic Press. – Pp. 167–181.
25. Chazono M., Tanaka T., Kitasato S., et al. Electron microscopy study on bone formation and bioresorption after implantation of beta-tricalcium phosphate in rabbit models // *J Orthop Sci*, 2008; 13 (6): 550–555. doi: 10.1007/s00776-008-1271-1.
26. Chen Y., Wang J., Zhu X. D., et al. Enhanced effect of β -tricalcium phosphate phase on neovascularization of porous calcium phosphate ceramics: in vitro and in vivo evidence // *Acta Biomater*, 2015; (1) 11: 435–448. doi: 10.1016/j.actbio.2014.09.028.
27. Cho H. J., Cho H. J., Kim H. S. Osteopontin: a multifunctional protein at the crossroads of inflammation, atherosclerosis, and vascular calcification // *Curr Atheroscler Rep*, 2009; 11 (3): 206–213.
28. Choi S. T., Kim J. H., Kang E. J., et al. Osteopontin might be involved in bone remodelling rather than in inflammation in ankylosing spondylitis // *Rheumatology*, 2008; 47 (12): 1775–1779.
29. Crotti T. N., Smith M. D., Findlay D. M., et al. Factors regulating osteoclast formation in human tissues adjacent to peri-implant bone loss: expression of receptor activator NF κ B, RANK ligand and osteoprotegerin // *Biomaterials*, 2004; 25 (4): 565–573.
30. Crotti T. N., Smith M. D., Hirsch R. S., et al. Receptor activator NF κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis // *J Perio Res*, 2003; 38: 380–387.
31. Crotti T. N., Dharmapatni A. A. S. S. K., Alias E., Haynes D. R. Osteoimmunology: major and costimulatory pathway expression associated with chronic inflammatory induced bone loss // *Journal of Immunology Research*, 2015; 2015: 13 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/281287>.
32. Crovella S., Antcheva N., Zelezetsky I., et al. Primate β -defensins – structure, function and evolution // *Current Protein and Peptide Science*, 2005; 6: 7–21.
33. Dale B. A., Kimball J. R., Krisanaprakornkit S. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva // *J Periodontal Res*, 2001; 36: 285–294.
34. Davis J., Tucci M., Franklin L. The effects of growth factors on the production of osteopontin and osteocalcin // *Biomed Sci Instrum*, 2006; 42: 31–36.
35. De Jong D. S., van Zoelen E. J. J., Bauerschmidt S., et al. Microarray analysis of bone morphogenetic protein, transforming growth factor β , activin early response genes during osteoblastic cell differentiation // *J Bone Miner Res*, 2002; 17: 2119–2129.
36. De Wilde E. A., Jimbo R., Wennerberg A., et al. The soft tissue immunologic response to hydroxyapatite-coated transmucosal implant surfaces: a study in humans // *Clin Implant Dent Relat Res*, 2015; 17 (1): 65–74. doi: 10.1111/cid.12128.
37. Dinarello C. A. Biology of interleukin 1 // *J FASEB*, 1988; 2: 108–115.
38. Dinarello C. A. The interleukin-1 family: 10 years of discovery // *J FASEB*, 1994; 8 (15): 1314–1325.
39. Dommisch H., Winter J., Açil Y., et al. Human beta-defensin (HBD-1, -2) expression in dental pulp // *Oral Microbiol Immunol*, 2005; 20 (3): 163–166.
40. El-Ghannam A. Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering // *Expert Rev Med Devices*, 2005; 2 (1): 87–101.
41. Eyckmans J., Roberts S. J., Bolander J., et al. Mapping calcium phosphate activated gene networks as a strategy for targeted osteoinduction of human progenitors // *Biomaterials*, 2013; 34 (19): 4612–4621. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.011.
42. Endres S., Wilke M., Knöll P., et al. Comparative in vitro analysis of vacuum plasma-sprayed titanium implants–evaluation of OPG, osteocalcin and AP expression // *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 2006; 144 (6): 632–638.

43. Ertugrul A. S., Tekin Y., Alpaslan N. Z., et al. Comparison of peri-implant crevicular fluid levels of adrenomedullin and human beta defensins 1 and 2 from mandibular implants with different implant stability quotient levels in nonsmoker patients // *J Periodontal Res*, 2014; 49 (4): 480–488. doi: 10.1111/jre.12127.
44. Eskdale J., Kube D., Tesch H., Gallagher G. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence // *Immunogenetics*, 1997; 46: 120–128.
45. Fadok V. A., Bratton D. L., Konowal A., et al. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, PAF // *Journal of Clinical Investigation*, 1998; 101: 890–898.
46. Fantner G. E., Hassenkam T., Kindt J. H., et al. Sacrificial bonds and hidden length dissipate energy as mineralized fibrills separate during bone fracture // *Nat Mater*, 2005; 4: 612–616.
47. Feurino L. W., Zhang Y., Bharadwaj U., et al. IL-6 stimulates Th2 type cytokine secretion and upregulates VEGF and NRP-1 expression in pancreatic cancer cells // *Cancer Biol Ther*, 2007; 6 (7): 1096–1100.
48. Fischer U., Janicke R. U., Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates // *Cell Death Differ*, 2003; 10: 76–100.
49. Fillatreau S., Gray D., Anderton S. M. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology // *Nat Rev Immunol*, 2008; 8: 391–397.
50. Froum S. J., Wallace S. S., Cho S. C., et al. Histomorphometric comparison of a biphasic bone ceramic to anorganic bovine bone for sinus augmentation: 6- to 8-month postsurgical assessment of vital bone formation. A pilot study // *Int J Periodontics Restorative Dent*, 2008; 28 (3): 273–281.
51. Fu Y. Ch., Nie H., Ho M.L., et al. Optimized bone regeneration based on sustained release from three-dimensional fibrous PLGA/HAp composite scaffolds loaded with BMP-2 // *Biotech and Bioeng*, 2008; 99 (4): 996–1006. doi:10.1002/bit.
52. Fujita R., Yokoyama A., Nodasaka Y., et al. Ultrastructure of ceramic-bone interface using hydroxyapatite and β -tricalcium-phosphate ceramics and replacement mechanism of β -tricalcium phosphate bone // *Tissue Cell*, 2003; 35: 427–440.
53. Funk C. D. Prostaglandins and leukotriens: advances in eicosanoid biology // *Science*, 2001; 294: 1871.
54. Galindo-Moreno P., Avila G., Fernandez-Barbero J. E., et al. Clinical and histological comparison of two different composite grafts for sinus augmentation: a pilot clinical trial // *Clin Oral Implants Res*, 2008; 19 (8): 755–759.
55. Gamonal J., Bascones A., Acevedo A. Apoptosis in chronic adult periodontitis analyzed by in situ breaks, electron microscopy, and immunohistochemistry // *J Periodontol*, 2001; 72: 517–525.
56. Garlet T. P., Coelho U., Silva J. S., Garlet G. P. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans // *Eur J Oral Sci*, 2007; 115 (5): 355–362.
57. Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation // *J Cell Biol*, 1992 (119): 493–501.
58. Gaur U., Aggarwal B. B. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of TNF superfamily // *Biochem Pharmacol*, 2003; 66 (8): 1403–1408.
59. Giachelli C. M., Liaw L., Murry C. E., et al. Osteopontin expression in cardiovascular diseases // *Ann NY Acad Sci*, 1995; 760: 109–126.
60. Giachelli C. M., Lombardi D., Johnson R. J., et al. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli *in vivo* // *Am J Pathol*, 1998; 152: 353–358.
61. Gilmour P. S., Rahman I., Donaldson K., MacNee W. Histone acetylation regulates epithelial IL-8 release mediated by oxidative stress from environmental particles // *American J of Physiology*, 2003; 284 (3): 533–540.
62. Gonçalves G., Portolés M. T., Ramírez-Santillán C, et al. Evaluation of the *in vitro* biocompatibility of PMMA/high-load HA/carbon nanostructures bone cement formulations // *J Mater Sci Mater Med*, 2013; 24 (12): 2787–2796. doi: 10.1007/s10856-013-5030-2.

63. Goodman S. B., Huie P., Song Y., et al. Cellular profile and cytokine production at prosthetic interfaces. Study of tissues retrieved from revised hip and knee replacements // *J Bone Jt Surg*, 1998; 80-B: 531–539.
64. Haake S. K., Huang G. T. J. Molecular biology of the host-microbe interaction in periodontal diseases (selected topics) // Newman, Takei, Carranza (Eds) *Clinical periodontology*. – Philadelphia: W. B. Saunders, 2002. – P. 162.
65. Habraken W. J. E. M., Wolke J. G. C., Jansen J. A. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering // *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007; 59: 234–248.
66. Hamada K., Hirose M., Yamashita T., Ohgushi H. Spatial distribution of mineralized bone matrix produced by marrow mesenchymal stem cells in self-assembling peptide hydrogel scaffold // *J Biomed Mater Res A*, 2008; 84: 128–136.
67. Harada Y. Experimental studies of healing process on compound blocks of hydroxyapatite (HAP) particles and tricalcium phosphate (TCP) powder implantation in rabbit mandible-comparison of HAP/TCP ratios and plastic methods // *Shikwa Gakuho*, 1989; 89 (2): 263–297.
68. Haynes D. R., Barg E., Crotti T. N., et al. Osteoprotegerin (OPG) expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies, oostoarthritis and normal controls // *Rheumatol*, 2003; 43: 1–12.
69. Haynes D. R., Crotti T. N., Potter A. E., et al. The osteoclastogenic molecules RANKL and RANK are associated with periprosthetic osteolysis // *J Bone Jt Surg Br*, 2001; 83B: 90–111.
70. Henning E., John A., Lemm W., et al. Bioestability of polyurethanes // *Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe*, 1989; 22: 204–220.
71. Henson P. M. The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes: II. Mechanisms of releaseduring phagocytosis, and adherence to nonphagocytosable surfaces // *J Immunol*, 1971; 107: 1547.
72. Higgins D. M., Basaraba R. J., Hohnbaum A. C., et al. Localized immunosuppressive environment in the foreign body response to implanted biomaterials // *Am J Pathol*, 2009; 175 (1): 161–170.
73. Hiraga T., Ninomiya T., Hosoya A., et al. Formation of bone-like mineralized matrix by periodontal ligament cells in vivo: a morphological study in rats // *J Bone Miner Metab*, 2009; 27 (2): 149–157.
74. Hoene A., Patrzyk M., Walschus U., et al. Systemic IFN γ predicts local implant macrophage response // *J Mater Sci Mater Med*, 2015; 26 (3): 131. doi: 10.1007/s10856-015-5476-5.
75. Holding C. A., Findlay D. M., Stamekov R. et al. The correlation of RANK, RANKL and TNF α expression with bone loss volume and polyethylene wear debris around hip implants // *Biomaterials*, 2006; 27 (30): 5212–5219.
76. Holm E., Gleberzon J. S., Liao Y., et al. Osteopontin mediates mineralization and not osteogenic cell development in vitro // *Biochem J*, 2014; 464 (3): 355–364. doi: 10.1042/BJ20140702.
77. Holt G., Murnaghan C., Reilly J., Meek R. M. The biology of aseptic osteolysis // *Clin Orthop Relat Res*, 2007; 460: 240.
78. Hsu S. M., Raine L., Fanger H. Use of avidin–biotin–peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAS) procedures // *J Histochem Cytochem*, 1981; 29: 577–580.
79. Hunter G. K. Role of osteopontin in modulation of hydroxyapatite formation // *Calcif Tissue Int*, 2013; 93 (4): 348–354. doi: 10.1007/s00223-013-9698-6.
80. Inazama J., Itoh N., Abe T., Nagata S. Assignment of the human Fas antigen gene (Fas) to 10q24.1 // *Genomics*, 1992; 14 (3): 821–822.
81. Ibares-Frías L., Gallego P., Cantalapiedra-Rodríguez R., et al. Tissue reaction after intrastromal corneal ring implantation in an experimental animal model // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2015; 253(7): 1071–1083. doi: 10.1007/s00417-015-2959-5.

82. Janssens W., Nuytten H., Dupont L. J., et al. Genomic copy number determines functional expression of {beta}-defensin 2 in airway epithelial cells and associates with chronic obstructive pulmonary disease // *Am J Respir Crit Care Med*, 2010; 182 (2): 163–169.
83. Jia H., Wang J., François F., et al. Molecular and cellular mechanisms of loss of residual hearing after cochlear implantation // *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2013; 122 (1): 33–39.
84. Jiang C., Li Z., Quan et al. Osteoimmunology in orthodontic tooth movement // *Oral Diseases*, 2015; 21: 694–704.
85. Jiranek W. A., Machado M., Jasty M., et al. Production of cytokines around loosened cemented acetabular components // *J Bone Jt Surg*, 1993; 75-A: 863–879.
86. Jones L. C., Frondoza C., Hungerford D. S. Effect of PMMA particles and movement on an implant interface in a canine model // *J Bone Joint Surg*, 2001; 83-B: 448–458.
87. Kamitakahara M., Ohtsuki C., Miyazaki T. Review paper: behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition // *J Biomater Appl*, 2008; 23 (3): 197–212.
88. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system // *Endocrinology*, 2001; 142 (12): 5050–5055.
89. Kiernan J. A. *Histological and histochemical methods: theory and practice.* – Bloxham, UK: Scion, 2008. – Pp. 141–174.
90. Kim J., Chung K., Choi C., et al. Silencing CCR2 in Macrophages Alleviates Adipose Tissue Inflammation and the Associated Metabolic Syndrome in Dietary Obese Mice // *Mol Ther Nucleic Acids*, 2016; 5:e280. doi: 10.1038/mtna.2015.51.
91. Kim S. B., Kim Y. J., Yoon T. L., et al. The characteristics of a hydroxyapatite-chitosan-PMMA bone cement // *Biomaterials*, 2004; 25 (26): 5715–5723.
92. Klokkevold P. R., Jovanovic S. A. *Advanced implant surgery and bone grafting techniques* // Newman, Takei, Carranza. *Carranza's clinical periodontology.* – 9th ed. – Philadelphia: W. B. Saunders, 2002. – Pp. 907–908.
93. Kokesch-Himmelreich J., Schumacher M., Rohnke M., et al. ToF-SIMS analysis of osteoblast-like cells and their mineralized extracellular matrix on strontium enriched bone cements // *Biointerphases*, 2013; 8 (1): 17. doi: 10.1186/1559-4106-8-17.
94. Kokubo T. *Bioceramics and their clinical applications.* – CRC Press, 2008. – P. 760.
95. König B., Forger S. E., Mascaro M. B., Beck T. J. Biocompatibility of the polyurethane resin of the castor bean inserted into alveolar bone of the dog // *Anat Anz*, 1999; 181: 581–584.
96. Konttinen Y. T., Lappalainen R., Laine P., et al. Immunohistochemical evaluation of inflammatory mediators in failing implants // *Int J Periodontics Restorative Dent*, 2006; 26 (2): 135.
97. Kuula H., Salo T., Pirilä E., Hagström J. et al. Human beta-defensin-1 and -2 and matrix metalloproteinase-25 and -26 expression in chronic and aggressive periodontitis and in peri-implantitis // *Arch Oral Biol*, 2008; 53 (2): 175–186.
98. Kumar A., Webster T. J., Biswas K., Basu B. Flow cytometry analysis of human fetal osteoblast fate processes on spark plasma sintered hydroxyapatite-titanium biocomposites // *J Biomed Mater Res A*, 2013; 101 (10): 2925–2938. doi: 10.1002/jbm.a.34603.
99. Kumar V., Abbas A., Fausto N. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease.* – 7th ed. – Elsevier Saunders, 2005. – P. 48.
100. Kumar V., Abbas A., Fausto N. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease.* – 7th ed. – Elsevier Saunders, 2005. – Pp. 112–116.
101. Lacey D. L., Timms E., Tan H. L., et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation // *Cell*, 1998; 93: 165–176.
102. Langhans C., Weber-Carstens S., Schmidt F., et al. Inflammation-induced acute phase response in skeletal muscle and critical illness myopathy // *PLoS One*, 2014; 9 (3): e92048. doi: 10.1371/journal.pone.0092048.
103. Launey M. E., Buehler M. J., Ritchie R. O. On the mechanistic origins of toughness in bone // *Annu Rev Mater Res*, 2010; 40: 25–53.

104. Laurencin C. T., Khan Y. Regenerative engineering. – CRC Press Taylor & Francis group, 2013. – Chapter 7. – Pp. 166–178.
105. Lavery K., Swain P., Falb D., Alaoui–Ismail M. H. BMP-2/4 and BMP6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow – derived mesenchymal stem cells // *J Biol Chem*, 2008; 283 (30): 20948–20958.
106. Lazzara R. J., Testori T., Trisi P., et al. A human histologic analysis of osseotite and machined surfaces using implants with 2 opposing surfaces // *Int J Periodontics Restorative Dent*, 1999; 19 (2): 117–129.
107. Le Geros R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates // *Clin Orthop Relat Res*, 2002; 395: 81–98.
108. Lee A. J., Hodges S., Eastell R. Measurement of osteocalcin // *Annual of Clinical Biochemistry*, 2000; 37: 432–436.
109. Lee K. W., Bae C. M., Jung J. Y., et al. Surface characteristics and biological studies of hydroxyapatite coating by a new method // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2011; 98B (2): 395–407. doi: 10.1002/jbm.b.31864; Pubmed.
110. Lee N. K., Sowa H., Hinoi E., et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton // *Cell*, 2007; 130 (3): 456–469. doi:10.1016/j.cell.2007.05.047; Pubmed.
111. Leite F. R. M., Ramalho L. T. O. Bone regeneration after demineralized bone matrix and castor oil polyurethane implantation // *J Appl Oral Sci*, 2008; 16 (2): 122–126.
112. Lentsch A. B., Ward P. A. Regulation of inflammatory vascular damage // *J Pathol*, 2000; 190: 343.
113. Li Y. S., Deng Z. H., Zeng C., Lei G. H. Role of osteopontin in osteosarcoma // *Med Oncol*, 2015; 32 (1): 449. doi: 10.1007/s12032-014-0449-y.
114. Liporace F. A., Breibart E. A., Yoon R. S., et al. The effect of locally delivered recombinant human bone morphogenetic protein-2 with hydroxyapatite / tri-calcium phosphate on the biomechanical properties of bone in diabetes-related osteoporosis // *J Orthoped Traumatol*, 2015; 16: 151–159.
115. Lombardi G., Perego S., Luzi L., Banfi G. A four-season molecule: osteocalcin. Updates in its physiological roles // *Endocrine*, 2015; 394–404.
116. Lovett D. H., Szamel M., Ryan J. L., et al. Interleukin 1 and the glomerular mesangium. I. Purification and characterization of a mesangial cell-derived autogrowth factor // *J Immunol*, 1986, 136: 3700–3705.
117. Lyritis G. P., Georgoulas T., Zafeiris G. Bone anabolic versus bone anticatabolic treatment of postmenopausal osteoporosis // *CP Ann NY Acad Sci*, 2010; 1205: 277–283.
118. Lü H. Z., Hu J. G. Expression of bone morphogenetic proteins-2/4 in neural stem cells and their and their lineages // *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2009; 69 (4): 441–447.
119. Majno G. Chronic inflammation: links with angiogenesis and wound healing // *Am J Pathol*, 1998; 153: 1035.
120. Mastronarde J. G., Monick M. M., Mukaida N., et. al. Synergism between rhinoviruses infection and oxidant pollutant exposure enhances airway epithelial cell cytokine production // *J Infect Dis*, 1998; 177: 1275–1281.
121. Matsushima K., Oppenheim J. J. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL-1 and TNF // *Cytokine*, 1989; 1 (1): 2–13.
122. Miuyazaki T., Ohtsuki C., Kyomoto M., et al. Bioactive PMMA bone cement prepared by modification with methacryloxypropyltrimethoxysilane and calcium chloride // *J Biomed Mater Res A*, 2003; 67 (4): 1447–1423.
123. Miyatake S., Hara Y., Maeda K., et al. Hydroxyapatite implant for human periodontal osseous defects // *Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi*, 1989; 31 (1): 318–326.
124. Moghadam H. G., Sándor G. K., Holmes H. H., Clokie C. M. Histomorphometric evaluation of bone regeneration using allogenic and alloplastic bone substitutes // *J Oral Maxillofac Surg*, 2004; 62 (2): 202–213.

125. Moore K. W., de Wall M. R., Coffman R. L., O'Garra A. Interleukin-10 and Interleukin-10 receptor // *Annu Rev Immunol*, 2001; 19: 683–765.
126. Mosser D., Edwards J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation // *Nature*, 2008; 8: 958–969.
127. McGuirk P., Mills K. H. G. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases // *Trends Immunol*, 2002; 23: 450–455.
128. Murata M., Akazawa T., Tazaki J., et al. Blood permeability of a novel ceramic scaffold for bone morphogenetic protein-2 // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2007; 81 (2): 469–475.
129. Nakagawa N., Kinosaki M., Yamaguchi K., et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoblast differentiation factor in osteoclastogenesis // *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; 253: 395–400.
130. Nakatsuji T., Gallo R. L. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas // *Journal of Investigative Dermatology*, 2012; 132: 887–895.
131. Nanci A. Content and distribution on noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density // *J Struct Biol*, 1999; 126: 256–269.
132. Nevins M., Camelo M., Nevins M. L., et al. Pilot clinical and histologic evaluations of a two-piece zirconia implant // *Int J Periodontics Restorative*, 2011; 31 (2): 157–163.
133. Neut D., Diercks R. L. Biomaterial-related infections in orthopaedic implants // G. Rakhorst, R. Ploeg (Eds.) *Biomaterials in modern medicine: the Groningen perspective*. – World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2008. – Pp. 169–189.
134. Nienhuijs M. E., Meijer G. J., Merckx M. A., et al. Bone substitutes, growth factors and distraction osteogenesis // *Ned Tijdschr Tandheelkd*, 2008; 115 (6): 297–304.
135. Ninomiya J. T., Struve J. A., Stelloh C. T., et al. Effects of hydroxyapatite particulate debris on the production of cytokines and proteases in human fibroblasts // *J Orthop Res*, 2001; 19 (4): 621.
136. Numerof R. P., Asadullah K. Cytokine and anti-cytokine therapies for psoriasis and atopic dermatitis // *BioDrugs*, 2006; 20 (2): 93–103.
137. Ohsawa K., Neo M., Matsuoka H., et al. Tissue responses around polymethylmethacrylate particles implanted into bone: analysis of expression of bone matrix protein mRNAs by in situ hybridization // *J Biomed Mater Res*, 2001; 15; 54 (4): 501–508.
138. Oppenheim J. J., Matsushima K., Larsen C. G., Anderson A. O. Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumor necrosis factor // *Immunology*, 1989; 68: 31–36.
139. Ostriker A., Horita H. N., Poczobutt J., et al. Vascular smooth muscle cell-derived transforming growth factor- β promotes maturation of activated, neointima lesion-like macrophages // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014; 34 (4): 877–886. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303214.
140. Pearce G., Yamaguchi Y., Munske G., Ryan C. A. Structure–activity studies of AtPep1, a plant peptide signal involved in the innate immune response // *Peptides*, 2008; 12: 2083–2089.
141. Peng Y., Martin D. A., Kenkel J., et al. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells // *Journal of Autoimmunity*, 2007; 29: 303–309.
142. Pillemer L., Blum L., Lepow I. H., et al. The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena // *Science*, 1954; 120: 279–285.
143. Pilmane M., Rumba I., Sundler F., Luts A. Patterns of occurrence and distribution of neuroendocrine elements in lungs of humans with chronic lung diseases // *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B*, 1998; 53: 144–152.
144. Podaropoulos L., Veis A. A., Papadimitriou A., et al. Bone regeneration using β -tricalcium phosphate in a calcium sulfate matrix // *J Oral Implantol*, 2009; 35 (1): 28–36.
145. Polzer K., Joosten L., Gasser J., et al. Interleukin-1 is essential for systemic inflammatory bone loss // *Ann Rheum Dis*, 2010; 69 (1): 284–290.

146. Qazi B. S., Tang K., Qazi A. Recent advances in underlying pathologies provide insight into interleukin-8 expression-mediated inflammation and angiogenesis // *International Journal of Inflammation*, 2011; (2011): 1–13. Article ID 908468.
147. Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J., Lemons J. E. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. – 3rd ed. – Elsevier, 2013. – p.xxvii.
148. Reinis A., Pilmane M., Stunda A., et al. An *in vitro* and *in vivo* study on the intensity of adhesion and colonization by *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on originally synthesized biomaterials with different chemical composition and modified surfaces and their effect on expression of TNF- α , β -defensin 2 and IL-10 in tissues // *Medicina*, 2011; 47 (10): 560–565.
149. Robey P. G., Fedarko N. S., Hefferan T. E., et al. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins // *J Bone Miner Res*, 1993; 8: 483–487.
150. Roldán J. C., Detsch R., Scafer S., et al. Bone formation and degradation of a high porous biphasic calcium phosphate ceramic in presence of BMP-7, VEGF and mesenchymal stem cells in a ectopic mouse model // *J Craniomaxillofac Surg*, 2010; 38 (6): 423–430.
151. Roodman G. D. Role of stromal-derived cytokines and growth factors in bone metastasis // *Cancer*, 2003; 97: 733–738.
152. Rosenthal G. J., Germolec D. R., Blazka M. E., et al. Asbestos stimulates IL-8 production from human lung epithelial cells // *J Immunology*, 1994; 153 (7): 3237–3244.
153. Ruckh T. T., Carroll D. A., Weaver J. R., Popat K. C. Mineralization content alters osteogenic responses of bone marrow stromal cells on hydroxyapatite / polycaprolactone composite nanofiber scaffolds // *J Funct Biomater*, 2012; 3 (4): 776–798.
154. Ruhé P. Q., Kroese-Deutman H. C., Wolke J. G., et al. Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants in cranial defects in rabbits // *Biomaterials*, 2004; 25 (11): 2123–2132.
155. Rui Y. F., Du L., Wang Y., et al. Bone morphogenetic protein 2 promotes transforming growth factor β 3-induced chondrogenesis of human osteoarthritic synovium-derived stem cells // *Chin Med J*, 2010; 123 (21): 3040–3048.
156. Ryan J. J., Kashyap M., Bailey D. Mast cell homeostasis: a fundamental aspect of allergic disease // *Crit Rev Immunol*, 2007; 27: 15–32.
157. Saito N., Murakami N., Takahashi J., et al. Synthetic biodegradable polymers as drug delivery systems for bone morphogenetic proteins // *Adv Drug Deliv Rev*, 2005; 57: 1037–1048.
158. Saitoh M., Abiko Y., Shimabukuro S. Correlated expression of human beta defensin-1, -2, -3 mRNAs in gingival tissues of young children // *Arch Oral Biol*, 2004; 49 (10): 799–803.
159. Salma I., Pilmane M., Skagers A., et al. Early morphofunctional response of contact tissue after intraoral implantation in rabbit jaw of pure synthetic hydroxyapatite (Hap) bioceramic materials and Hap saturated with lidocaine // *Stomatologija*, 2009; 11 (4): 113–118.
160. Santarelli A., Mascitti M., Orsini G., et al. Osteopontin, osteocalcin and OB-cadherin expression in synthetic nanohydroxyapatite vs bovine hydroxyapatite cultured Osteoblastic-like cells // *J Biol Regul Homeost Agents*, 2014; 28 (3): 523–529.
161. Sarfati J. Bone building: perfect protein // *Journal of Creation*, 2004; 18 (1): 11–12.
162. Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation // *J Leukoc Biol*, 1997; 61: 375–380.
163. Savil J., Dransfield I., Gregory C., et al. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses // *Nature Reviews in Immunology*, 2000; 2: 965–975.
164. Scatena M., Liaw L., Giachelli C. M. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007; 27 (11): 2302–2309.
165. Schierano G., Canuto R. A., Navone R., et al. Biological factors involved in the osseointegration of oral titanium implants with different surfaces: a pilot study in minipigs // *J Periodontol*, 2005; 76 (10): 1710–1715.
166. Schmidt C., Steinbach G., Decking R., et al. IL-6 and PGE2 release by human osteoblasts on implant materials // *Biomaterials*, 2003; 24 (23): 4191.

167. Schminke B., Vom Orde F., Gruber R., et al. The pathology of bone tissue during peri-implantitis // *J Dent Res*, 2015; 94 (2): 354–361. doi: 10.1177/0022034514559128.
168. Sedlak T. W., Oltvai Z. N., Yang E., et al. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax // *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92 (17): 7834–7838.
169. Shaposhnikov J. G. *Traumatology and orthopedy*. – Moscow: Medicine, 1997. – Pp. 64–81.
170. Shen H. M., Pervaiz S. TNF receptor superfamily-induced cell death: redox dependent execution // *FASEB J*, 2006; 20 (10): 1589–1598.
171. Shepherd J. H., Best S. M. Calcium phosphates scaffolds for bone repair // *JOM*, 2011; 63 (4): 83–92.
172. Shi D. *Introduction to biomaterials*. – Tsinghua: University Press, 2006. – Pp. 253.
173. Shi Z., Huang X., Cai Y., et al. Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells // *Acta Biomater*, 2009; 5 (1): 338–345. doi: 10.1016/j.actbio.2008.07.023.
174. Simonet W. S., Lacey D. L., Dunstan C. R., et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density // *Cell*, 1997; 89 (2): 309–319.
175. Slutski L. I., Vetra J. J. Biocompatibility and reactogenicity of materials: a semantic and logical analysis of definitions and their practical significance // *Cells and Materials*, 1996, 6 (1-3): 137–142.
176. Sodek J., Ganss B., McKee M. D. Osteopontin // *Crit Rev Oral Biol Med*, 2000; 11 (3): 279–303.
177. Sonofuchi K., Hagiwara Y., Koizumi Y., et al. Quantitative in vivo biocompatibility of new ultralow-nickel cobalt-chromium-molybdenum alloys // *J Orthop Res*, 2016; doi: 10.1002/jor.23150.
178. Svensson S., Trobos M., Hoffman M., et al. A novel soft tissue model for biomaterial-associated infection and inflammation – bacteriological, morphological and molecular observations // *Biomaterials*, 2015; 41: 106–121. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.11.032.
179. Szebeni J., Barenholz Y. *Handbook of harnessing biomaterials in nanomedicine: preparation, toxicity and application*. – Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., 2012. – P. 311.
180. Talmadge K. Vertebral compression fracture treatments // S. M. Kurtz, A. A. Edidin (Eds.). *Spine technology handbook*. – Elsevier Academic Press, 2006. – Pp. 371–396.
181. Theodore J. Y., Tallquist M. D., Aicher A., et al. Osteoprotegerin, a crucial regulator of bone metabolism, also regulates B cell development and function 1 // *The Journal of Immunology*, 2001; (166) 3: 1482–1491.
182. Thomma B. P., Cammue B. P., Thevissen K. Plant defensins // *Planta*, 2002; 216 (2): 193–202.
183. Tobin G., Luts A., Sundler F., Ekström J. Peptidergic innervation of the major salivary glands of the ferret // *Peptides*, 1990; 11: 863–867.
184. Tracey K. J., Vlassara H., Cerani A. Peptide regulatory factors. Cachectin / tumor necrosis factor // *Lancet*, 1989; 1: 1122–1125.
185. Trampuz A., Zimmerli W. Prosthetic joint infections: up-date in diagnosis and treatment // *Swiss Med Wkly*, 2005; 135: 243–351.
186. Tremollieres F., Ribot C. Bone mineral density and prediction of non-osteoporotic disease // *Maturitas*, 2010; 65 (4): 348–351.
187. Trump B. F. Cell injury and cell death: apoptosis, oncosis, and necrosis // Acosta D. (Ed.) *Cardiovascular toxicology*. – 3rd ed. – London and New York: Taylor & Francis, 2001. – P. 105.
188. Tsai W. C., Liao C. J., Wu C. T., et al. Clinical result of sintered bovine hydroxyapatite bone substitute: analysis of the interface reaction between tissue and bone substitute // *J Orthop Sci*, 2010; 15 (2): 223–232.
189. Tseng W. P., Yang S. N., Lai C. H., Tang C. H. Hypoxia induces BMP-2 expression via ILK, Akt, mTOR, and HIF-1 pathways in osteoblasts // *J Cell Physiol*, 2010; 223 (3): 810–818.

190. Varoga D., Tohidnezhad M., Paulsen F., et al. The role of human beta-defensin-2 in bone // *J Anat*, 2008; 213 (6): 749–757.
191. Veerayutthwilai O., Byers M. R., Pham T. T., et al. Differential regulation of immune responses by odontoblasts // *Oral Microbiol Immunol*, 2007; 22 (1): 5–13.
192. Veis A. A., Papadimitriou S., Trisi P., et al. Osseointegration of osseotite and machined-surfaced titanium implants in membrane-covered critical-sized defects: a histologic and histometric study in dogs // *Clin Oral Implants Res*, 2007; 18 (2): 153–160.
193. Velard F., Braux J., Amedees J., Laquerriere P. Inflammatory cell response to calcium phosphate biomaterial particles: an overview // *Acta Biomater*, 2013; 9 (2): 4956–4963. doi: 10.1016/j.actbio.2012.09.035.
194. Verron I., Khairoun J., Bouler J. M. Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review // *Drug Discovery Today*, 2010; 15: 547–552.
195. Vij N., Sharma A., Thakkar M., et al. PDGF-driven proliferation, migration, and IL8 chemokine secretion in human corneal fibroblasts involve JAK2-STAT3 signaling pathway // *Molecular Vision*, 2008; 14: 1020–1027.
196. Vordenbäumen S., Pilic D., Otte J. M., et al. Defensin-mRNA expression in the upper gastrointestinal tract is modulated in children with celiac disease and *Helicobacter pylori*-positive gastritis // *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2010; 50 (6): 596–600.
197. Xu Z., Liu C., Wei J., Sun J. Effects of four types of hydroxyapatite nanoparticles with different nanocrystal morphologies and sizes on apoptosis in rat osteoblasts // *J Appl Toxicol*, 2012; 32 (6): 429–435. doi: 10.1002/jat.1745.
198. Yamada S., Heymann D., Bouler J. M., Daculsi G. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite, β -tricalcium phosphate ratios // *Biomaterials*, 1997; 18: 1037–1041.
199. Yamaguchi K., Anderson J. M. Biocompatibility studies of naltrexone sustained release formulations // *J Controlled Rel*, 1992; 19: 299–314.
200. Yang J. H., Kim H. J., Kim S. E., et al. The effect of bone morphogenetic protein-2-coated tricalcium phosphate/hydroxyapatite on new bone formation in a rat model of femoral distraction osteogenesis // *Cytotherapy*, 2012; 14 (3): 315–326. doi: 10.3109/14653249.2011.630728. Epub 2011 Nov 28.
201. Yang R. N., Ye F., Cheng L. J., et al. Osteoinduction by Ca-P biomaterials implanted into the muscles of mice // *J Zhejiang Univ Sci B*, 2011; 12 (7): 582–590.
202. Young M. F. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis // *Osteoporos Int*, 2003; 14: 35–42.
203. Yu Y. Y., Lieu S., Lu C., Colnot C. Bone morphogenetic protein 2 stimulates endochondral ossification by regulating periosteal cell fate during bone repair // *Bone*, 2010; 47 (1): 65–73.
204. Yun T. J., Chaudhary P. M., Shu G. L., et al. OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40 // *J Immunol*, 1998; 161 (11): 6113–6121.
205. Wang H. L., Garaicoa-Pazmino C., Collins A. et al. Protein biomarkers and microbial profiles in peri-implantitis // *Clin Oral Implants Res*, 2015. doi: 10.1111/clr.12708.
206. Wang P., Wu P., Siegel M. I. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor κ B (NF κ B) activation in human monocytes // *J Bio Chem*, 1995; 270: 9558–9563.
207. Warnke P. H., Voss E., Russo P. A., et al. Antimicrobial peptide coating of dental implants: biocompatibility assessment of recombinant human beta defensin-2 for human cells // *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2013; 28 (4): 982–988. doi: 10.11607/jomi.2594.
208. Webb S. J., Harrison D. J., Wyllie A. H. Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease // *Adv Pharmacol*, 1997; 41: 1–34.
209. Wilsson A., Lind S., Ohman L., et al. Apoptotic neutrophils containing *Staphylococcus epidermidis* stimulate macrophages to release the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-

alpha and interleukin-6 // *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2008; 53(1):126-35. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00412.x.

210. Wolff B., Burns A. R., Middleton J., Rot A. Endothelial cell “memory” of inflammatory stimulation: human venular endothelial cells store interleukin 8 in Weibel-Palade bodies // *J Exp Med*, 1998; 188 (9): 1757–1762. doi:10.1084/jem.188.9.1757.

211. Zambonin G., Colucci S., Cantatore F., Grano M. Response of human osteoblasts to polymethylmetacrylate in vitro // *Calcif Tissue Int*, 1998; 62 (4): 362–365.

212. Zhang Y., Zhang J., Korff S., et al. Delayed neutralization of interleukin 6 reduces organ injury, selectively suppresses inflammatory mediator, and partially normalizes immune dysfunction following trauma and hemorrhagic shock // *Shock*, 2014; 42 (3): 218–227.

213. Zheng B. L., Mingchao W., Cheng Y., Adekunle O. Molecular dynamics simulation of mechanical behavior of osteopontin-hydroxyapatite interfaces // *J Mechan Beh Biomed Mater*, 2014; 36: 12–20.

214. Zhou X., Schmidtke P., Zepp F., Meyer C. U. Boosting interleukin-10 production: therapeutic effects and mechanisms // *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 2005; 5 (4): 465–475.

8. PUBLIKĀCIJAS UN PREZENTĀCIJAS PAR PĒTĪJUMA TĒMU

Zinātniskie raksti

1. **Vamze J.**, Pilmane M., Skagers A. Biocompatibility of pure and mixed hydroxyapatite and α -tricalcium phosphate implanted in rabbit bone // J Mater Sci: Mater Med, 2015; 26:73. doi: 10.1007/s10856-015-5406-6.
2. **Vamze J.**, Pilmane M., Skaģers A., Šalms Ģ., Irbe Z. Kaula morfoģenētiskā proteīna, osteoproteģerīna, osteopontīna, osteokalcīna ekspresija truša apakšģokģa un stilba kaulaudos pģc daģģadu biokeramikas materiģlu implantģcijas // RSU Zinģtnisko rakstu krģģjums, 2012; 119–128.
3. **Vamze J.**, Pilmane M., Skagers A. Activity of host defense proteins in rabbit bone after pure hydroxyapatite and tricalcium phosphate and mixed tricalcium phosphate/hydroxyapatite implantation // IFMBE Proceedings, 2012; 38: 110–112.
4. **Vamze J.**, Pilmane M., Skagers A. Cytokine and HBD-2, -3, -4 expression in rabbit bone tissue after hydroxyapatite (Hap), α -tricalcium phosphate (α -TCP) and polymethylmetacrylate (PMMA) implantation // FMNT issue of IOP conference series: Material Sciences and Engineering, 2012; 38: 012025. doi: 10.1088/1757-899X/38/1/012025.
5. **Vamze J.**, Pilmane M., Skaģers A. Kaulaudu reģeneratģvo procesu noteicoģo proteģnu izmaiņas truša apakģģokģa kaulģ pģc HAp (hidroksiapatģta) implanta // RSU Zinģtnisko rakstu krģģjums, 2011; 167–174.

Starptautisko zinģtnisko konferenģu tģzes

1. **Vamze-Liepina J.**, Pilmane M., Skagers A., Salms G., Loca D. Characteristic of osteopontin, osteocalcin and osteoproteģerin expression in rabbit bone tissue after the implantation of hydroxyapatite-containing biomaterials // Abstract book: p. 191; International Conference on Functional Materials and Nanotechnologies, October 5–8, 2015, Vilnius, Lithuania.
2. **Vamze J.**, Pilmane M., Skagers A. Analysis of cellular death in the experimental bone tissue regarding the biomaterial implantation // Annals of Anatomy, 2014; 196 (S1): 88–89; 18th Congress of International Federation of Associations of Anatomists/30th Congress of Chinese Society of Anatomical Science, August 6–8, 2014, Beijing, China.
3. **Vamze J.**, Pilmane M., Skagers A. Bone tissue morphological characteristic by using routine investigation methods and Exact grunding system after the implantation of

various bioceramic materials // Abstract book: p. 53; Baltic Morphology VII Scientific Conference November 07–09, 2013, Riga, Latvia.

4. **Vamze J.**, Pilmane M., Skagers A. Bone regeneration and host defense in rabbit bone after the implantation of pure and mixed hydroxyapatite and tricalcium phosphate // Virchows Archiv, 2013; p. 323; Congress of European Society of Pathology, August 31–September 4, 2013, Lisbon, Portugal.
5. **Vamze J.**, Pilmane M., Skagers A. Expression of bone regeneration proteins in rabbit bone tissue after the implantation of various bioceramic materials // Abstract book: p. 29.; International Symposium on Bioceramics and Cells for Reinforcement of Bone, October 18–20, 2012, Riga, Latvia.
6. **Vamze J.**, Pilmane M., Skagers A. Activity of host defense proteins in rabbit bone after pure hydroxyapatite and tricalcium phosphate and mixed tricalcium phosphate/hydroxyapatite implantation // Scientific programm book: p. 35; International Symposium on Biomedical Engineering and Medical Physics, October 10–12, 2012, Riga, Latvia.
7. **Vamze J.**, Pilmane M., Skagers A. Bone regeneration and implantation of hydroxyapatite and tricalcium phosphate [poster presentation] // e-Abstract book, abstract No. 160; PER/IADR International Congress, September 12–15, 2012, Helsinki (Finland).
8. **Vamze J.**, Pilmane M., Skagers A. Expression of interleukins and defensins in the experimental rabbit bone tissue after implantation of different biomaterials // Abstract book: p. 175; International Conference on Functional Materials and Nanotechnologies, April 17–20, 2012, Riga, Latvia.
9. **Vamze J.**, Pilmane M., Skagers A. Changes of regeneration ruling factors in rabbits lower jaw bone and surrounding soft tissue after hydroxyapatite implantation // Abstract book: p. 60; 6th Conference of Baltic Morphology, September 21–24, 2011, Tartu, Estonia.

Vietējo zinātnisko konferenču tēzes

1. **Vamze J.**, Pilmane M., Skaģers A. Apoptozes raksturojums truša kaulaudos pēc dažādu biomateriālu implantācijas // Tēžu grāmata: 325. lpp.; Rīgas Stradiņa universitātes zinātniskā konference, 10.–11.04.2014., Rīga, Latvija.
2. **Vamze J.**, Pilmane M., Skaģers A. Audu reaktogenitātes analīze trušu apakšžokļa kaulā pēc “tīra” un jaukta hidroksiapatīta un α -trikalcija fosfāta implantācijas // tēzes

- elektroniski [www.arstubiedriba.lv]; Latvijas ārstu 7. kongress, 19.–20.09.2013., Rīga, Latvija.
3. **J.Vamze**, Pilmane M., Skaģers A. Kaulaudu reģeneratīvo funkciju un hidroksiapatīta un trikalcija fosfāta implantātu mijiedarbība // Tēžu grāmata: 295. lpp.; Rīgas Stradiņa universitātes zinātniskā konference, 21.–22.03.2013., Rīga, Latvija.
 4. **Vamze J.**, Pilmane M., Skaģers A., Šalms Ģ., Irbe Z. Kaula morfoģenētiskā proteīna, osteoproteģerīna, osteopontīna, osteokalcīna ekspresija truša apakšžokļa un stilba kaulaudos pēc dažādu biokeramikas materiālu implantācijas // Tēžu grāmata: 299. lpp.; Rīgas Stradiņa universitātes 11. zinātniskā konference, 29.–30.03.2012.
 5. **Vamze J.**, Pilmane M. Kaulaudu reģeneratīvo procesu noteicošo faktoru izmaiņas truša apakšžokļa kaulā pēc HAp (hidroksiapatīta) implanta // Tēžu grāmata: 330. lpp.; Rīgas Stradiņa universitātes 10. zinātniskā konference, 14.–15.04.2011., Rīga, Latvija.

Prezentācijas starptautiskās un vietējās konferencēs

1. **Vamze-Liepina J.**, Pilmane M., Skagers A., Salms G., Loca D. Characteristic of osteopontin, osteocalcin and osteoprotegerin expression in rabbit bone tissue after the implantation of hydroxyapatite-containing biomaterials [poster presentation] // International Conference on Functional Materials and Nanotechnologies, October 5–8, 2015, Vilnius, Lithuania.
2. **Vamze J.**, Pilmane M., Skagers A. Analysis of cellular death in the experimental bone tissue regarding the biomaterial implantation [oral presentation] // 18th Congress of International Federation of Associations of Anatomists/30th Congress of Chinese Society of Anatomical Science, August 6–8, 2014, Beijing, China.
3. **Vamze J.**, Pilmane M., Skaģers A. Apoptozes raksturojums truša kaulaudos pēc dažādu biomateriālu implantācijas [stenda prezentācija] // RSU 13. zinātniskā konference, 10.–11.04.2014., Rīga, Latvia.
4. **Vamze J.**, Pilmane M., Skagers A. Bone tissue morphological characteristic by using routine investigation methods and Exact grunding system after the implantation of various bioceramic materials [poster presentation] // Baltic Morphology VII Scientific Conference November 07–09, 2013, Riga, Latvia.
5. **Vamze J.**, Pilmane M., Skaģers A. Audu reaktogenitātes analīze trušu apakšžokļa kaulā pēc “tīra” un jaukta hidroksiapatīta un α -trikalcija fosfāta implantācijas [stenda prezentācija] // Latvijas ārstu 7. kongress, 19.–20.09.2013., Rīga, Latvija.

PATEICĪBAS

Ar dziļu cieņu vislielākā pateicība *Dr. med., Dr. habil. med.*, profesorei Mārai Pilmanei par ieguldīto laiku, pacietību, atbalstu, sniegtajiem padomiem un ieteikumiem mana promocijas darba tapšanā.

Pateicos *Dr. med., Dr. habil. med.*, profesoram Andrejam Skaģeram par atbalstu un padomiem mana promocijas darba tapšanā.

Pateicos Rīgas Stradiņa universitātei par iespēju studēt doktorantūrā un papildināt savas zināšanas, par finansiālu atbalstu dalībai starptautiskās konferencēs.

Paldies Doktorantūras nodaļas biroja darbiniecēm par atsaucību un vienmēr savlaicīgi sniegto informāciju.

Paldies RSU docentam Renāram Ertam par padomiem un palīdzību statistisko datu apstrādē un noformēšanā.

Paldies RSU Anatomijas un antropoloģijas institūta darbiniekiem, sastaptajiem gan agrās rīta, gan vakara stundās, par atsaucību un sirsnību. Īpašs paldies institūta Morfoloģijas laboratorijas laborantei Natālijai Morozai un institūta biroja vadītājai Elitai Jakovickai.

Paldies Rīgas Tehniskās universitātes Rūdolfa Cimdiņa Rīgas biomateriālu inovāciju un attīstības centra speciālistiem par padomiem.

Paldies Valsts Tiesu medicīnas ekspertīzes centra vadībai un kolēģiem, īpaši – asoc. prof. Ojāram Teterim par sapratni un atbalstu.

Vissirsnīgākais paldies un pateicība maniem vecākiem un manai ģimenei par beznosacījumu mīlestību, sapratni, atbalstu un rūpēm.

PIELIKUMI



**PĀRTIKAS UN VETERINĀRĀ DIENESTA ATĻAUJA Nr. 24
EKSPERIMENTAM AR DZĪVNIEKIEM**

02.07.2010.

Izsniegta eksperimenta dzīvnieku izmantošanas uzņēmumam

Rīgas Stradiņa universitātes Mutes, sejas un žokļu ķirurģijas katedrai,
Dzirciema iela 20, Rīga, LV 1007

Eksperimenta nosaukums:

„Kaulaudus aizvietojošo sintētisku kalcija fosfāta biokeramikas biomateriālu reaktogenitāte pēc implantācijas eksperimentālu dzīvnieku audos, biomateriālu minimālās inficējošās devas, mikrobiālās kontaminācijas riska un tā ietekmes uz kontaktējošo audu atbildes reakciju noteikšana”

Mērķis

- 1) Pielietojot histoloģijas, histokīmijas un imūnhistokīmijas metodes biomateriālu kontaktaudos noteikt: iekaisuma reakciju; antimikrobo peptīdu imūnreaktivitāti; audu šoka proteīnu Hsp-70 un šūnu apoptozi.
- 2) Pielietojot mikrobioloģijas metodes, noteikt biomateriāla minimālo inficējošo devu biomateriālu paraugiem ar un bez medikamentozā pildījuma.

Eksperimentā izmantojamie dzīvnieki

24 truši

Eksperimenta norises vieta

RSU Eksperimentālo dzīvnieku laboratorija, Hipokrāta ielā 2

Eksperimenta norises laiks

2010.gada 1.jūlijs - 2012. gada 30.novembris

Eksperimenta vadītājs

Dr.habil.med., profesors Andrejs Skaģers

Generāldirektora pienākumu
izpildītāja

V.Zalcmane

