



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Māris Gržibovskis

SIGNĀLMOLEKULU
KVANTITATĪVAIS NOVĒRTĒJUMS
DAŽĀDA VECUMA CILVĒKU
INTERRADIKULĀRĀS SEPTAS AUDOS

Promocijas darba kopsavilkums
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – ortodontija

Rīga, 2015

Promocijas darbs izstrādāts:

Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūtā,
Rīgas Stradiņa universitātes Stomatoloģijas institūtā

Darba zinātniska vadītājas:

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

Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūts,
Latvija

Dr. med. profesore **Ilga Urtāne**,

Rīgas Stradiņa universitātes Stomatoloģijas institūts, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. habil. med. profesore **Ingrīda Čēma**,

Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. asociētais profesors **Arnis Mugurēvičs**,

Latvijas Lauksaimniecības universitāte

Dr. med. asociētais profesors **Antanas Šidlauskas**,

Lietuvas Veselības Zinātņu universitāte

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2015. gada 22. maijā plkst. 15.00
Rīgas Stradiņa universitātes Medicīnas promocijas padomes atklātā
sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU mājas lapā:
www.rsu.lv



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



Promocijas darbs izstrādāts ar ESF līdzfinansēta projekta
“Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā
grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē”, vienošanās
Nr. 2009/0147/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/009, atbalstu.

Promocijas padomes sekretāre:

Dr. habil. med. profesore **Ingrīda Čēma**

SATURS

Darbā lietotie saīsinājumi	5
1. Pētījuma aktualitāte	7
2. Darba mērķis.....	11
3. Darba uzdevumi.....	11
4. Darba novitāte.....	12
5. Materiāls un metodes.....	13
5.1. Pētījuma grupa	13
5.2. Morfoloģisko pētījumu metodes	14
5.2.1. Materiāla fiksācija un sagatavošana.....	15
5.2.2. Preparātu krāsošana ar hematoksilīnu un eozīnu	15
5.2.3. Biotīna-streptavidīna imūnhistoķīmiskā metode	16
5.3. TUNEL metode apoptozes noteikšanai	17
5.4. Semikvantitatīvo datu konvertācija	18
5.5. Datu apstrādes statistiskās metodes.....	19
6. Rezultāti.....	21
6.1. Pacientu raksturojums	21
6.2. Rutīnas histoloģiskā atrade	24
6.3. Imūnhistoķīmijas atrades: OPG	25
6.3.1. Matrices metālproteināze 8 (MMP8).....	26
6.3.2. Matrices metālproteināze 9 (MMP9).....	27
6.3.3. Nukleārais kapa faktors B105 jeb RANKL	29
6.3.4. Osteokalcīns (OC)	30
6.3.5. Transformējošais augšanas faktors β (TGF β).....	31
6.3.6. Fibroblastu augšanas faktora receptors 1 (FGFR1)	32
6.3.7. Bāziskais fibroblastu augšanas faktors (bFGF)	34
6.3.8. Interleikīns 6 (IL6).....	35
6.4. Apoptozes raksturojums.....	36

6.5. Diagnozes un bFGF savstarpējā korelācija	38
6.5.1. Dažādu faktoru relatīvā daudzuma savstarpējās korelācijas ...	38
7. Diskusija	45
7.1. Morfoloģiskās izmaiņas audos	46
7.2. Augšanas faktori	46
7.3. Kaula ekstracelulārās matricas proteīni	48
7.4. Matricas metālproteināzes	48
7.5. Citokīni	49
7.6. Kaula starpšūnu telpas funkcionālie proteīni	50
7.7. Apoptoze kaulaudos un PDS	52
8. Kopsavilkums	53
9. Secinājumi	54
10. Darbā izmantotā literatūra	55
11. Publikācijas un prezentācijas par pētījuma tēmu	60
12. Pateicības	62

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

Saīsinājums	Angliskais nosaukums	Latviskais skaidrojums
ANOVA	analysis of variance	dispersiju analīze
BMP	bone morphogenetic protein	kaula morfoģenētiskais proteīns
BMP2/4	bone morphogenetic protein 2/4	kaula morfoģenētiskais proteīns 2/4
CSF	colony stimulating factor	koloniju stimulējošais faktors
ECM	extracellular matrix	ekstracelulārā matrice
IL	interleukin	interleikīns
FACIT	fibril associated collagens with interrupted triple helices	fibrilu saistītais kolagēns ar pārtrauktām trīskāršām spirālēm
bFGF	base fibroblast growth factor	bāziskais fibroblastu augšanas faktors
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	fibroblastu augšanas faktora receptors 1
GF	growth factor	augšanas faktors
LDL	low density lipoproteins	zema blīvuma lipoproteīni
IGF	insuline-like growth factor	insulīnam līdzīgais augšanas faktors
MMP	matrix metalloproteinase	matrices metālproteināze
NF-κB	nuclear factor-kappa B	nukleārais faktors kapā B
OC	osteocalcin	osteokalcīns
OPG	osteoprotegerin	osteoproteģerīns
p	statistical significance	būtiskuma (nozīmības) līmenis – varbūtība, kas ir spēkā statistiskajā testā, izvirzītā nulles hipotēze
PDS	periodontal ligaments	periodonta saites
RANK	receptor activator of NF-kappaB	NF-kappa B receptora aktivators
RANKL	receptor activator of NF-kappaB ligand	NF-kappa B liganda receptora aktivators
TGFβ	transforming growth factor β	transformējošais augšanas faktors β

TIMP	tissue inhibitor of matrix metalloproteinase	matrices metālproteināzes inhibitors
TNF- α	tumor necrosis factor α	tumora nekrozes faktors α
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick – end labeling	Tdt – gala dezoksinukleotīdtransferāze un digoksigēna marķēti nukleotīdi
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaskulārais endoteliālais augšanas faktors

1. PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE

Zobiem pārvietojoties vai fizioloģiski migrējot, apkārtējo un iesaistīto audu reakcija ir salīdzinoši vienāda. Tomēr, pārvietojot zobus ortodontiski, šīs reakcijas ātrums ir lielāks, apkārt esošo audu pārbūve un kaula remodelācija notiek ievērojami ātrāk, jo ortodontiski pieliktais spēks ir liels un gandrīz nepārtraukts. Zināšanas par procesiem, kas notiek audos un to struktūrās, vēl joprojām nav pilnīgi izpētītas (Graber, 2005). Parādotes jaunām metodēm, ir iespējams dziļāk izpētīt notiekošos procesus un ielūkoties to darbības mehānismos molekulārā līmenī. Dentofaciālās anomālijas rada pacientam funkcionālus, estētiskus un psiholoģiskus traucējumus. Kauls kā orgāns atrodas nepārtrauktā remodelācijas procesā, pateicoties savstarpējai osteoblastu un osteoklastu mijiedarbībai. Piedaloties arī saistaudu šūnām, tiek nodrošināta šī procesa nepārtrauktība. Tāpēc arī apoptozei ir ļoti liela nozīme, jo, lai būtu vieta kaut kam jaunam, vecajam šī vieta ir jāatbrīvo. Apoptoze kā šūnas fizioloģiski ieprogrammētā nāve ir universāls, dabas izveidots mehānisms, kas normālos apstākļos darbojas nevainojami.

Ortodontiska ārstēšana ir kombinēts un bieži arī interdisciplinārs process, it īpaši, ārstējot jau pieaugušus pacientus. Tas sastāv no ortodontiskās ārstēšanas ar fiksētām brekešu sistēmām un dažreiz arī no periodontoloģiskas, protētiskas un ķirurģiskas ārstēšanas. Ortodontisko ārstēšanu parasti uzsāk 12–14 gadu vecumā, kad ir izveidojies pastāvīgais sakodiens. Zēniem un meitenēm šajā vecumā var atšķirties sakodiena attīstības fāze. Tas ir saistīts ar pubertātes vecuma, kas zēniem variē no 11,5 līdz 12,5 gadiem un meitenēm no 10,5 līdz 11,5 gadiem, sasniegšanu (Proffit, 2007).

Ortodontiskai ārstēšanai nav vecuma ierobežojuma, ja nav citu risku vai faktoru, kas var ietekmēt ārstēšanas iznākumu, bet līdz ar vecumu pieaug ārstēšanas ilgums, kam var būt saistība ar remodelācijas procesā iesaistītiem faktoriem, to daudzumu un aktivitāti.

Augšanas faktoru, kaula ekstracelulārās matricas proteīnu, deģenerācijas enzīmu un apoptozes noteikšana kaulaudos un tiem piegulošajos mīkstajos audos dotu papildu informāciju par remodelācijas procesā iesaistītiem proteīniem un pacientu individuālo kaula struktūru morfoģenēzi.

Augšanas faktoru, kaula ekstracelulārās matricē proteīnu, deģenerācijas enzīmu un apoptozes noteikšana kaulaudos un tiem piegulošos mīkstajos audos dotu papildu informāciju par remodelācijas procesā iesaistītām vielām un pacientu individuālo kaula struktūru morfoģenēzi.

Adaptētā bioloģiskā atbilde pieliktajam ortodontiskajam spēkam ir ļoti sarežģīts process. Vairākas savstarpēji cieši saistītas reakcijas, kas notiek PDS un alveolārā kaula šūnās, transformē mehānisko spēku molekulāros signālos un nodrošina ortodontisko zobu pārvietošanu. Osteoklasti un osteoblasti ir spējīgi atjaunot homeostāzi, ko ir izraisījis zobiem pieliktais spēks.

Kaula adaptācija ortodontiskiem spēkiem ir atkarīga no normāli funkcionējošiem gēniem osteoklastos un osteoblastos, kas nodrošina nepieciešamo proteīnu sintēzi pareizā vietā un laikā.

Mūsdienu pierādījumi liecina, ka mehāniskā transdukcija sākas no fokālās piestiprināšanās vietas, kas saista ekstracelulāro matrici ar citoskeletu. Mehāniski inducētā remodelācija tiek realizēta, pateicoties vairākiem atgriezeniskās saites principa mehānismiem, kuri ietver citokīnu IL-1, IL-6, osteoblastu un fibroblastu priekšteču sintezētā nukleārā faktora κ B liganda receptora aktivatora (RANKL) sintēzi. Sintēzi regulē autokrīna un parakrīna transkripcijas faktoru ekspresija, t.i., citokīni, augšanas faktori, enzīmi un molekulas, kuras ir iesaistītas mezenhimālo un citu šūnu diferenciācijā, proliferācijā un funkcijā (*Masella, 2006*).

Ortodontiska zobu pārvietošana ir atkarīga no pieliktā spēka lieluma, virziena un ilguma (*Tanne, 1989*). No mehānikas viedokļa pirmā reakcija uz ortodontiskiem spēkiem ir PDS bojājums un apkārt esošā alveolārā kaula spiediena un vilkšanas vietai pieliktā spēka izraisīts bojājums. Tas izraisa zoba intraalveolāro pārvietošanos un apkārt esošā alveolārā kaula liekšanos (*Cattaneo, 2005*).

Dažāda pacientu audu bioloģiskā atbilde uz mehānisko kairinājumu ir tieši atkarīga no to PDS un alveolārā kaula šūnu populācijas, genoma un sintezētajiem proteīniem. Tikai panākot precīzu iedarbību uz mērķa gēniem, šūnām un audiem, iespējams veicināt drošu un efektīvu gēnu inženierijas un cilmes šūnu vadīto audu augšanas ieviešanu (*Malcolm, 2006*).

Ortodontiskas ārstēšanas laikā sākuma izmaiņas periodonta audos spiediena pusē tiek iedalītas sākuma (hialinizācijas) un sekundārajā (kaula resorbcijas) fāzē.

Hialinizācijas pakāpe ir atkarīga no pieliktā spēka. Tāpēc lieli spēki izraisa kaula nekrozi un plašu hialinizācijas zonu, kas ir atdalīta no nekrotiskās, jo satur jaunveidotas šķiedras un asins kapilārus. Molekulārie mehānismi, kas atšķir hialinizētos audus no nekrotiskiem, līdz galam nav skaidri, bet, iespējams, ka tie nosaka šūnas apoptozes un nekrozes pārmaiņas. Daži pētījumi pierāda, ka apoptotiskie osteocīti, kas atrodas blakus hialinizētām periodonta saitēm, iniciālas zobu pārvietošanas laikā uzrāda nekrozei līdzīgas īpašības (Hayama et al., 2002). Tādējādi šūnu nāve ir nozīmīgs bioloģisks process, kas notiek periodontālo audu remodelācijas un ortodontiskas zobu pārvietošanas rezultātā.

Lai pētītu vilkšanas spēka efektu uz gēnu ekspresiju gan mRNS, gan olbaltumu līmenī, kā arī lai atsevišķi izpētītu vidējās un vēlīnās darbības gēnus, plaši tiek izmantotas mākslīgi audzētas cilvēka PDS šūnas. Rezultāti ir atkarīgi no šūnu stāvokļa, pieliktā spēka veida (pārtrauktais spēks, cikliskais un ilgstošais spēks), ilguma un šūnu kultūras. Piemēram, ir ziņots, ka cikliskā slodze gan stimulē (Saito et al., 1991; Shimizu et al., 1997), gan nomāc (Long et al., 2001) IL-1 β aktivitāti PDS šūnās. Kamēr ilgstošie vilkšanas spēki, kas tiek pielikti PDS šūnām, stimulē MMP-1 (kolagenāze-1), MMP-2 (želatināze-A), TIMP-1 un TIMP-2 sintēzi (Bocato-Bellemin et al., 2000), PDS šūnu kultūru centrifugēšana paaugstina mRNS līmeni MMP-1, bet nedod nekādu efektu uz I tipa kolagēna un TIMP sintēzi (Redlich et al., 2004). No visiem pašlaik pieejamiem pierādījumiem iespējams uzbūvēt hipotētisko modeli (sk. 1. attēlu), kas ortodontiskās zobu pārvietošanas gadījumā parāda PDS šūnu reakciju uz mehānisko spēku vilkšanas pusē (Meikle, 2006).

Pašlaik daži pētnieki izmanto *in vitro* metodes, lai pētītu osteoblastu un PDS šūnu atbildi uz spiedienu. Kanasaki et al. (2002) atrada, ka šūnu signāli no saspiestiem PDS fibroblastiem stimulē osteoklastoģenēzi perifērājās mononuklēro asins šūnu kultūrās un ka tajās paaugstinās RANKL mRNS ekspresija. OPG sintēze turpretī palika bez izmaiņām. Tas nozīmē, ka PDS ir nozīmīgas osteoklastu diferenciācijā un ortodontiskajā zobu pārvietošanā. Citos pētījumos (He et al., 2004) atrasts, ka PDS šūnas, kas pakļautas vilkšanas un spiediena spēkam, spēj uztvert divus dažādus mehāniskās stimulācijas veidus un atbildēt atšķirīgi, proti, ar atšķirīgu ekstracelulārās matricē sintēzi (I tipa kolagēns, fibronektīns) un noārdīšanos (MMP-2, TIMP-2). Dažādu šūnu tipu mijiedarbības rezultātā notiek saistaudu noārdīšanās un kaula

resorbcija. Visvairāk šo procesu pētīšanai ir piemērotas *in vivo* metodes (sk. 2. attēlu), jo molekulārā līmeņa notikumi rada kaskādes tipa reakcijas, piemēram, osteoklastu un gigantšūnu proliferāciju un aktivāciju (Mumm, 2004).

Pētījumos par žurku zobu pārvietošanos ar *in situ* hibridizācijas metodi atklāta IL-1 β un IL-6, mRNS (bet ne TNF- α) ekspresijas palielināšanās gan no PDS šūnām, gan no osteoblastiem spiediena pusē (Alhashimi *et al.*, 2001), kā arī MMP-8 (kolagenāze-2) un MMP-13 (kolagenāze-3) sintēze. RANKL, OPG un mRNS tiek plaši sintezēti periodontālo audu osteoblastos un PDS šūnās (Ogasawara *et al.*, 2004). Ortodontiski pārvietojot zobus pēc Waldo metodes (Waldo un Rothblatt, 1954), daudzkodolainajos osteoklastos tika atrasti pozitīvi RANKL un RANK signāli, kas nodrošina aktīvu kaula resorbciju. Osteoklastos tika konstatēta arī IL-1 β un TNF- α ekspresija.

Nepieciešamība noskaidrot ārstēšanas iespējas, kas spētu stimulēt periodonta audu reģenerāciju, radīja virkni pētījumu par periodonta audu atbildi uz augšanas faktoru kairinājumiem (Graves, 1994).

Tranformējošais augšanas faktors beta (TGF β) stabilizē kolagēno matrici, samazinot fibroblastu MMP sintēzi un sekrēciju. TGF β sekretē makrofāgi un trombocīti. Fibroblasti periodonta saitēs reaģē uz parathormonu līdzīgi osteoblastiem, palielinot cikliskā adenozinmonofosfāta izdali. Fibroblastu augšanas faktori palielina PDS proliferāciju un samazina sārmainās fosfatāzes veidošanos, un līdz ar to arī spēju veidot mineralizētos audus. PDS saistaudiem ir augsta reģenerācijas spēja. Funkcionālo saišu reģenerācijai nepieciešama Šarpeja šķiedru fiksācijai līdzīga kaula un cementa veidošanās. Tieši šo audu reorganizācija nepieļauj PDS un kaula saplūšanu, kas ir ankilozes iemesls (Garant, 2003).

PDS remodelācijas process notiek līdzīgi dzīšanas procesam saistaudos. Jauni fibroblasti rodas no perivaskulārām priekšteču šūnām, kas atrodas blakus PDS fibroblastiem bez izmaiņām. Fibroblastu migrācija notiek fibrīna un fibronektīna tīklojumā. Jaunas kolagēnās šķiedras tiek veidotas haotiski, bieži bez funkcionālās orientācijas un arī bez piestiprināšanās blakus esošiem audiem. Pateicoties šūnu aktivitātei, pilnīga šķiedru reorganizācija notiek dažu nedēļu laikā (Caton, 2000).

2. DARBA MĒRĶIS

Noteikt deģenerācijas, aktivitātes, augšanas, mineralizācijas un iekaisuma signālmolekulu ekspresiju cilvēka alveolārajā kaulā un periodontālajos audos, kā arī apoptotisko šūnu daudzumu, lai pamatotu audu remodelācijas iespējas ortodontiskās ārstēšanas procesā atkarībā no vecuma.

3. DARBA UZDEVUMI

1. Izmantojot histoloģisko krāsojumu ar hematoksilīnu un eozīnu, noteikt histoloģiskās interrādikulārās septas audu atšķirības trijās pacientu grupās: pacientiem 12–14 gadu vecumā (1. grupa), pacientiem 15–22 gadu vecumā (2. grupa) un pacientiem 23–49 gadu vecumā (3. grupa).

2. Izmantojot imūnhistoķīmijas metodi, noteikt signālmolekulu ekspresiju interrādikulārās septas audos 1., 2. un 3. pacientu vecuma grupā:

a) augšanas faktoru un to receptoru – transformējošā augšanas faktora β (TGF β), nukleārā kappa B faktora (RANKL), osteoproteģerīna (OPG), fibroblastu augšanas faktora receptora 1 (FGFR1), bāziskā fibroblastu augšanas faktora (bFGF) – ekspresiju interrādikulārās septas audu paraugos;

b) kaula ekstracelulārās matricē proteīna osteokalcīna (OC) un ekstracelulārās matricē degradācijas enzīmu – matricē metālproteināzes 8 (MMP8) un matricē metālproteināzes 9 (MMP9) – ekspresiju;

c) iekaisuma faktora interleikīna 6 (IL 6) ekspresiju;

3. Izmantojot TUNEL metodi, noteikt apoptozes biežumu interrādikulārās septas audos 1., 2. un 3. pacientu vecuma grupā.

4. Noteikt korelāciju starp augšanas faktoru, kaula ekstracelulārās matricē proteīnu, deģenerācijas enzīmu un apoptozes relatīvā daudzuma ekspresiju un pacientu vecumu.

4. DARBA NOVITĀTE

Šis ir viens no retajiem pētījumiem Latvijā, kurā kā materiāls tiek izmantots cilvēka kauls, lai noteiktu augšanas faktoru, kaula ekstracelulārās matricē proteīnu, deģenerācijas enzīmu, iekaisuma proteīnu ekspresijas un apoptozes, t.i., kaulu augšanas un remodelēšanās rādītāju atšķirības alveolārajā kaulā un periodonta audos saistībā ar pacienta vecumu.

5. MATERIĀLS UN METODES

5.1. Pētījuma grupa

Pētījumā tika iekļauti 45 pacienti, kuriem bija diagnosticētas dentoalveolārās anomālijas un bija nepieciešama ortodontiska ārstēšana. Pacienti tika iedalīti 3 grupās (sk. 5. 1. tabulu):

1. pacientu grupa vecumā no 12 līdz 14 gadiem raksturo pubertātes periodu, kad remodelācijas procesi notiek strauji un metabolā aktivitāte ir visaugstākā.

2. pacientu grupa vecumā no 15 līdz 22 gadiem iezīmē periodu, kura laikā notiek audu nobriešana, remodelācijas potenciāls ir augsts, bet metabolā aktivitāte pamazām sāk samazināties, salīdzinot ar pubertātes periodu.

3. pacientu grupa vecumā no 23 līdz 49 gadiem raksturo nobriedušo audu stāvokli un stabilu metabolo aktivitāti, kas ar gadiem sākt kļūt lēnāka.

Pacientu skaits, dzimums, vecums un to iedalījumu grupās ir aplūkots 5. 1. 1. tabulā.

5. 1. 1. tabula.

Pacientu absolūtais un relatīvais sadalījums pētījuma grupās saistībā ar dzimumu

Grupa	Dzimums				Kopā	
	Vīrietis		Sieviete		Skaits	Procenti
	Skaits	Procenti	Skaits	Procenti		
1.	5	33,3	10	66,6	15	33,3
2.	7	45,0	8	55,0	15	33,3
3.	9	65,4	6	34,6	15	33,3
Kopā	21		24		45	100,0

Pētījumā netika iekļauti pacienti ar:

- akūtu periodontītu;
- smagām vispārējām saslimšanām anamnēzē;

- lūpu un/vai aukslēju šķeltni;
- dentofaciāliem sindromiem;
- skeletālām asimetrijām.

Rīgas Stradiņa universitātes Stomatoloģijas institūta Mutes, sejas un žokļu ķirurģijas klīnikā no 2010. gada decembra līdz 2013. gada augustam projekta ietvaros pētāmos audus ieguva pēc ambulatoras zobu ekstrakcijas ortodontijas pacientiem un plānveida ortognātiskiem pacientiem – no ekstrahēto augšžokļa premolāru, molāru un apakšžokļa molāru vietām (pēc FDI sistēmas: dd 14, 16, 17, 18, 24, 26, 27, 28, 36, 37, 38, 46, 47, 48 interrādikulārās septas daļas). Iegūtais audu materiāls tika pētīts imūnhistoķīmiski, lai noteiktu augšanas un apoptozes faktoru klātbūtni. Pētījumam tika izmantota anonīma pacientu numerācija. Pētījumam bija svarīgs pacientu dzimums, vecums, anamnēzes dati, kā arī klīniskie dati – ekstrakcijas vieta un ekstrahētā zoba diagnoze.

Zobu ekstrakcijas tehnika notika atbilstoši BO VAS Veselības statistikas un medicīnas tehnoloģiju aģentūrā apstiprinātām tehnoloģijām (MK 01.02.2005. noteikumi Nr. 82). Audu gabaliņi (1–2 mm³ lieli) tika ņemti no zobu ekstrakcijas vietām (*septum interradiculare*) pacientiem, kuriem saistībā ar ortodontisko ārstēšanu tika indicēta zobu ekstrakcija, neveicot papildu operatīvu iejaukšanos.

5.2. Morfoloģisko pētījumu metodes

Audu fiksācija tika veikta uzreiz operācijas telpā. Šim nolūkam tika izmantots piesātināts pikrīnskābes šķīdums (2% formaldehīna un 0,2% pikrīnskābes 0,1 M fosfātbuferī (pH 7,2)) jau iepriekš sagatavotā Ependorfa pudelītē. Šī metodika ir paredzēta imūnhistoķīmiskajiem izmeklējumiem, kad jāfiksē īpaši maigas struktūras, piemēram, receptori, neuropeptīdi un ar augšanas īpašībām apveltīti faktori. Tā ir daudzkārt pārbaudīta praksē un operācijas palīgpersonālam prasa tikai apmēram 2 minūtes, tādējādi netraucējot pašas operācijas norisi.

Pēc tam audu gabaliņi tika nogādāti RSU Anatomijas un antropoloģijas institūta Morfoloģijas laboratorijā. Transportēšana šādi fiksētiem audiem nav problemātiska un neprasa papildu sagatavošanu. Tālāk audus apstrādāja atbilstoši izvēlētajai metodikai.

Paraugus apskatīja *Leica DC300F* mikroskopā un tālāk analizēja attēlu analizatoru sistēmā ar programmu *ImageproPlus 7.0* (sistēmas un mikroskopi iegādāti 2003. gadā un ietver plašas audu analīzes sistēmas), kas atrodas RSU Anatomijas un antropoloģijas institūtā (AAI). Audu bloki glabājas arhīvā RSU AAI Morfoloģijas laboratorijā šim nolūkam paredzētā skapī.

Kopumā no 45 cilvēku kaulaudu preparātiem tika sagatavoti 540 histoloģiskie griezumī, kas tika izmantoti krāsošanai morfoloģiskai izpētei ar hematoksilīnu un eozīnu (H & E) (*Aughey, Frye, 2001*), TUNEL reakciju (*Negoescu et al, 1998*), biotīna-streptavidīna imūnhistoķīmisko metodi (*Hsu et al, 1981*).

5.2.1. Materiāla fiksācija un sagatavošana

Operācijās iegūtais audu materiāls 4–8 stundas tika fiksēts maisījumā, kurš saturēja 2% formaldehīda un 0,2% pikrīnskābes 0,1 M fosfātu buferī (pH 7,2). Pēc tam audu gabaliņus 12 stundas skaloja tiroīda buferī (pH 7,6), kas saturēja 10% saharozes, tad audus ieguldīja parafīnā un ar mikrotomu sagrieza 3–5 µm biezus griezumus (*Stefanini et al., 1967*).

5.2.2. Preparātu krāsošana ar hematoksilīnu un eozīnu

Pēc preparātu deparafinēšanas tos 7 minūtes krāsoja ar hematoksilīnu. Pēc tam preparātus 10 minūtes skaloja ūdenī. Sekoja 2 minūšu ilga krāsošana ar eozīnu, pēc kuras preparātus īslaicīgi skaloja ar ūdeni. Krāsošanai sekoja atūdeņošana pieaugošas koncentrācijas spirta šķīdumos un ksilolā. Nokrāsotos preparātus noklāja ar polistirolu un nosedza ar segstikliņu. Krāsošanas rezultātā šūnas bazofilās daļas bija iekrāsojušās zili violetos toņos, bet acidofilās – no rozā līdz tumši sarkanam tonim.

Gaismas mikroskopēšanai tika lietots *Leica DM* vai *Leica DC300F* mikroskops ar 200 vai 400 reizu lielu palielinājumu.

5.2.3. Biotīna-streptavidīna imūnhistoķīmiskā metode

Sagrieztos 3–5 µm biezus griezumus 10 minūtes skaloja fosfātu buferšķīdumā. Pēc tam griezumus 20 minūtes inkubēja ar dabīgo kazas, peles un truša 10% serumu, lai mazinātu fona nokrāsošanos, un 60 minūtes turpināja inkubāciju ar primārām antivielām mitrā kamerā istabas temperatūrā (Hsu et al, 1981).

Pielietojot biotīna un streptavidīna imūnhistoķīmisko metodi, cilvēku kaulaudos un mīkstajos audos noteica matrices metālproteināzi MMP8 (6-19Z: SC-80206, 1 : 50), MMP9 (H-129: SC-10737, 1 : 250, *Santa Cruz Biotechnology, Inc., California*, ASV), fibroblastu augšanas faktora receptoru (FGFR, kods ab10646, 1 : 100, *Abcam*, Anglija), transformējošo augšanas faktoru beta (TGFβ, kods T1654, 1 : 1000, *SigmaBioScience*, ASV), interleikīnu IL6 (kods SC-130326, 1 : 50, *Santa Cruz Biotechnology, Inc., California*, ASV), osteoprotegerīnu (OPG N-20 SC-8468, 1 : 40, *Santa Cruz Biotechnology, Inc., California*, ASV), osteokalcīnu (OC, kods ab13418; *Abcam*; 1 : 100, *Cambridge*, Anglija), nukleāro kappa B faktora proteīnu (NkPb105, kods p105/p50[ab7971], *Abcam*, 1 : 100, *Cambridge*, Anglija), fibroblastu augšanas faktora receptoru 1 (FGFR1, kods 10646, darba atšķaidījums 1 : 100, *Abcam*, Anglija), bāzisko fibroblastu augšanas faktoru (bFGF, kods ab16828, 1 : 200, *Abcam*, Anglija). Visi preparāti apkopoti 5. 2. 2. tabulā.

Deparafināciju veica pēc vispārpieņemtās shēmas. Pēc preparātu skalošanas PBS (fosfātu buferis, pH 7,4) šķīdumā, kas ilga 10 minūtes, tos uz 20 minūtēm ievietoja mikroviļņu krāsnī 4% sālskābā nātrija citrāta buferšķīdumā. Pēc atdzesētu preparātu skalošanas ar PBS uz katra griezuma uzklāja pa 150 fl 3% ūdeņraža peroksīda un turēja 10 minūtes. Preparātus atkal skaloja destilētā ūdenī un PBS, un tad uz preparātiem uzpilināja primārās antivielas (piemēram, FGFR1) – uz katra griezuma pa 30 µl (eksponēšanas laiks – 2 stundas), kā arī preparātiem uz 30 minūtēm uzklāja LSAB + LINK (ar biotīnu saistītās sekundārās antivielas; kods K1015, *DakoCytomation*, Dānija), uz 25 minūtēm uzklāja LSAB + KIT (streptavidīnu, kas saistīts ar enzīmu peroksidāzi; kods K0690, *DakoCytomation*, Dānija) un uz 10 minūtēm – DAB (substrāta hromogēnā sistēma; kods K3468, *Dako*, Dānija). Pēc tam preparātus īslaicīgi krāsoja hematoksilīnā. Visa marķieru informācija ir apkopota 5. 2. 2. tabulā.

Pozitīvas reakcijas gadījumā vēlamās struktūras nokrāsojās brūnas.

**Informācija par augšanas faktoriem, to receptoriem, audu ECM
degradācijas marķieriem, gēnu proteīniem, kas noteikti ar biotīna-streptavidīna
imūnhistoķīmisko metodi**

Faktors	Avots	Kods	Darba atšķaidījums	Ražotājs/firma un valsts
TGFβ	pele	1279	1 : 1000	<i>Cambridge Science Park, UK</i>
bFGF	trusis	ab16828	1 : 200	<i>Abcam, UK</i>
FGFR1	trusis	ab10646	1 : 100	<i>Abcam, UK</i>
IL6	pele	SC-130326	1 : 50	<i>Santa Cruz, USA</i>
MMP1	pele	3-B6 SC-21731	1 : 100	<i>Santa Cruz, USA</i>
MMP8	pele	SC-80206	1 : 50	<i>Santa Cruz, Usa</i>
MMP9	trusis	SC-10737	1 : 250	<i>Santa Cruz, USA</i>
OPG	kaza	SC-8468	1 : 40	<i>Santa Cruz, USA</i>
OC	pele	ab 13418	1 : 100	<i>Abcam, UK</i>
NkPb105	trusis	ab 7971	1 : 100	<i>Abcam, UK</i>

5.3. TUNEL metode apoptozes noteikšanai

Tika izmantots apoptozes komplekts *In Situ cell Death Detection, POD Cat. no.* 1684817, *Roche Diagnostics* (Vācija) saskaņā ar *Negoescu et al.* (1998) aprakstīto tehniku. Deparafinizēti audu gabaliņi 10 minūtes tika turēti istabas temperatūrā PBS (fosfātu buferī) (pH 7,5) šķīdumā. Pēc tam 30 minūtes veica endogēnās peroksidāzes aktivitātes bloķēšanu ar 3% ūdeņraža peroksīdu, tad audu gabaliņus mazgāja (3 × 5 min) PBS šķīdumā. Audu gabaliņu griezumus tika ievietoti citrāta buferšķīdumā un ievietoti mikroviļņu krāsnī uz 10 minūtēm, lai fiksētu antigēnu. Pēc tam tos atdzesēja istabas temperatūrā, pēc tam mazgāja PBS šķīdumā un uz 10 minūtēm ievietoja 0,1% BSA (vērsa seruma albumīnā) uz PBS. Audu griezumus inkubēja ar TUNEL (Tdt – T gala deoksīnukleotidiltransferāzes un dioksigenīna iezīmēto nukleotīdu maisījums) 37 °C tvertnē ar mitrinātu gaisu 60 minūtes ilgi. Pēc skalošanas PBS audu griezumus 37 °C

inkubēja POD (aitas antifuorescences antivielas ar mārutku peroksidāzi saistītais Fab fragments) 30 minūtes. Pēc tam griezumus uz 7 minūtēm pārklāja ar DAB (diaminobenzidīna hromogēnu) šķīdumperoksidāzes noteikšanai. Tad audu griezumus noskaloja destilētā ūdenī, kontrastkrāsošanai (20 sek.) lietoja hematoksilīnu un eozīnu. Nokrāsotos preparātus apstrādāja ar polistirolu un nosedza ar segstikliņu.

Histoloģiskie griezumti tika mikroskopēti ar *Leica DM RB* gaismas mikroskopu 400 reižu lielā palielinājumā. Apoptotisko šūnu skaita novērtēšanai histoloģiskajā preparātā tika skaitītas apoptotiskās šūnas nejauši izvēlētos trīs redzes laukos, kas savstarpēji nepārklājās (*Itoh*, 2001).

5.4. Semikvantitatīvo datu konvertācija

Imūnhistoķīmiski noteikto augšanas faktoru, gēnu proteīnu, kaula ekstracelulārās matricas proteīnu un deģenerācijas enzīmu relatīvā biežuma apzīmēšanai iegūtajā audu materiālā tika izmantota literatūrā plaši pielietotā puskvantitatīvā skaitīšanas metode (Pilmane, 1998; Knabe, 2005). Augšanas faktoru, gēnu proteīnu, kaula ekstracelulārās matricas proteīnu un deģenerācijas enzīmu daudzums tika analizēts viena griezuma trīs redzes laukos. Lietotie apzīmējumi apkopoti 5. 4. 3. tabulā. Lai iegūtos datus apstrādātu statistiski, mikroskopa redzes laukā novēroto šūnu daudzums tika kodēts (0 – netika redzēta neviena pozitīva struktūra redzes laukā, (1) 0/+ – dažas pozitīvas struktūras redzes laukā, (2) + – neliels daudzums pozitīvu struktūru redzes laukā, (3) +/+ – maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā, (4) ++ – vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā, (5) ++/+++ – vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru redzes laukā, (6) +++ – ļoti daudz pozitīvu struktūru redzes laukā.

5. 4. 3. tabula

Imūnhistoķīmiski noteikto augšanas faktoru, kaula ekstracelulārās matricas proteīnu, deģenerācijas enzīmu un gēnu proteīnu puskvantitatīvās metodes relatīvā biežuma apzīmēšana.

Lietotie apzīmējumi	Paskaidrojumi	Statistikā lietojamie apzīmējumi
0	Netika redzēta neviena pozitīva struktūra redzes laukā	0
0/+	Dažas pozitīvas struktūras redzes laukā	1

+	Neliels daudzums pozitīvu struktūru redzes laukā	2
+/++	Maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā	3
++	Vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā	4
++/+++	Vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru redzes laukā	5
+++	Ļoti daudz pozitīvu struktūru redzes laukā	6

5.5. Datu apstrādes statistiskās metodes

Datu statistiskās analīzes mērķis bija ar adekvātām statistikas metodēm izvērtēt signālmolekulu ekspresiju pacientiem dažādās vecuma grupās.

Pēc mainīgā lieluma veida tika aprēķināts centrālās tendences rādītājs – pazīmes vidējā aritmētiskā vērtība, mediāna un moda, kā arī izkliedes rādītāji – standartnovirze, pazīmes minimālā un maksimālā vērtība.

Lai noteiktu, vai dati atbilst normālsadalījumam, tika izmantots Šapiro–Vilka (*Shapiro–Wilk*) tests.

Divu atkarīgu vai neatkarīgu grupu salīdzināšanai pēc vienas pazīmes izmantots neparametriskais Manna–Vitnija (*Mann–Whitney*) tests, bet vairāku neatkarīgu grupu salīdzināšanai pēc vienas pazīmes – neparametriskais Kruskala–Vallisa (*Kruskal–Wallis*) tests.

Visos gadījumos rezultātu novērtēja kā statistiski ticami atšķirīgu, ja nulles hipotēzes varbūtība bija vienāda ar 0,05 vai mazāka par to, t.i., kritērijs nulles hipotēzes noraidīšanai bija būtiskuma līmenis $\alpha = 0,05$. Pretējā gadījumā tika pieņemta nulles hipotēze.

Divu pazīmju saistības analīzei tika izmantota Spīrmena korelāciju analīze. Pētījumā pieņemta šāda korelācijas ciešuma klasifikācija atkarībā no korelācijas koeficienta r lieluma:

- korelācija ir vāja, ja $r \leq 0,3$;
- korelācija ir vidēja gadījumos, kad $0,3 < r < 0,7$;
- bet korelācija ir cieša, ja $r \geq 0,7$.

Saistību starp diviem parametriem meklēja, arī izmantojot lineārās regresijas metodi.

Analizējot nominālu vai rangu datus, lai salīdzinātu divu vai vairāku pazīmju proporcionālo sadalījumu, tika izmantota Pīrsona Hī kvadrāta statistiskā analīze, ja kontingences tabulas biežums bija > 5 , savukārt Fišera precīzais tests tika izmantots, ja kontingences tabulas biežums bija < 5 .

Datu statistiskā apstrāde veikta, izmantojot *IBM SPSS 20.* versiju.

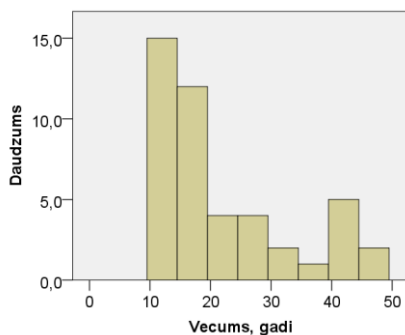
6. REZULTĀTI

6.1. Pacientu raksturojums

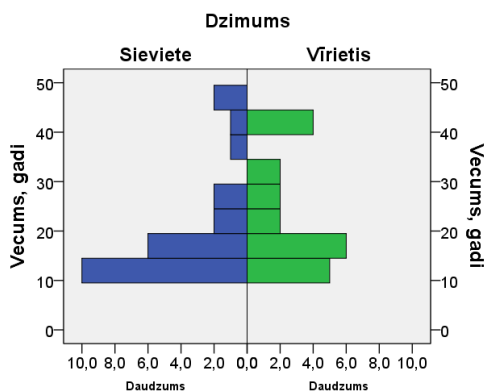
Pētījumā bija iekļauti 45 pacienti, to vidējais vecums ($\pm$ SD) bija $22,02 \pm 11,20$ gadi. Minimālais pacientu vecums bija 12 gadu, maksimālais – 49 gadi, vecuma amplitūda – 37 gadi. Vecuma mediāna bija 17 gadi, bet modālais vecums – 12 gadi. Vecuma starpkvartīļu izkliede bija 15,50 gadi. Pacientu vecuma asimetrijas koeficients bija 1,01, tātad sadalījums ar labo jeb pozitīvo asimetriju; vecuma pārpalikuma (*excess*) koeficients bija 0,12. Izmantojot Šapiro–Vilka testu vecuma atbilstības normālā sadalījuma pārbaudei, konstatēts, ka pacientu vecums neatbilda normālajam sadalījumam ($p < 0,001$). Visu pacientu vecuma histogramma attēlota 6. 1. 1. attēlā.

Pētījumā bija iesaistīts 21 vīrietis (46,67%) un 24 sievietes (53,33%). Izmantojot binomiālo testu, secināts, ka pētījumā vīriešu un sieviešu skaita proporcijas statistiski ticami neatšķīrās ($p = 0,76$). Vīriešu vidējais vecums ($\pm$ SD) bija $23,67 \pm 11,02$ gadi, minimālais vecums – 12 gadi, bet maksimālais – 44 gadi. Sieviešu vidējais vecums ($\pm$ SD) bija $20,58 \pm 11,37$ gadi, minimālais vecums – 12 gadi, bet maksimālais – 49 gadi. Izmantojot neatkarīgo izlašu t testu, tika secināts, ka pētījumā iekļauto vīriešu un sieviešu vidējā vecuma starpība bija 3,08 gadi [95% TI: – 9,84 līdz 3,67], un tā nav statistiski ticami atšķirīga ($t(43) = 0,92$; $p = 0,36$). Balstoties uz Lēvena testa rezultātu, tika konstatēts, ka vīriešu un sieviešu vecuma sadalījuma dispersijas statistiski ticami neatšķīras ($F = 0,14$; $p = 0,70$).

Izmantojot Šapiro–Vilka testu, atsevišķi pārbaudot vīriešu un sieviešu vecuma sadalījuma atbilstību normālajam sadalījumam, atrada, ka tie neatbilst normālajam sadalījumam (atbilstoši $p < 0,001$). Visu pacientu vecuma histogramma attēlota 6. 1. 1. attēlā. Vīriešu un sieviešu vecuma histogramma redzama 6. 1. 2. attēlā.

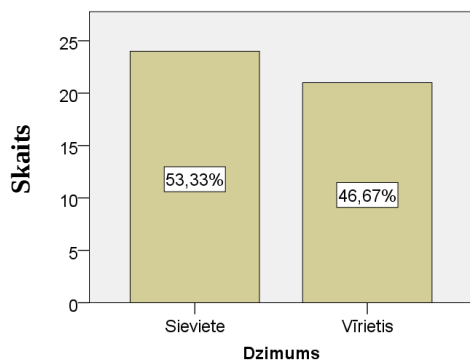


6. 1. 1. attēls. Visu pacientu vecuma histogramma (pie vertik. ass = Skaits)



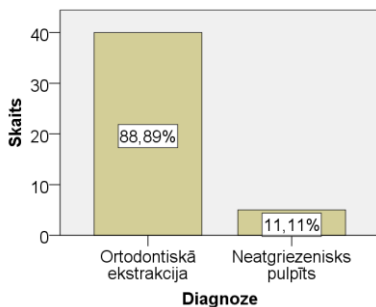
6. 1. 2. attēls. Vīriešu un sieviešu vecuma histogramma (pie horiz. ass = Skaits)

Sieviešu un vīriešu dzimuma pacientu procentuālais sadalījums ir parādīts 6. 1. 3. attēlā. Pēc procentuālās attiecības redzējām, ka sieviešu dzimuma pacienti bija 53,33%, bet vīriešu dzimuma pacienti – 46,67%.



6. 1. 3. attēls. **Pētījumā iekļauto sieviešu un vīriešu procentuālā attiecība**

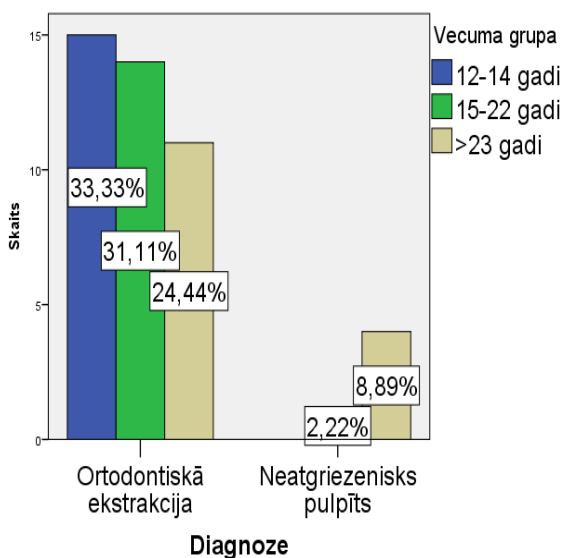
Pētījumā iekļauto pacientu skaits ar ortodontisko ekstrakciju bija vairāk nekā 4 reizes lielāks nekā pacientu skaits ar neatgriezenisku pulpītu (6. 1. 4. attēls).



6. 1. 4. attēls. **Pētījumā iekļauto pacientu procentuālais sadalījums pēc diagnozes**

Pētījumā iekļautie pacienti pēc diagnozes dažādās vecuma grupās iedalījās šādi:
 1. grupā (12–14 gadi) visiem pacientiem tika veiktas zoba ekstrakcijas ortodontisku indikāciju dēļ, no 2. grupas pacientiem (15–22 gadi) 31,11% pacientu tika veiktas zobu ekstrakcijas pēc ortodontiskām indikācijām, bet 2,22% pacienšu – sakarā ar neatgriezeniskā pulpīta diagnozi, 3. grupas pacientiem (23–49 gadi) 24,44% pacientu ekstrakcijas tika veiktas ortodontisku indikāciju dēļ, bet 8,89% pacientu zobi tika ekstrahēti neatgriezeniskā pulpīta gadījumā. Pētot sakarību starp vecuma grupu un diagnozi,

izmantojot Fišera eksakto testu, secinājām, ka tā pastāv un ir statistiski ticama ($p < 0,001$; 6. 1. 5. attēls).



6. 1. 5. attēls. Pētījumā iekļauto dažāda vecuma pacientu diagnozes procentuālā attiecība

6.2. Rufīnas histoloģiskā atrade

Veicot hematoksilīna un eozīna pārskata krāsojumus, analizējamās preparātos bija redzams, ka 1. grupas pacientiem (vecumā no 12 līdz 14 gadiem) morfoloģiskā aina atbilda augošo kaulaudu vispārpieņemtai normai. Bija atrodamas pareizas formas osteocīti, osteonu kanāli ar izteiktiem asinsvadiem, bet dažos osteonu kanālos bija arī saistaudi.

Pacientiem 2. grupā (vecumā no 15 līdz 22 gadiem) pārskata preparātos tika novērota līdzīga aina kā 1. grupā. Tomēr kaula struktūra bija vairāk regulāra, kas atbilst nobriedušam kaulam.

Histoloģiskā aina 3. grupas pacientiem (vecumā no 23 līdz 49 gadiem) atbilda nobrieduša kaula struktūrai ar novecošanās pazīmēm, arī ar saistaudu proliferāciju osteonu kanālos.

6.3. Imūnhistoķīmijas atrades: OPG

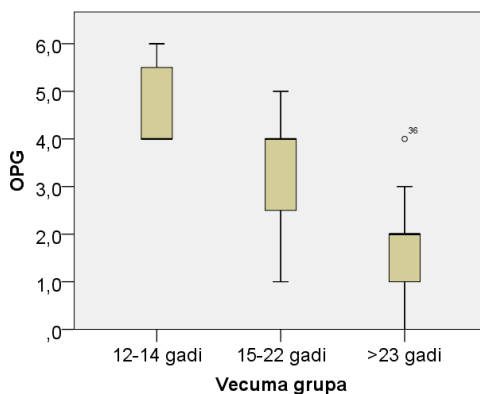
Analizējot OPG ekspresiju interrādikulārajā septā, konstatējām, ka 1. grupas pacientu kaulaudos un periodonta audos bija dažādi daudz, bet caurmērā vidēji daudz un daudz pozitīvu struktūru, 2. grupā bija no maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru, bet 3. grupā bija neliels daudzums pozitīvo šūnu. Balstoties uz Kruskala–Vallisa testu, secinājām, ka OPG dažādām vecuma grupām atšķiras statistiski ticami ($\chi^2 = 27,20$; $df = 2$; $p < 0,001$). OPG šūnu sadalījums pacientiem dažādās vecuma pacientu grupās redzams 6. 3. 4. tabulā.

6. 3. 4. tabula

OPG saturošo šūnu relatīvais daudzums interrādikulārā septā dažāda vecuma pacientu grupās

Relatīvais daudzums	12–14 gadi (n)	15–22 gadi (n)	23 – 49 gadi (n)
0	0	0	1
0/+	0	1	4
+	0	3	8
+ /++	0	3	1
++	9	7	1
++ /+++	2	1	0
+++	4	0	0

OPG pozitīvo struktūru relatīvais daudzums 1. grupā bija $4,8 \pm 0,75$, 2. grupā $3,2 \pm 0,8$, 3. grupā $1,5 \pm 0,5$. OPG pozitīvo šūnu mediānas vērtības un 95% ticamības intervāls pacientu grupās redzams 6. 3. 6. attēlā.



6. 3. 6. attēls. **Osteoprotegerīna pozitīvo šūnu relatīvā daudzuma saistība ar pacientu vecumu**

Redzes laukā: 0 – nebija redzama neviena pozitīva struktūra, 1 (0/+) – dažas pozitīvas struktūras, 2 (+) – neliels daudzums pozitīvu struktūru, 3 (+/++) – maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru, 4 (++) – vidēji daudz pozitīvu struktūru, 5 (++/++) – vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru, 6 (+++) – ļoti daudz pozitīvu struktūru

6.3.1. Matrices metālproteināze 8 (MMP8)

Analizējot MMP8 ekspresiju interradikulārās septas audos, konstatējām, ka 1. grupā bija galvenokārt maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru, 2. grupā – galvenokārt vidēji daudz pozitīvu struktūru, bet arī trūkums, bet 3. grupā galvenokārt maz pozitīvu struktūru. Balstoties uz Kruskala–Vallisa testu, tika secināts, ka MMP8 dažādām vecuma grupām neatšķiras statistiski ticami ($\chi^2 = 1,72$; $df = 2$; $p = 0,42$). MMP8 pozitīvo struktūru sadalījums kaulaudos dažādās vecuma pacientu grupās redzams 6.3.1.5. tabulā.

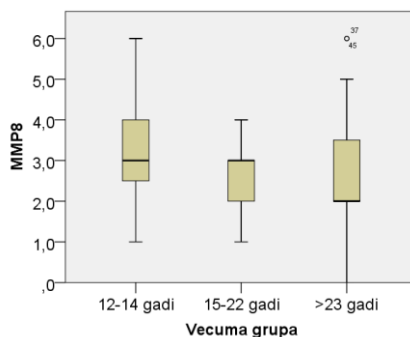
6. 3.1. 5. tabula

MMP8 pozitīvo struktūru relatīvais daudzums dažāda vecuma pacientu grupās interradikulārās septas audos

Relatīvais daudzums	12–14 gadi (n)	15–22 gadi (n)	23 – 49 gadi (n)
0	0	0	2
0/+	3	3	0
+	1	4	7

+/++	4	5	2
++	6	3	1
++/+++	0	0	1
+++	1	0	2

MMP8 šūnu relatīvais daudzums 1. grupā bija $3,2 \pm 0,6$, 2. grupā $2,5 \pm 0,5$, 3. grupā $2,8 \pm 0,75$. MMP8 ekspresijas mediānas vērtības un 95% ticamības intervāls pacientu grupās redzams 6. 3. 1. 7. attēlā.



6. 3. 1. 7. attēls. **MMP8 pozitīvo šūnu relatīvā daudzuma saistība ar pacientu vecumu.**

Redzes laukā: 0 – nebija redzama neviena pozitīva struktūra, 1 (0/+) – dažas pozitīvas struktūras, 2 (+) – neliels daudzums pozitīvu struktūru, 3 (+/++) – maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru, 4 (++) – vidēji daudz pozitīvu struktūru, 5 (++/++) – vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru, 6 (+++) – ļoti daudz pozitīvu struktūru

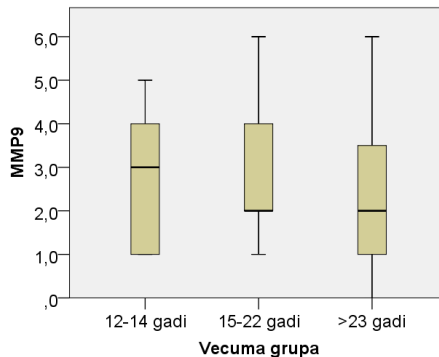
6.3.2. Matrices metālproteināze 9 (MMP9)

Analizējot MMP9 ekspresiju intradikulārās septas audos, konstatējām, ka 1. grupā bija galvenokārt vidēji daudz pozitīvu šūnu ar atsevišķiem izņēmumiem, 2. grupā – maz līdz vidēji daudz pozitīvu šūnu, bet 3. grupā – pārsvarā neliels daudzums pozitīvu šūnu. Balstoties uz Kruskala–Vallisa testu, tika secināts, ka MMP9 dažādām vecuma grupām statistiski ticami neatšķiras ($\chi^2 = 0,72$; $df = 2$; $p = 0,70$). MMP9 struktūru sadalījums pacientiem dažādās pacientu vecuma grupās redzams 6. 3. 2. 6. tabulā.

**MMP9 pozitīvo struktūru relatīvais daudzums dažāda vecuma pacientu
grupu interradikulārās septas audos**

Relatīvais daudzums	12–14 gadi (n)	15–22 gadi (n)	23 – 49 gadi (n)
0	0	0	2
0/+	5	1	3
+	1	7	3
+/++	4	2	3
++	4	3	2
++/+++	1	1	1
+++	0	1	1

MMP9 šūnu relatīvais daudzums 1. grupā bija $2,9 \pm 1,2$, 2. grupā – $3,2 \pm 1,1$, 3. grupā – $2,2 \pm 1,2$. MMP9 pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma mediānas vērtības un 95% ticamības intervāls pacientu grupās redzams 6. 3. 2. 8. attēlā.



6. 3. 2. 8. attēls. **MMP9 pozitīvo šūnu relatīvā daudzuma saistība ar pacientu vecumu.** Redzes laukā: 0 – nebija redzama neviena pozitīva struktūra, 1 (0/+) – dažas pozitīvas struktūras, 2 (+) – neliels daudzums pozitīvu struktūru, 3 (+/++) – maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru, 4 (++) – vidēji daudz pozitīvu struktūru, 5 (++/+++ – vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru, 6 (+++) – ļoti daudz pozitīvu struktūru

6.3.3. Nukleārais kappa faktors B105 (RANKL)

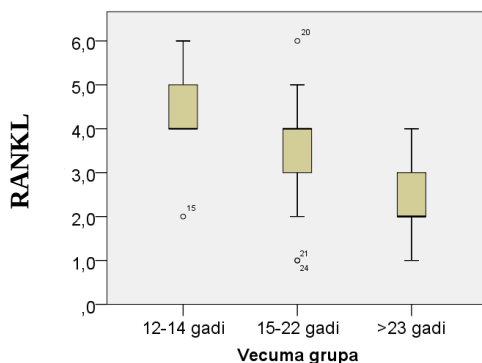
Analizējot RANKL ekspresiju interradikulārās septas audos, konstatējām, ka 1. grupā bija vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru, 2. grupā bija galvenokārt vidēji daudz pozitīvu struktūru, bet 3. grupā – neliels daudzums pozitīvo šūnu. Balstoties uz Kruskala–Vallisa testu, secinājām, ka RANKL dažādām vecuma grupām atšķiras statistiski ticami ($\chi^2 = 14,70$; $df = 2$; $p < 0,001$). RANKL pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma sadalījums pacientiem dažādās vecuma pacientu grupās redzams 6. 3. 3. 7. tabulā.

6. 3. 3. 7. tabula

**RANKL šūnu relatīvā daudzuma sadalījums dažāda vecuma pacientu grupās
interradikulārās septas audos**

Relatīvais daudzums	12–14 gadi (n)	15–22 gadi (n)	23 – 49 gadi (n)
0	-	-	-
0/+	0	2	3
+	1	1	8
+/++	0	2	0
++	9	8	4
++/+++	1	1	0
+++	3	1	0

RANKL pozitīvo šūnu relatīvais daudzums 1. grupā bija $4,5 \pm 0,5$, 2. grupā – $3,5 \pm 0,6$, 3. grupā – $2,5 \pm 0,5$. RANKL ekspresijas mediānas vērtības un 95% ticamības intervāls pacientu grupās redzams 6. 3. 3. 9. attēlā.



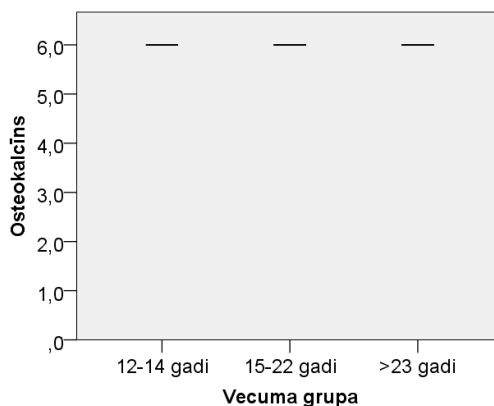
6. 3. 3. 9. attēls. **RANKL pozitīvo šūnu relatīvā daudzuma saistība ar pacientu vecumu.**

Redzes laukā: 0 – nebija redzama neviena pozitīva struktūra, 1 (0/+) – dažas pozitīvas struktūras, 2 (+) – neliels daudzums pozitīvu struktūru, 3 (+/++) – maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru, 4 (++) – vidēji daudz pozitīvu struktūru, 5 (++/+++ – vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru, 6 (+++) – ļoti daudz pozitīvu struktūru

6.3.4. Osteokalcīns (OC)

Analizējot osteokalcīna šūnu relatīvo daudzumu interrādikulārās septas audos, konstatējām, ka gan 1. grupā, gan 2. grupā, gan 3. grupā bija galvenokārt daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Osteokalcīna šūnu relatīvais daudzums 1. grupā bija 6, 2. grupā – 6, 3. grupā – 6. Osteokalcīna pozitīvo struktūru daudzuma mediānas vērtības un 95% ticamības intervāls pacientu grupās redzams 6. 3. 4. 10. attēlā.



6. 3. 4. 10. attēls. **Osteokalcīna pozitīvo šūnu relatīvā daudzuma saistība ar pacientu vecumu.**

Redzes laukā: 0 – nebija redzama neviena pozitīva struktūra, 1 (0/+) – dažas pozitīvas struktūras, 2 (+) – neliels daudzums pozitīvu struktūru, 3 (+/++) – maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru, 4 (++) – vidēji daudz pozitīvu struktūru, 5 (++/+++) – vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru, 6 (+++) – ļoti daudz pozitīvu struktūru

6.3.5. Transformējošais augšanas faktors β (TGF β)

Analizējot TGF β ekspresiju interradikulārās septas audos, konstatējām, ka 1. grupā bija galvenokārt daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru, 2. grupā bija galvenokārt vidēji daudz pozitīvu struktūru, bet 3. grupā – vidēji daudz un arī maz pozitīvu struktūru. Pēc Kruskala–Vallisa testa secinājām, ka TGF β dažādām vecuma grupām atšķiras statistiski ticami ($\chi^2 = 8,91$; $df = 2$; $p = 0,01$). TGF β šūnu relatīvā daudzuma sadalījums pacientiem dažādās pacientu vecuma grupās redzams 6. 3. 5. 8. tabulā.

6. 3. 5. 8. tabula

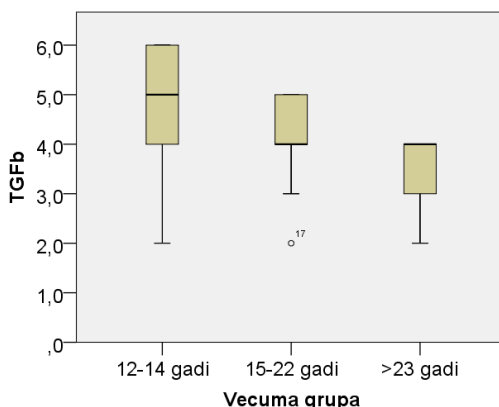
**TGF β pozitīvo struktūru daudzums dažāda vecuma pacientu grupās
interradikulārās septas audos**

Relatīvais daudzums	12–14 gadi (n)	15–22 gadi (n)	23 – 49 gadi (n)
0	-	-	-
0/+	-	-	-
+	2	1	2

(tabulas turpinājums)

+/++	0	2	4
++	3	5	9
++/+++	3	5	0
+++	5	0	0

TGFβ šūnu relatīvais daudzums 1. grupā bija $5,1 \pm 0,9$, 2. grupā – $4,5 \pm 0,5$, 3. grupā – $3,5 \pm 0,5$. TGFβ pozitīvo struktūru daudzuma mediānas vērtības un 95% ticamības intervāls pacientu grupās redzams 6. 3. 5. 11. attēlā.



6. 3. 5. 11. attēls. **TGFβ šūnu relatīvā daudzuma saistība ar pacientu vecumu**

Redzes laukā: 0 – nebija redzama neviena pozitīva struktūra, 1 (0/+) – dažas pozitīvas struktūras, 2 (+) – neliels daudzums pozitīvu struktūru, 3 (+/++) – maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru, 4 (++) – vidēji daudz pozitīvu struktūru, 5 (++/+++ – vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru, 6 (+++) – ļoti daudz pozitīvu struktūru

6.3.6. Fibroblastu augšanas faktora receptors1 (FGFR1)

Analizējot FGFR1 ekspresiju interradikulārās septas audos, konstatējām, ka 1. grupā bija izteikti daudz pozitīvu struktūru, bet 2. un 3. grupā bija vidēji daudz pozitīvu struktūru. Balstoties uz Kruskala–Vallisa testu, tika secināts, ka FGFR1 dažādām

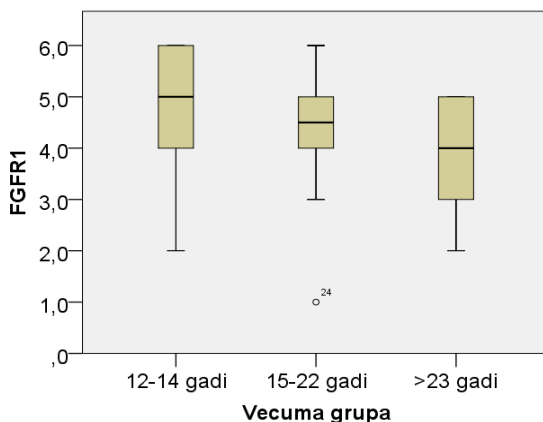
vecuma grupām neatšķiras statistiski ticami ($\chi^2 = 5,20$; $df = 2$; $p = 0,07$). FGFR1 pozitīvo struktūru daudzums kaulaudos dažādās vecuma pacientu grupās redzams 6. 3. 6. 9. tabulā.

6. 3. 6. 9. tabula

**FGFR1 pozitīvo struktūru relatīvais daudzums dažāda vecuma pacientu
interradikulārās septas audos**

Relatīvais daudzums	12–14 gadi (n)	15–22 gadi (n)	23 – 49 gadi (n)
0	-	-	-
0/+	0	1	0
+	2	0	3
+/++	1	1	3
++	2	5	3
++/+++	3	5	6
+++	7	2	0

FGFR1 pozitīvo struktūru relatīvais daudzums 1. grupā bija $4,9 \pm 1,1$, 2. grupā – $4,5 \pm 0,5$, 3. grupā – $4 \pm 1,1$. FGFR1 pozitīvo struktūru daudzuma mediānas vērtības un 95% ticamības intervāls pacientu grupās redzams 6. 3. 6. 12. attēlā.



6. 3. 6. 12. attēls. **FGFR1 struktūru relatīvā daudzuma saistība ar pacientu vecumu**

Redzes laukā: 0 – nebija redzama neviena pozitīva struktūra, 1 (0/+) – dažas pozitīvas struktūras, 2 (+) – neliels daudzums pozitīvu struktūru, 3 (+/++) – maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru, 4 (++) – vidēji daudz pozitīvu struktūru, 5 (++/+++ – vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru, 6 (+++) – ļoti daudz pozitīvu struktūru

6.3.7. Bāziskais fibroblastu augšanas faktors (bFGF)

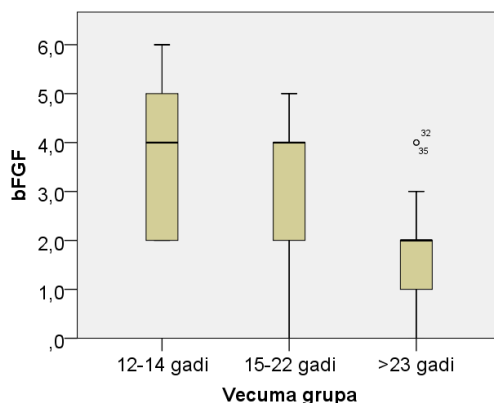
Analizējot bFGF ekspresiju interrādikulārās septas audos, konstatējām, ka 1. grupā bija neliels līdz vidējs daudzums pozitīvu struktūru, 2. grupā bija vidēji daudz pozitīvu struktūru, bet 3. grupā bija galvenokārt neliels daudzums pozitīvo struktūru. Balstoties uz Kruskala–Vallisa testu, tika secināts, ka bFGF dažādām vecuma grupām atšķiras statistiski ticami ($\chi^2 = 9,50$; $df = 2$; $p < 0,01$). bFGF pozitīvo struktūru daudzums pacientiem dažādās vecuma pacientu grupās redzams 6. 3. 7. 10. tabulā.

6. 3. 7. 10. tabula

**bFGF pozitīvo struktūru daudzums dažāda vecuma pacientu grupu
interrādikulārās septas audos**

Relatīvais daudzums	12–14 gadi (n)	15–22 gadi (n)	23 – 49 gadi (n)
0	0	1	1
0/+	0	2	5
+	7	2	6
+/++	0	1	1
++	3	7	2
++/+++	2	2	0
+++	3	0	0

bFGF struktūru relatīvais daudzums 1. grupā bija $3,8 \pm 1,2$, 2. grupā – $3,1 \pm 0,9$, 3. grupā – $1,4 \pm 0,6$. bFGF pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma mediānas vērtības un 95% ticamības intervāls pacientu grupās redzams 6. 3. 7. 13. attēlā.



6. 3. 7. 13. attēls. **bFGF pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma saistība ar pacientu vecumu**

Redzes laukā: 0 – nebija redzama neviena pozitīva struktūra, 1 (0/+) – dažas pozitīvas struktūras, 2 (+) – neliels daudzums pozitīvu struktūru, 3 (+/++) – maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru, 4 (++) – vidēji daudz pozitīvu struktūru, 5 (++/+++) – vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru, 6 (+++) – ļoti daudz pozitīvu struktūru

6.3.8. Interleikīns 6 (IL6)

Analizējot IL6 ekspresiju interradikulārās septas audos, konstatējām, ka 1. grupā bija neliels līdz vidējs daudzums pozitīvu struktūru, 2. grupā bija maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru ar dažiem izņēmumiem, bet 3. grupā galvenokārt bija vidēji daudz pozitīvu struktūru ar atsevišķiem izņēmumiem, kad to bija maz. Balstoties uz Kruskala–Vallisa testu, tika secināts, ka IL6 relatīvais daudzums dažādām vecuma grupām statistiski ticami neatšķiras ($\chi^2 = 0,49$; $df = 2$; $p = 0,78$). IL6 pozitīvo struktūru sadalījums kaulaudos dažādās vecuma pacientu grupās redzams 6. 3. 8. 11. tabulā.

6. 3. 8. 11. tabula

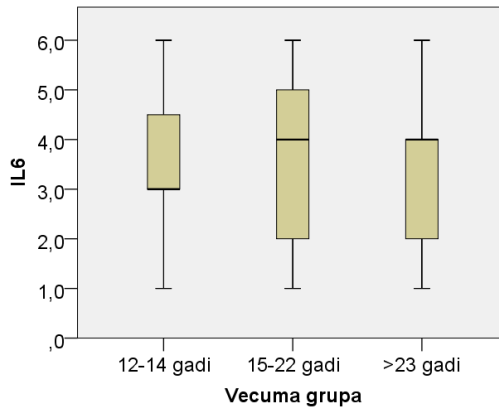
**IL6 relatīvā daudzuma sadalījums dažāda vecuma pacientu grupās
interradikulārās septas audos**

Relatīvais daudzums	12–14 gadi (n)	15–22 gadi (n)	23 – 49 gadi (n)
0	-	-	-

(tabulas turpinājums)

0/+	1	3	3
+	1	2	2
+ /++	6	1	1
++	3	4	6
++ /+++	1	3	1
+++	3	2	1

IL6 struktūru relatīvais daudzums 1. grupā bija $3,8 \pm 0,7$, 2. grupā – $4,1 \pm 0,9$, 3. grupā – $2,8 \pm 1,2$. IL6 ekspresijas mediānas vērtības un 95% ticamības intervāls pacientu grupās redzams 6. 3. 8. 14. attēlā.



6. 3. 8. 14. attēls. **IL6 pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma saistība ar pacientu vecumu**

Redzes laukā: 0 – nebija redzama neviena pozitīva struktūra, 1 (0/+) – dažas pozitīvas struktūras, 2 (+) – neliels daudzums pozitīvu struktūru, 3 (+/++) – maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru, 4 (++) – vidēji daudz pozitīvu struktūru, 5 (++/+++) – vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru, 6 (+++) – ļoti daudz pozitīvu struktūru

6.4. Apoptozes raksturojums

Analizējot apoptotisko šūnu relatīvo daudzumu interradikulārās septas audos, konstatējām, ka 1. grupā bija izteikts līdz vidējs daudzums pozitīvu struktūru, 2. grupā

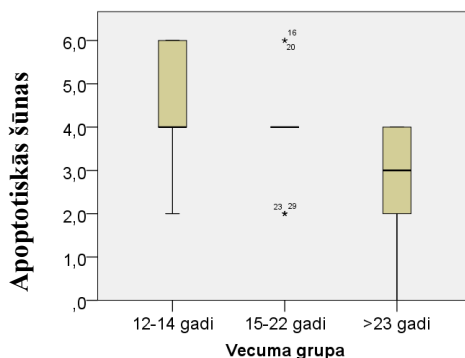
bija galvenokārt vidēji daudz pozitīvu struktūru (ar izņēmumiem maz un daudz), bet 3. grupā bija maz līdz vidēji daudz pozitīvo struktūru. Balstoties uz Kruskala–Vallisa testu, secinājām, ka apoptotisko šūnu skaits dažādām vecuma grupām statistiski ticami atšķiras ($\chi^2 = 10,82$; $df = 2$; $p = 0,004$). Apoptozes šūnu sadalījums kaulaudos dažādās vecuma pacientu grupās redzams 6. 4. 12. tabulā.

6. 4. 12. tabula

**Apoptotisko šūnu relatīvā daudzuma sadalījums dažāda vecuma pacientu grupās
interradikulārās septas audos**

Relatīvais daudzums	12–14 gadi (n)	15–22 gadi (n)	23 – 49 gadi (n)
0	0	0	0
0/+	-	-	-
+	1	3	3
+/++	1	0	3
++	4	8	4
++/+++	-	-	-
+++	5	2	0

Apoptozes šūnu relatīvais daudzums 1. grupā bija $5,1 \pm 0,9$, 2. grupā – $4,2 \pm 1,75$, 3. grupā – $3,1 \pm 0,9$. Apoptozes šūnu relatīvā daudzuma mediānas vērtības un 95% ticamības intervāls pacientu grupās redzams 6. 4. 15. attēlā.



6. 4. 15. attēls. **Apoptozes šūnu relatīvā daudzuma saistība ar pacientu
vecumu**

Redzes laukā: 0 – nebija redzama neviena pozitīva struktūra, 1 (0/+) – dažas pozitīvas struktūras, 2 (+) – neliels daudzums pozitīvu struktūru, 3 (+/++) – maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru, 4 (++) – vidēji daudz pozitīvu struktūru, 5 (+/+++) – vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru, 6 (+++) – ļoti daudz pozitīvu struktūru

6.5. Diagnozes un bFGF savstarpējā korelācija

Divu neatkarīgu izlašu vidējo rangu salīdzināšanai izmantojot Manna–Vitnija (*Mann–Whitney*) testu, konstatējām, ka abām diagnozēm statistiski ticami atšķiras tikai bFGF ekspresija ($Z = 2,04$; $p = 0,04$), bet visu pārējo faktoru sadalījums audos statistiski ticami neatšķīrās ($p > 0,05$).

Pētītie faktori saistībā ar dzimumu savstarpēji nekorelēja un statistiski ticami neatšķīrās ($p > 0,05$).

6.5.1. Dažādu faktoru relatīvā daudzuma savstarpējā korelācija

Iegūtie imūnhistoķīmisko pētījumu rezultāti tika analizēti, lai noteiktu savstarpējās korelācijas (6. 5. 1. 13. tabula), un tika konstatētas vairākas faktoru relatīvā daudzuma savstarpējās saistības.

6. 5. 1. 13. tabula

Dažādu audu faktoru savstarpējās korelācijas koeficienti (r_s) un būtiskuma (nozīmības) līmeņi (p) audos

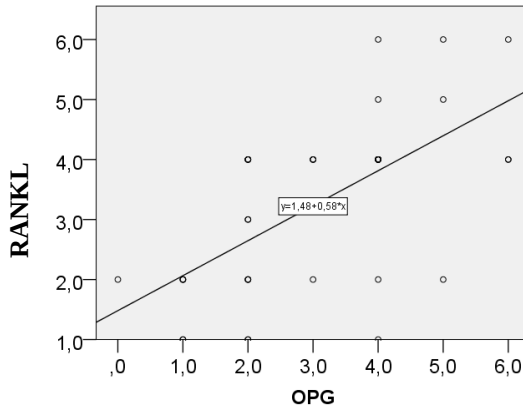
		OPG	MMP8	MMP9	RANKL	TGFβ	FGFR1	bFGF	IL6
MMP8	r_s	0,14							
	p	0,35							
MMP9	r_s	0,03	0,27						
	p	0,79	0,06						
RANKL	r_s	0,66**	0,21	0,23					
	p	0,00	0,16	0,13					
TGFβ	r_s	0,38*	0,20	0,10	0,43**				
	p	0,01	0,19	0,51	0,00				
FGFR1	r_s	0,25	0,142	0,20	0,37*	0,62**			
	p	0,09	0,35	0,18	0,01	0,00			
bFGF	r_s	0,27	0,32*	0,27	0,31*	0,48**	0,41**		
	p	0,06	0,02	0,06	0,03	0,00	0,00		

(tabulas turpinājums)

IL6	r_s	0,10	0,42**	0,30*	0,36*	0,54**	0,46**	0,36*	
	p	0,50	0,00	0,04	0,01	0,00	0,00	0,01	
TUNEL	r_s	0,42**	0,00	0,33*	0,46**	0,21	0,36*	0,10	0,19
	p	0,00	0,98	0,045	0,00	0,20	0,03	0,53	0,26

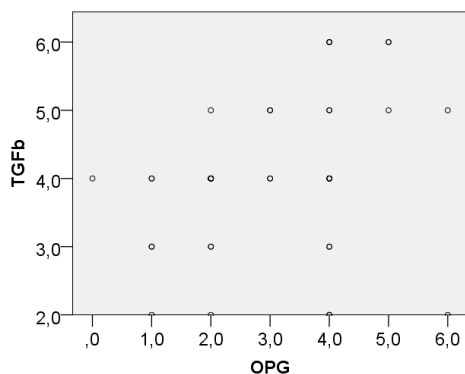
* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$.

Balstoties uz Spīrmena korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka, palielinoties OPG, pieaug RANKL šūnu skaits, jo šos abus rādītājus saista vidēja un statistiski ticama korelācija ($r_s = 0,66$; $p < 0,001$). Korelācija starp OPG un RANKL relatīvo daudzumu ir parādīta 6. 5. 1. 16. attēlā.



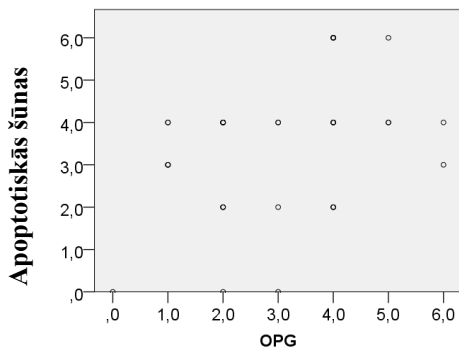
6. 5. 1. 16. attēls. **Korelācija starp OPG un RANKL relatīvo daudzumu**

Balstoties uz Spīrmena korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka starp OPG un TGFβ struktūru relatīvo daudzumu pastāv vidēja un statistiski ticama korelācija ($r_s = 0,38$; $p = 0,01$). 6. 5. 1. 17.attēlā parādīta korelācija starp OPG un TGFβ.



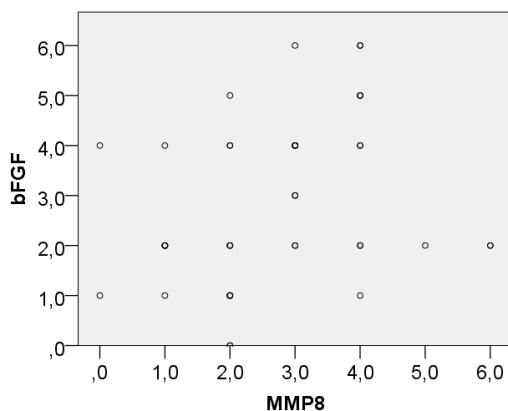
6. 5. 1. 17. attēls. **Korelācija starp OPG un TGFβ relatīvo daudzumu**

Balstoties uz Spīrmena korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka starp OPG un apoptozes pozitīvo šūnu relatīvo daudzumu pastāv vidēja un statistiski ticama korelācija ($r_s = 0,42$; $p < 0,001$). 6. 5. 1. 18. attēlā parādīta korelācija starp OPG un apoptotisko šūnu relatīvo daudzumu.



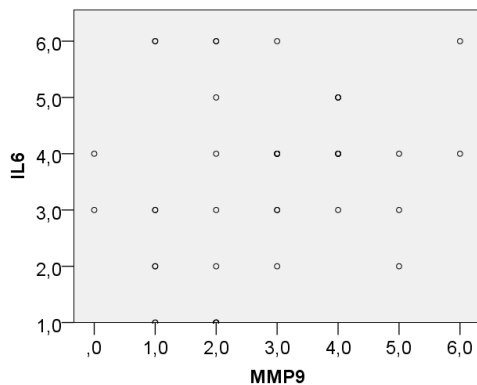
6. 5. 1. 18. attēls. **Korelācija starp OPG un apoptotisko šūnu relatīvo daudzumu**

Balstoties uz Spīrmena korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka starp MMP8 un bFGF relatīvo daudzumu pastāv vidēja un statistiski ticama korelācija ($r_s = 0,32$; $p = 0,02$; 6. 5. 1. 19. attēls).



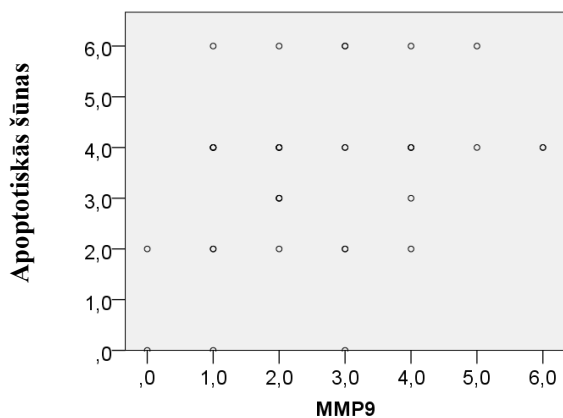
6. 5. 1. 19. attēls. **Korelācija starp MMP8 un bFGF relatīvo šūnu daudzumu**

Balstoties uz Spīrmena korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka starp MMP9 un IL6 relatīvo daudzumu pastāv vāja un statistiski ticama korelācija ($r_s = 0,30$; $p = 0,04$; 6. 5. 1. 20. attēls).



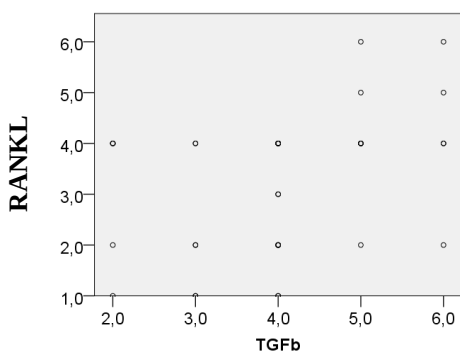
6. 5. 1. 20. attēls. **Korelācija starp MMP9 un IL6 relatīvo šūnu daudzumu**

Balstoties uz Spīrmena korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka starp MMP9 šūnu relatīvo daudzumu un apoptotisko šūnu relatīvo daudzumu pastāv vidēja un statistiski ticama korelācija ($r_s = 0,33$; $p = 0,04$; 6. 5. 1. 21. attēls).



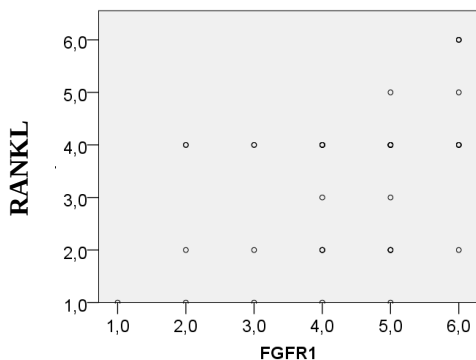
6. 5. 1. 21. attēls. **Korelācija starp MMP9 un apoptotisko šūnu relatīvo daudzumu**

Balstoties uz Spīrmena korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka starp NKpB105 un TGF β relatīvo daudzumu pastāv vidēja un statistiski ticama korelācija ($r_s = 0,43$; $p < 0,001$; 6. 5. 1. 22. attēls).



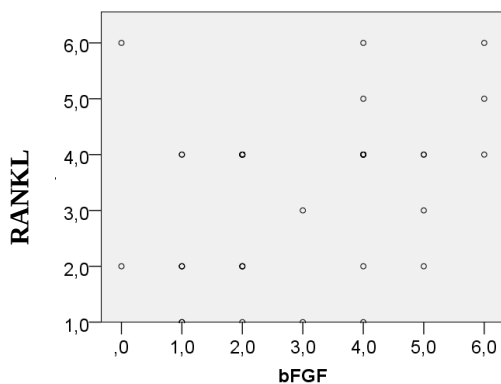
6. 5. 1. 22. attēls. **Korelācija starp RANKL un TGF β relatīvo šūnu daudzumu**

Balstoties uz Spīrmena korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka starp RANKL un FGFR1 relatīvo daudzumu pastāv vidēja un statistiski ticama korelācija ($r_s = 0,37$; $p = 0,01$; 6. 5. 1. 23. attēls).



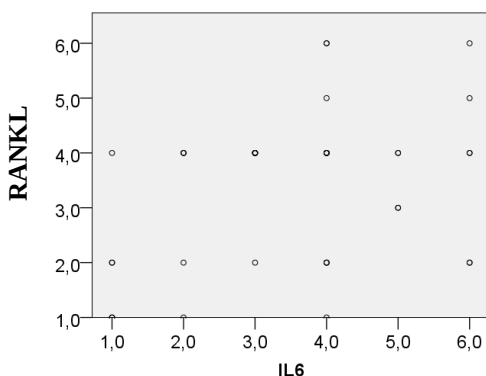
6. 5. 1. 23. attēls. **Korelācija starp RANKL un FGFR1 relatīvo daudzumu**

Balstoties uz Spīrmena korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka starp RANKL un bFGF pozitīvo struktūru relatīvo daudzumu pastāv vidēja un statistiski ticama korelācija ($r_s = 0,31$; $p = 0,03$; 6. 5. 1. 24. attēls).



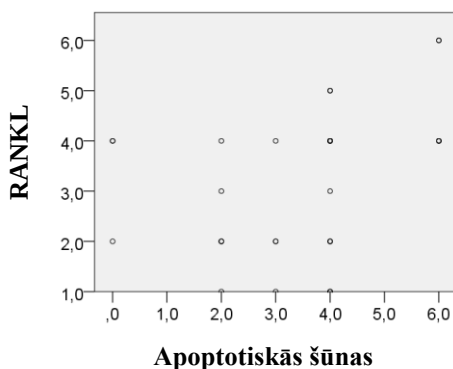
6. 5. 1. 24. attēls. **Korelācija starp RANKL un bFGF relatīvo šūnu daudzumu**

Balstoties uz Spīrmena korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka starp RANKL un IL6 relatīvo daudzumu pastāv vidēja un statistiski ticama korelācija ($r_s = 0,36$; $p = 0,01$; 6. 5. 1. 25. attēls).



6. 5. 1. 25. attēls. **Korelācija starp RANKL un IL6 relatīvo šūnu daudzumu**

Balstoties uz Spīrmena korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka starp RANKL un apoptotisko šūnu relatīvo daudzumu pastāv vidēja un statistiski ticama korelācija ($r_s = 0,42$; $p < 0,001$; 6. 5. 1. 26. attēls).



6. 5. 1. 26. attēls. **Korelācija starp RANKL un apoptotisko šūnu relatīvo daudzumu**

7. DISKUSIJA

Ortodontiskie pētījumi, kas apraksta kaula remodelācijas potenciālu, parasti ir saistīti ar jau notiekošu ārstēšanu. Tas saistīts ar ētiskiem aspektiem, kas neļauj iegūt kaula un PDS audus no pacientiem ārstēšanas procesā, ja tam nav nekāda klīniskā pamatojuma, izņemot gadījumus, kad tiek veikta kombinētā ortognātiskā ārstēšana.

Ētiskie apsvērumi neļauj veikt ortodontiskos pētījumus, izmantojot cilvēka audu paraugus. Savukārt, izmantojot pētījumos dzīvniekus, ne vienmēr korekti var attiecināt rezultātus uz cilvēku. Arī katra cilvēka individuālie parametri un vides ietekme var ieviest korekcijas rezultātos. To izskaidro cilvēka pastāvīgā mijiedarbība ar vidi, kas ir faktoru kopums, kas reālos apstākļos radīs ārstēšanas grūtības, ja ārsts ar to nebūs rēķinājies.

Mūsu pētījumā tika izmantota unikāla iespēja iegūt kaula un PDS materiālu pirms paredzētās ortodontiskās ārstēšanas, kas veikta atbilstoši ārstēšanas plānam, kurā bijusi paredzēta zobu ekstrakcija pacientiem ar lielu zobu saspiesību vai sliktas zoba stāvokļa prognozes dēļ. Preparāti atspoguļoja pacientu kaula un PDS stāvokli pirms jebkāda veida ārstēšanas, tāpēc iegūtie rezultāti ļauj izvērtēt signālmolekulu ekspresiju audos nosacītā netraucētas homeostāzes stāvoklī. Signālmolekulu ekspresijas noteikšana atkarībā no vecuma arī kļuva par mērķi, kas palīdz izvērtēt procesus, kas norit kaulā un PDS. Tieši audu molekulāro norišu signālmolekulu ekspresija nosaka ārstēšanas gaitu, ātrumu un stabilitāti, kas ir nozīmīgi ortodontiskās ārstēšanas procesā.

Grupu sadalījums atbilstoši vecumam nav nejaušs, bet atspoguļo to pacientu vecumu, kas ir būtisks kaula un to aptverošo audu remodelācijas potenciālam, no kā ir atkarīga ārstēšanas taktika un ierobežojumi, veicot ortodontisko ārstēšanu (*Proffit*, 2007). Ierobežojumi, kas tieši ir saistīti ar kaula ontogēnētisko remodelācijas potenciālu, rada lielākās problēmas ortodontiskai zobu pārvietošanai un ārstēšanas gala rezultātam.

Pacientu iedalījums pēc dzimuma bija gandrīz vienāds, tāpēc signālmolekulu ekspresija pēc dzimuma neatšķiras, ko apstiprina arī iegūtie rezultāti. Līdzīgi rezultāti iegūti arī saistībā ar pacientu materiāla veidu – lielākā daļa materiāla tika iegūta pēc nozīmētām ortodontiskām ekstrakcijām, bet neatgriezeniskā pulpīta dēļ ekstrahēto zobu īpatsvars bija tikai desmitā daļa no visām ekstrakcijām.

Mūsu pētījuma dati vēlreiz apstiprina pastāvošās fizioloģiskās kaula remodelācijas pamatnostādnes, tomēr sniedz daudz detalizētāku un individuālu augšanas un remodelēšanas faktoru ainu, ko ieguvām no pacientu interrādikulārās septas zobu ekstrakcijas vietām un kuru salīdzinājām ar pieejamo zinātnisko literatūru.

7.1. Morfoloģiskās izmaiņas audos

Analizējot pētījumā iegūtos kaulaudu un mīksto audu preparātus, kas krāsoti ar hematoksilīnu un eozīnu, gaismas mikroskopijā praktiski nekonstatējām pārmaiņas, kas atšķirtos no vispār pieņemtās normas. Izņēmums bija dažu vecāka gadagājuma pacientu *septum interradiculare* kaulu caurbējkanālu saistaudu proliferācija, kas atbilst *Ellen* (1998) un *Abiko* (1998) iegūtiem rezultātiem. Kopumā 1. un 2. grupas pacientiem visiem izmeklētajiem preparātiem morfoloģiskā atrade bija atbilstoši normai, bez izteiktām struktūras izmaiņām un ar normai atbilstošu histoloģisko ainu.

Interrādikulārās septas kaulaudi 3. grupas pacientiem bija ar nevienmērīgu kaula mineralizāciju, kā arī konstatējām saistaudu proliferāciju osteonu kanālos. Tika arī konstatēta atsevišķu asinsvadu sklerotizācija osteonu kanālos. Tomēr ap 30% gadījumu tika atrasta arī vispārējai normai atbilstoša aina.

7.2. Augšanas faktori

Literatūrā ir maz datu, kas ļautu spriest par augšanas faktoru sadalījumu cilvēka kaulaudos dažādās vecuma grupās, bet ir pieejami daži literatūras avoti un publikācijas, kur līdzīgu augšanas faktoru sadali nosaka dažādām dzīvnieku sugām.

TGFβ lielāka ekspresija mūsu pētījumā tika novērota 1. grupas, vidēja ekspresija – 2. grupas pacientiem, bet 3. grupas pacientiem tā jau bija samazināta. Tas liecina par to, ka TGFβ ekspresija samazinās atkarībā no vecuma. Šos rezultātus apstiprina arī *Sanchez-Capelo* (2005) pētījums, kurā autors uzskata, ka TGFβ1 palīdz veidot līdzsvaru starp šūnu augšanu un apoptozi. Ir novērots, ka TGFβ1 spēj inducēt apoptozi, lai iznīcinātu nenobriedušās šūnas. Tas atbilst pieņēmumam, ka augošā kaulā un to aptverošās struktūrās (piemēram, PDS) ir lielāka mitotiskā aktivitāte, kas ar vecumu samazinās.

Gan Rosier (1998), gan Oka (2007) savos pētījumos apgalvo, ka TGF β izdala ir saistīta ar periostālo audu proliferāciju. Turklāt visizteiktākais krāsojums tika novērots skrimšļa šūnu augšanas un endohondrālās pārkaulošanās zonās, jo TGF β izdalās vietās, kur notiek aktīva kaulaudu reģenerācija.

Verrecchia un Mauviel (2002) secina, ka ekstracelulārās matrices veidošanā TGF β darbojas kā hemotaksisks peptīds, kas tieši ietekmē fibroblastus. TGF β darbojas kā starpnieks ECM noārdošām proteāzēm un to inhibitoriem, kā rezultātā pilnībā rodas ECM veidojošie proteīni. Tātad, notiekot aktīvai kaula remodelācijai, TGF β intensīvā ekspresija veicina kaula augšanas procesus, kas vairāk ir novērojami pubertātes vecuma pacientiem un jauniešiem, ko novērojām arī mūsu pacientiem. Pacientiem pēc aktīvās augšanas perioda šie procesi norit lēnāk, tāpēc arī TGF β ekspresija samazinās.

Citā pētījumā Kloss un Gasner (2006), novērojot pacientus vecumā no 15 līdz 50 gadiem, konstatēja TGF β ekspresijas samazinājumu atkarībā no vecuma, bet saistībā ar iespējamo osteoporozi. Protams, to nevar pilnībā attiecināt uz sejas un žokļa rajonu, bet var secināt, ka TGF β ekspresija ir nozīmīga kaula homeostāzei.

Tocharus (2004) pētījumā ar pelēm nonāca pie līdzīga rezultāta, parādot, ka TGF β ekspresijas samazinājums novecojot ir saistīts ar ECM proteāžu aktivitāti, kas nepieciešams audu proliferācijai un diferenciācijai.

Fibroblastu augšanas faktoram (FGF) un tā receptoriem (FGFR) pēc Böttcher (2005) atzinumiem ir nozīme dažādos atšķirīgos šūnu procesos, piemēram, hemotaksē, šūnu migrācijā, diferenciācijā un apoptozē. Mūsu pētījumā mēs atradām izteiktu FGFR1 ekspresiju pacientu kaulaudos, un pēc iegūtajiem rezultātiem ir redzams, ka tā ekspresija nav atkarīga no pacientu vecuma. Turpretī bFGF ekspresija korelē ar pacientu vecumu, no kā izriet, ka stimulējošā receptoru augšanas faktoru ekspresija notiek samērā vienādi, ar nelielu prevalenci pubertātes un nobriešanas vecumā, bet augšanas faktoru ekspresija samazinās ar vecumu. Vairāki autori ziņo par fibroblastu augšanas faktora nozīmi periodonta remodelācijas procesā, stimulējot fibroblastu proliferāciju (Ornitz, 2007; Mina, 2007). Līdz ar to var uzskatīt, ka mūsu pētījumā iesaistīto pacientu periodonta audiem raksturīgs pietiekošs reģenerācijas potenciāls, kas vairāk ir izteikts 1. un 2. grupas pacientiem.

Mūsu pētījumā FGFR1 ekspresija kaulaudos no *septum interrediculare* visās grupās bija vidēji līdz ļoti daudz struktūrās redzes laukā, bet bFGF ekspresija variēja no

vidēji līdz ļoti daudz 1. un 2. grupā, bet līdz maz un vidēji daudz – 3. grupā. Šos rezultātus netieši apstiprina *Naski* (1998) pētījums ar žurkām, kurā bFGF un FGFR1 ekspresija tika konstatēta tieši jaunākās paaudzes dzīvnieku grupā, salīdzinot ar jau nobriedušām. Autors secina, ka kaula un pieguļošo audu formēšanās un nobriešanas fāzē augšanas faktoru ekspresijas intensitāte nosaka straujāku audu apjoma pieaugumu, kas veicina tālāku augšanu un noformēšanos. Tas liecina tieši par jaunāku indivīdu labāku adaptāciju remodelācijas procesiem.

7.3. Kaula ekstracelulārās matricē proteīni

Osteokalcīns ir proteīns, kas nodrošina kaulaudu matricē mineralizāciju. Osteokalcīns mūsu pacientiem uzrādīja bagātīgu ekspresiju kaulā visās grupās neatkarīgi no pacientu vecuma, kas liecina, ka mineralizācija noris vienlīdz aktīvi visiem mūsu pētītajiem pacientiem.

Osteokalcīnu izdala nobrieduši osteoblasti, odontoblasti un hondrocīti. *Kloss* ar līdzautoriem (2008) norāda, ka osteokalcīns darbojas kā kaula matricē signāls un stimulē cilvēka osteoklastu migrāciju un adhēziju. Osteokalcīnam, kas ir specifisks kaula matricē proteīns, ir nozīmīga loma resorbcijas procesā. Pētījumā ar žurkām tika konstatēta tā aktivitātes samazināšanās ar vecumu vienlaikus ar osteopontīna ekspresiju, ko mēs savā pētījumā nenoteicām. Līdzīgā pētījumā *Ikeda* (1996) skaidro izteiktu osteokalcīna izdali, osteoblastu aktivitātes samazināšanos un to reducēto spēju atbildēt uz šīs signālmolekulas stimulu. Tas daļēji izskaidro to, ka līdz ar vecumu palielinās kaula zuduma risks, jo osteoblastiskā aktivitāte, neskatoties uz stimulējošā signāla esamību, samazinās, tāpēc samazinās arī kaula spēja veikt adekvātu remodelācijas procesu atbilstoši pieliktam ortodontiskam spēkam. Rezultātā ir novērojams kaula zudums un palielinās risks smaganas recesijām, kas reti novērojams jaunākiem pacientiem.

7.4. Matricē metālproteināzes

Mūsu pētījumā audu paraugos no interrādikulārās septas tika konstatēts vidējs MMP8 un MMP9 pozitīvo struktūru daudzums visās pacientu grupās, kas nekorelēja ar

vecumu. Izteikta MMP ekspresija tika novērota tikai dažos 3. grupas paraugos, ko varētu skaidrot ar ECM degradējošiem procesiem, kas vairāk ir novērojami pieaugušiem pacientiem. Tas saskan arī ar *Lamaitre* un līdzautoru (2006) pētījumu, kurā lielāku MMP ekspresiju novēroja tieši pieaugušiem pacientiem. Pēdējiem novecošanās procesus pavada arī dažas patofizioloģiskas reakcijas, piemēram, osteoporozes veidošanās.

MMP pieder pie degradācijas faktoriem, kas spēj šķelt dažādus ekstracelulārās matricēs komponentus (*Verma*, 2007). Tāpat MMP piedalās daudzos bioloģiskos procesos, piemēram, angiogēnēzē, audu reģenerācijā un apoptozē (*Lemaitre*, 2006). Līdzīgus secinājumus savā pētījumā, analizējot MMP darbību, izdara arī *Ikeda* ar līdzautoriem (2001). Autori atklāj, ka MMP ekspresija un aktivitāte pieaugušu cilvēku audos normāli ir samērā zema, bet tā ievērojami palielinās dažādu patoloģisku procesu gadījumos, ko rada audu destrukcija, piemēram, iekaisuma slimības, audzēji un to metastāzes.

Manello (2006) savā darbā apgalvo, ka MMP un to inhibitoriem piemīt multipotents efekts ar lielu aktivācijas spektru gan šūnu attīstības laikā, gan to fizioloģiskā darbībā. Tāpat šie degradējošie enzīmi veicina arī citu molekulu ekspresiju, šūnas saistītas ar kaulu un to aptverošo audu attīstību, nobriešanu un remodelāciju. *Inui* (1999) secināja, ka, notiekot osteogēnēzei, MMP nepieciešams osteoklastu migrācijai uz kaula virsmu, un tieši MMP9 remodelācijas procesu laikā piedalās arī osteoblastu aktivācijā.

Mūsu pētījuma rezultāti liecina, ka savstarpēji MMP8 un MMP9 šūnu daudzums nekorelē, bet pastāv statistiski ticama korelācija starp MMP8 un IL6, kā arī MMP9 un IL6 pozitīvo struktūru relatīvo daudzumu. Pēdējais kā iekaisuma mediators darbojas kopā ar degradācijas enzīmiem. Tas liecina par ciešu degradācijas enzīmu saikni ar citokīna IL6 funkcijām, proti, IL6 veicina citu citokīnu aktivāciju kaula degradācijas procesā. Šī sakarība parādās arī *Bourlier* (2005) un līdzautoru *in vitro* pētījumā, kur šo signālmolekulu ekspresija ir savstarpēji atkarīga.

7.5. Citokīni

Starp vecumu un IL6 ekspresiju netika atrasta statistiski ticama korelācija. IL6 kaulaudu šūnās visās vecuma grupās tika novērots vidēji daudz. IL6 relatīvais daudzums

savstarpēji korelēja arī ar TGFβ, bFGF, FGFR1 un RANKL, kas liecina par IL6 nozīmi fizioloģiskās norisēs, notiekot remodelācijas procesiem, gan arī ortodontiskās ārstēšanas laikā.

Pie līdzīgiem secinājumiem nonāca arī *Alfons* ar līdzautoriem (2004), kas savā pētījumā ar pelēm arī novēroja IL6 ekspresiju neatkarīgi no vecuma. Autori secināja, ka IL6 piemīt augstas iekaisuma mediatora īpašības, kas ietekmē gan skrimšļa, gan kaula remodelācijas spējas.

Citā pētījumā *Maugeri* (2005) norāda uz IL6 būtisku nozīmi osteoģenēzē, osteoklastoģenēzē un kaula remodelācijas procesos. Autors secina, ka IL6 ekspresijas un aktivācijas izmaiņas izraisa smagas patoloģijas – periodontītu, artrītu un osteoporozi.

Benatti ar līdzautoriem (2006) savā pētījumā secināja, ka gan IL6, gan IL8 ekspresija nav saistīta ar novecošanas procesiem, bet to vairāk ietekmē fizioloģiskie un patofizioloģiskie procesi. Citā savā pētījumā *Benatti* (2009) secināja, ka vecums neietekmē IL6 un arī citu interleikīnu ekspresiju, bet vecuma izmaiņas skar šūnas, kas negatīvi ietekmē to spēju proliferēt.

Visas autoru atziņas liek secināt, ka IL6 piedalās vairumā svarīgu fizioloģisku procesu un tā darbības spektrs ietekmē ne tikai osteoģenēzi, bet arī citas svarīgas organisma funkcijas. Par to liecina arī liels daudzums citu pētījumu par interleikīniem, kas sniedzas ārpus sejas-žokļa rajona un aptver visu cilvēka organismu. Tādejādi IL6, iespējams, ir multifunkcionāla ietekme uz visiem audiem.

7.6. Kaula starpšūnu telpas funkcionālie proteīni

Mūsu pētījuma ietvaros pacientiem interradikulārās septas paraugos tika noteikti arī NKPb105 proteīns, kas literatūras avotos vairāk ir zināms kā RANKL (*receptor activator nuclear kappa ligand*) jeb nukleārā kapa faktora receptora ierosinātājs. Rezultāti rāda, ka RANKL ekspresija ar statistisku ticamību samazinās līdz ar vecumu. Mūsu dati rādīja, ka RANKL ekspresija 1. grupā bija daudz šūnās, 2. grupā – vidēji daudz šūnās un 3. grupā tā bija no maz līdz vidēji daudz šūnās.

Tāpat kā RANKL, arī OPG ekspresija statistiski ticami samazinājās līdz ar vecumu. Atšķīrās šo struktūru relatīvais daudzums šūnās: 1. grupā struktūru bija izteikti daudz, 2. grupā – vidēji daudz un 3. grupā – maz.

Tādi rezultāti var izskaidrot, kāpēc līdz ar vecumu kaula zudums ir lielāks un samazinās gan kaula reģenerācijas, gan remodelācijas potenciāls. Samazinoties OPG ekspresijai un prevalējot RANKL ekspresijai, notiek osteoklastiskās darbības stimulācija, kad kaulu degradējošo šūnu darbības rezultātā samazinās tā apjoms, blīvums un struktūra.

Tā kā RANK/RANKL sistēma un OPG ir pretēji darbojošas signālmolekulas, tad varētu gaidīt, ka 1. un 3. grupas pacientiem RANKL un OPG ekspresija būs pretēji proporcionāla, uz ko norāda *Cao* (2003) savā *in vitro* un *in vivo* pētījumā ar pelēm. Salīdzinot mūsu rezultātus ar *Cao* pētījumu, ir redzama atšķirība, proti – cilvēku kaulaudu paraugos pretēji proporcionālu RANKL un OPG ekspresijas samazinājumu nenovērojām. To varētu skaidrot ar to, ka *Cao* pētījums ir veikts ar dzīvniekiem un to nevar īsti interpretēt cilvēka materiālā. Savā diskusijā autors arī norāda, ka šūnu kultūrās iegūtie rezultāti ir diskutabli, jo nevar precīzi noteikt šūnu vecumu, tāpēc pilnībā attiecināt šos rezultātus uz cilvēku nebūtu pareizi.

Narducci (2011) savā rakstā, kas apkopo vairāku RANK/RANKL pētījumu datus, norāda uz šīs signālmolekulas nozīmi visā kaula remodelācijas procesā. Gadā tiek remodelēti aptuveni 10% no visa organisma kaulu apjoma. Šo procesu regulē šūnas, kas darbojas kā antagonisti, un arī RANKL un OPG pēc savas būtības ir antagonisti. Tāpēc nav iespējams šīs molekulas aplūkot atsevišķi. Kā norāda autore, šo molekulu ekspresija ir atkarīga no vecuma, bet to attiecība mainās atkarībā no remodelācijas procesa, proti – vai tas ir fizioloģisks, vai arī patoloģisks.

Tādējādi iepriekš minēto autoru dati sakrīt ar mūsu atradi, ka OPG relatīvo daudzumu ietekmē vecums.

Hofbauer ar līdzautoriem (2000) savā pētījumā atzīmē, ka vislielākās izmaiņas, kas saistītas ar novecošanas procesu, rada osteoporozes attīstību. Tas dramatiski ietekmē kaula īpašības.

Ja RANKL un OPG attiecība skar gados jaunus pacientus, tad, kā savā pētījumā atzīmē *Rouster-Stevens* (2007), visbiežāk attīstās juvenīlais idiopātiskais artrīts. Savā pētījumā autors atzīst, ka izmaiņas šo molekulu sistēmas darbībā rada neatgriezeniskas sekas kaulaudos.

Venuraju (2010) pētījums, kas gan vairāk ir saistīts ar kardioloģiju, norāda uz OPG palielinātas izdales ietekmi uz koronāro asinsvadu slimības attīstību, jo palielināta OPG ekspresija stimulē koronāro asinsvadu kalcifikāciju.

Arī Kosteniuk (2005) savā pētījumā ar trušiem konstatēja OPG un RANKL ekspresijas samazinājumu atkarībā no vecuma. Kā secina autors, tad šo signālmolekulu ekspresijas samazinājums ir tieši saistīts ar vecumu, jo, organismam novecojot, samazinās arī šūnu spēja ekspresēt šīs vielas nepieciešamā daudzumā.

7.7. Apoptoze kaulaudos un PDS

Pēc Bodine (2008) teiktā, remodelācijas cikla beigās nobriedušiem osteoblastiem ir trīs dažādi tālākie attīstības ceļi. Osteoblasti var kļūt vai nu par osteocītiem mineralizētā kaula matricē, vai arī par šūnām, kas vienā kārtā izvietojas augoša kaula ārējā virsmā un pasargā kaula matrici no osteoklastiem, savukārt $\frac{3}{4}$ no šūnām kļūst apoptotiskas. Visu šo procesu līdzsvarota darbība nodrošina kaula remodelāciju un pārbūvi. Ir noskaidrots, ka kaula metabolisma galvenie regulatori, piemēram, TGF β , RANKL un OPG, kā arī citi augšanas faktori un citokīni, integrīni, estrogēni, glikokortikoīdi un parathormons, modulējot apoptozes procesu, regulē osteoblastu un osteocītu dzīves ilgumu (Chan, 2002).

Mūsu pētījumā apoptotisko šūnu skaits interrādikulārajā septā samazinājās līdz ar pacientu vecumu (konstatējām, ka apoptotisko šūnu daudzums interrādikulārajā septā vecākiem pacientiem bija mazāks). Tas liecina, ka līdz ar vecumu kaula un periodonta audu remodelācija noris lēnāk. Pirmajā vecuma grupā (12–14 gadi), iespējams, kaula pārbūve notiek ātrāk un intensīvāk, bet, palielinoties pacientu vecumam un īpaši pieaugušiem pacientiem 3. grupā (23–49 gadi) apoptozes process vairs nav tik straujš.

Līdz ar remodelācijas procesu notiek intensīvāka šūnu migrācija un fizioloģiskā darbība, kas izskaidro apoptozes skarto šūnu prevalenci. To īpaši labi novēro kaulaudos, jo osteocītu un osteoblastu dzīves ilgums, salīdzinot ar pārējām organisma šūnām, ir daudz ilgāks. Osteocītiem tas var sasniegt pat 10 gadus (Mescher, 2013). Weinstein (2003) savā pētījumā pēdējo novērojumu saista ar osteoblastu skaitu: jo lielāks ir osteoblastu skaits konkrētā paraugā, jo lielāka iespēja konstatēt apoptotiskas šūnas.

Piemēram, cilvēkam biopsijas materiālā ir apmēram 20–50 osteoblastu, bet tādā pašā biopsijas materiālā grauzēja kaulā ir 800–1200 osteoblastu.

Analizējot mūsu iegūto rezultātu korelācijas, konstatējām, ka pastāv statistiski ticama cieša korelācija starp OPG, RANKL un FGFR1 un apoptozes šūnu skaitu – palielinoties OPG, RANKL un FGFR1 ekspresijai, pieaug arī apoptotisko šūnu skaits interradikulārās septas audos. Tas liecina par palielinātu šūnu proliferāciju, kas nepieciešama, lai nodrošinātu aktīvu augšanu un nepārtraukti aktīvu remodelācijas procesu. Mūsu atradi apstiprina arī *Xing* (2005) veiktais pētījumu apkopojums, kā arī *Khosla* (2002) pētījums, kas norāda uz RANKL un apoptozes korelāciju.

Ir būtiski atzīmēt, ka gan RANKL, gan OPG regulē osteoklastu proliferāciju, diferenciaciju un nobriešanu, tāpēc arī likumsakarīga ir to sasaiste ar apoptotiskiem procesiem, kas notiek kaulaudu formēšanas un remodelācijas procesā, kas acīmredzot ontogēnētiskā aspektā ir aktuāla arī mūsu pētītajiem pacientiem.

8. KOPSAVILKUMS

Kaulaudu morfoģenēzē svarīgo augšanas faktoru un to receptoru (TGFβ, FGFR1), kaula ekstracelulārās matricas proteīna (OC), deģenerācijas enzīmu (MMP8, MMP9), kaula starpšūnu telpas funkcionālo proteīnu (RANKL, OPG) un apoptozes rādītāji uzrāda atšķirīgus rezultātus kaulaudos un PDS atkarībā no pacientu vecuma.

3. grupas pacientu (23–49 gadi) kaulaudos novērojama nevienmērīga mineralizācija, asinsvadu skleroze un saistaudu proliferācija osteonu kanālos. Turpretī jaunākiem pacientiem morfoloģiskā atrade atbilst histoloģiskai normai visiem izmeklētajiem preparātiem.

Mūsu pētījuma rezultāti liecina, ka, palielinoties pacientu vecumam, notiek dažu signālmolekulu, piemēram, OPG, RANKL, TGFβ, ekspresijas daudzuma samazinājums, ar vecumu samazinās arī apoptoze. Vislielākais apoptotisko šūnu skaits konstatēts 1. pacientu grupā, kurā tika ietverti pacienti pubertātes vecumā, kas atbilst vispārējai kaulaudu remodelācijas koncepcijai.

Savstarpējā MMP8, MMP9 un IL6 korelācija tiek izskaidrota ar IL6 darbības spektru, kas ietver sevī daudz funkcionālu procesu, kas fizioloģiski notiek šūnu darbībā un arī saistībā ar patoloģiskām parādībām, kuras mēs savā darba neesam pētījuši. Interleikīnu darbība ir apjomīga, un tam ir nepieciešami tālāki padziļināti pētījumi.

Kopumā pētījuma rezultāti liecina par audu remodelācijas potenciāla īpatnību daudzveidības atkarību no pacienta vecuma. Ir apstiprinājušies mūsu hipotēzē izvirzītie mērķi, kas neapšaubāmi pierāda cilvēka novecošanās sarežģīto mehānismu. Tas ietver sevī visu aprakstīto un arī daudzu citu faktoru mijiedarbību, kas rezultātā būtiski ietekmē šūnu darbību un spēju pielāgoties ārējiem faktoriem. Tieši ārējie faktori – ortodontiskajā ārstēšanā pieliktie mehāniskie spēki – nosaka ārstēšanas iznākumu un prognozi. Imūnhistoķīmiskie pētījumi varētu palīdzēt iedziļināties un izskaidrot biomehāniskos procesus, kas būtībā ļautu ortodontiem prognozēt pacientu ārstēšanas ilgumu.

9. SECINĀJUMI

1. Interradikulārās septas kaulaudu novecošanas process nekorelē ar dzimumu, bet korelē ar pašu novecošanos. Kopējā morfoloģiskā aina intaktos interradikulārās septas novecojošos kaulaudos ietver nevienmērīgu kaulaudu mineralizāciju, asinsvadu sklerotizāciju un saistaudu proliferāciju osteonu kanālos.

2. Līdz ar vecumu interradikulārās septas kaulaudos statistiski ticami samazinās TGF β , liecinot par kaula aktīvās augšanas indukcijas un kaula remodelācijas mazināšanos, pavājinoties programmētās šūnu nāves mehānismam.

3. Interradikulārās septas kaulaudiem un periodonta saitēm raksturīga ar vecumu nesaistīta intensīva FGFR1 izdale, liecinot par FGFR1 stabilo inducējošo ietekmi jebkuros mezodermas izcelsmes audos. bFGF samazināšanās interradikulārās septas audos ontogēnētiskā aspektā pamato kaulaudu metabolo procesu samazināšanos, kas nav atkarīga no faktora 1. tipa receptoriem.

4. Izteikta, ar vecumu nesaistīta osteokalcīna (OC) izdalīšanās interradikulārās septas kaulaudos pamato gan kaulaudu mineralizāciju, gan šo kaulu pamatvielas proteīnu kā nespecifisko audu pārmaiņu marķieri.

5. MMP8 un MMP9 izdalīšanās nav atkarīga no interradikulārās septas novecošanās, bet no kaulu augšanas procesu un citu citokīnu izdales stimulācijas, ko pierāda abu enzīmu statistiski ticamā korelācija ar IL6.

6. Būtiska IL6 daudzuma izdalīšanās visu vecumu pacientu interradikulārās septas audos liecina par šī citokīna multifunkcionālo dabu un saikni ar lokāliem kaula remodelācijas procesiem.

7. Statistiski ticama OPG un RANKL daudzuma samazināšanās līdz ar pacienta vecumu pierāda kaulaudu šūnu funkcionālās aktivitātes samazināšanos ontoloģiskā aspektā, vienlaikus samazinoties arī šūnu proliferācijai.

8. Apoptotisko šūnu daudzuma statistiski ticamā samazināšanās interradikulārās septas cilvēka kaulaudos līdz ar vecumu liecina par kaula remodelācijas iespēju samazināšanos. OPG, RANKL, TGF β un apoptozes savstarpējā korelācija liecina par kopējās interradikulārās septas šūnu aktivitātes, osteoklastiskās aktivitātes, kaula augšanas un remodelācijas potenciāla mazināšanos ontogēnētiskā aspektā.

10. DARBĀ IZMANTOTĀ LITERĀTŪRA

1. Abiko Y., Shimizu N. Effect of aging on functional changes of periodontal tissue cells // *Ann Periodontol*, 1998, 3(1): 350–369.
2. Alfons S. K. Male IL-6 gene knock out mice developed more advanced osteoarthritis upon aging // *Osteoarthritis and Cartilage*, 2005; 13: 66–73.
3. Alhashimi N., Frithiof L., Brudvik P., Bakht M. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines // *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 2001; 119: 307–312.
4. Aughey E., Frye F. L. Comparative Veterinary. Histology with Clinical Correlates // 1st Ed. / J. Northcott. London: Manson Publishing Ltd, 2001. – Pp.143–148.
5. Benatti B. B. Periodontal healing may be affected by aging: A histologic study in rats // *J Periodontal Res*, 2006; 41(4): 329–333.
6. Benatti B. B., Silverio G. K., Casati M. Z. et al. Inflammatory and bone-related genes are modulated by aging in human periodontal ligament cells // *Cytokine*, 2009; 2: 176–181.
7. Bocato-Bellemin A. L., Elkaim R., Abehsera A. et al. Expression of mRNAs encoding for α and β integrin subunits, MMPs and TIMPs in stretched human periodontal ligament and gingival fibroblasts // *Journal of Dental Research*, 2000; 79: 1712–1716.
8. Bodine P. Wnt signaling control of bone cell apoptosis // *Cell Res.*, 2008; 18: 248–253.
9. Bourlier V. Protease inhibitor treatments reveal specific involvement of matrix metalloproteinase-9 in human adipocyte differentiation // *J Pharmacol Exp Ther*, 2005; 312(3): 1272–1279.
10. Böttcher R., Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development // *Endocrine Review*, 2005; 26: 63–77.
11. Cao J., Venton L., Sakata T. et al. Expression of RANKL and OPG correlates with age-related bone loss in male C57BL/6 mice // *J. Bone Miner. Res.*, 2003; 18: 270–277.
12. Caton M. P. Comparative action of carbocyclic thromboxane A(2) stereoisomers on platelets // *Eur J Med Chem*, 2000; 35(12): 1099–1107.
13. Cattaneo P. M., Dalstra M., Melsen B. The Finite Element Method: a Tool to Study Orthodontic Tooth Movement // *Journal of Dental Research*, 2005; 84(5): 428–433.
14. Chan G. K. Age-related bone loss: old bone, new facts // *Gerontology*, 2002; 48(2): 62–71.
15. Ellen R. P. Periodontal disease among older adults: what is the issue? // *Periodontol.*, 1998; 16: 7–8.
16. Garant P. R. Oral Cells and Tissues. Quintessence publishing, 2003. – Pp. 153–173.
17. Garcia-Lopez S. et al. Mechanical deformation inhibits IL-10 and stimulates IL-12 production by mouse calvarial osteoblasts in vitro // *Archives of Oral Biology*, 2005; 50: 449–452.
18. Graber T. Orthodontics: Current Principles and Techniques. – Elsevier Mosby, 2005. – Pp. 221–289.

19. He G. Compression and tension: differential effects on matrix accumulation by periodontal ligament fibroblasts in vitro // *Connective Tissue Research*, 2004; 45: 28–39.
20. Hofbauer L. C., Hofbauer S., Khosla et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption // *J. Bone Miner. Res.*, 2000; 15: 2–12.
21. Hsu S., Raine L., Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin peroxidase complex in immunoperoxidase technics // *Am J Clin Pathol*, 1981; 75: 816–821.
22. Ikeda T., Utsuyama M., Hirokawa K. Expression profiles of receptor activator of nuclear factor kappa-b ligand, receptor activator of nuclear factor kappa-b, and osteoprotegerin messenger RNA in aged and ovariectomized rat bones // *J Bone Miner Res.*, 2001; 16: 1416–1425.
23. Inui T. Matrix metalloproteinases and lysosomal cysteine proteases in osteoclasts contribute to bone resorption through distinct modes of action // *Biochem Biophys Res Commun.*, 1999; 29: 258(1): 173–178.
24. Itoh N. The fgf families in humans, mice and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism and disease // *Biol Pharm Bull.*, 2007; 10: 1819–1825.
25. Kanzaki H., Chiba M., Takahashi I. Local OPG Gene Transfer to Periodontal Tissue Inhibits Orthodontic Tooth Movement // *Journal of Dental Research.*, 2004; 83(12): 920–925.
26. Khosla S., Arrighi H., Melton L. J. et al. Correlates of osteoprotegerin levels in women and men // *Osteoporos Int.*, 2002; 13: 394–399.
27. Kloss F. R., Gassner R. Bone and aging: effects on the maxillofacial skeleton // *Exp Gerontol.*, 2006; 41(2): 123–129.
28. Kloss F. R., Gassner R.. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan // *Aging Cell*, 2008; 6: 745–757.
29. Kosteniuk P. J. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength // *Curr Opin Pharmacol.*, 2005; 5(6): 618–625.
30. Lamaitre V., D'Armiento J. Matrix metalloproteinases in development and disease // *Birth Defects Research*, 2006; 78: 1–10.
31. Long P. Low magnitude of tensile strain inhibits IL-1 β -dependent induction of pro-inflammatory cytokines and induces synthesis of IL-10 in human periodontal ligament cells in vitro // *Journal of Dental Research.*, 2001; 80: 1416–1420.
32. Malcolm R. Calcium waves in fluid flow stimulated osteoblasts are G protein mediated // *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2006; 326: 31–38.
33. Masella R. S. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement // *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 2006; 129: 458–468.
34. Maugeri D. Interleukin-18 (IL-18) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in post-menopausal osteoporosis // *Arch Gerontol Geriatr.*, 2005; 40(3): 299–305.
35. Meikle M. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt // *Eur J Ortho*, 2006; 28: 221–240.

36. Mescher A. L. Changes in the inflammatory response to injury and its resolution during the loss of regenerative capacity in developing *Xenopus* limbs // *PLoS One*, 2013; 20: 8–11.
37. Mina M., Havens B. FGF signaling in mandibular skeletogenesis // *Orthod Craniofacial Res.*, 2007; 10: 59–66.
38. Mumm S. Heritable disorders of the RANKL/OPG/RANK signaling pathway // *J Musculoskelet Neuronal Interact.*, 2004; 4: 254–267.
39. Narducci P. Receptor Activator for Nuclear Factor kappa B Ligand (RANKL) as an osteoimmune key regulator in bone physiology and pathology // *Acta Histochem.*, 2011; 113(2): 73–81.
40. Naski M. C. FGF signaling in skeletal development // *Front Biosci.*, 1998; 3: 781–794.
41. Negoescu A., Guillermet C., Lorimer P. TUNEL apoptotic cell detection in archived paraffin-embedded tissues // *Biochemica*. 1998; 3: 36–41.
42. Oka K., Oka S., Sasaki T., et al. The role of TGF-beta signaling in regulating chondrogenesis and osteogenesis during mandibular development // *Dev Biol.*, 2007; 303(1): 391–404.
43. Ornitz D., Itoh N. Fibroblast growth factors // *Genome Biology*, 2001; 2(3): 3005.1–3005.12.
44. Pilmane M., Rumba I., Sundler F., Luts A. Patterns of distribution and occurrence of neuroendocrine elements in lungs of humans with chronic lung diseases // *Proc Latvian Academy of Sciences. Section B*, 1998; 53: 144–152.
45. Proffit W. R., Fields H. Jr., Sarver D. *Contemporary Orthodontics*. – 4th ed. – Elsevier, Mosby, 2007. – Pp. 331–393.
46. Redlich L. The effect of centrifugal force on mRNA levels of collagenase, collagen type-I, tissue inhibitors of metalloproteinases and β -actin in cultured human periodontal ligament fibroblasts // *Journal of Periodontal Research*, 2004; 39: 27–32.
47. Rosier R. N. The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing // *Clin Orthop Relat Res.*, 1998; 355: 294–300.
48. Saito I. Interleukin 1 beta and prostaglandin E are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress in vivo and in vitro // *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 1991; 99: 226–240.
49. Sanchez-Capelo A. Dual role for TFG- β 1 in apoptosis // *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2005; 16: 15–34.
50. Shimizu N. In vitro cellular aging stimulates interleukin-1 beta production in stretched human periodontal-ligament-derived cells // *J Dent Res.*, 1997; 76: 1367–1375.
51. Takatsu M., Uyeno S. Age-dependent alterations in mRNA level and promoter methylation of collagen alpha1(I) gene in human periodontal ligament // *Mech Ageing Dev.*, 1999; 110: 37–48.
52. Tanne K., Yoshida S., Kawata T., et al. An evaluation of the biomechanical response of the tooth and periodontium to orthodontic forces in adolescent and adult subjects // *British Journal of Orthodontics*, 1998; 25: 109–115.
53. Tocharus J. Developmentally regulated expression of mouse HtrA3 and its role as an inhibitor of TGF-beta signaling // *Dev Growth Differ.*, 2004, 46(3): 257–274.
54. Venuraju S. M. Osteoprotegerin as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular mortality and morbidity // *J Am Coll Cardiol.*, 2010; 55(19): 2049–2061.

55. Verma R., Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMP's): Chemical-biological functions and (Q)SARs // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007; 15: 2223–2268.
56. Waldo C. M., Rothblatt J. M. Histologic response to tooth movement in the laboratory rat; procedure and preliminary observations // *J Dent Res.*, 1954; 33(4): 481–486.
57. Weinstein S., Michael P., Robert M., et al. Effects of raloxifene, hormone replacement therapy, and placebo on bone turnover in postmenopausal women // *Osteoporos Int.*, 2003; 14: 814–822.
58. Xing L. Osteoclast precursors, RANKL/RANK, and immunology // *Immunol Rev.*, 2005; 208: 19–29.

11. PUBLIKĀCIJAS UN PREZENTĀCIJAS PAR PĒTĪJUMA TĒMU

Zinātniskie raksti – (4)

1. **Grzibovskis M.**, M. Pilmane, I. Urtane. Current concepts of orthodontic tooth movement // Acta Chirurgica Latviensis, 2008(8): 78–84.

2. **Grzibovskis M.**, M. Pilmane, I. Urtane. Today's understanding about bone aging // Stomatologija, 2010; 12 (4): 99–104.

3. **Grzibovskis M.**, M. Pilmane, I. Urtane, I. Jankovska. Specific signaling molecule expressions in the interradicular septum in different age groups // Stomatologija, 2011; 13 (3): 81–86.

4. **Grzibovskis M.**, M. Pilmane, I. Urtane. Specific signaling molecule expression in periodontal ligaments in different age groups: pilot study // Stomatologija 2011; 13 (4): 117–122.

Starptautiskās tēzes un prezentācijas – (3)

1. **Grzibovskis M.**, I. Urtane, M. Pilmane. Current concepts of orthodontic tooth movement” [Tēzes un mutiskā prezentācija] // 6. Baltijas Ortodontu asociācijas kongress. – Rīga (Latvija), 2008. – 18. lpp.

2. **Grzibovskis M.**, I. Urtane, M. Pilmane. Signaling molecule expression assesment in alveolar septum in different age groups [Tēzes un mutiskā prezentācija] // 7. Baltijas Ortodontu asociācijas kongress. – Kauņa (Lietuva), 2011. – 27. lpp.

3. **Grzibovskis M.**, M. Pilmane, I. Urtane. Specific signalling molecule expression in periodontal ligaments in different age groups [Tēzes] // Baltic Morphology VII Scientific Conference, Rīga, 2013. – 57. lpp.

Vietējās tēzes un prezentācijas – (7)

1. **Grzibovskis M.**, I. Urtāne, M. Pilmane. Specifisko signālmolekulu kvantitatīvā novērtējuma metodika alveolārajā kaulā dažādās vecuma grupās [Tēzes un prezentācija] // RSU 2010. gada zinātniskā konference: Tēzes. – Rīga: RSU, 2010. – 303. lpp.

2. **Grzibovskis M.**, I. Urtāne, M. Pilmane. Specifisko signālmolekulu kvantitatīvā novērtējuma metodika alveolārajā kaulā dažādās vecuma grupās [Mutiskā uzstāšanās ar referātu] // RSU rezidentu zinātniskā konference, Rīga, 2010. [**Iegūta 1. vieta.**]

3. **Gržibovskis M.**, I. Urtāne, M. Pilmane. Specifisko signālmolekulu kvantitatīvā novērtējuma metodika alveolārajā kaulā dažādās vecuma grupās [Tēzes un prezentācija] // RSU 2011. gada zinātniskā konference: Tēzes. – Rīga: RSU, 2011. – 324. lpp.
4. **Gržibovskis M.**, I. Urtāne, M. Pilmane. Specifisko signālmolekulu novērtējums periodonta saitēs *septum interradiculare* dažādās vecuma grupās [Stenda referāts] // Apvienotais pasaules latviešu zinātnieku III kongress, Rīga, 2011.
5. **Gržibovskis M.**, I. Urtāne, M. Pilmane. Specifisko signālmolekulu kvantitatīvā novērtējuma metodika alveolārajā kaulā dažādās vecuma grupās [Tēzes un prezentācija] // RSU 2012. gada zinātniskā konference: Tēzes. – Rīga: RSU, 2012. – 304. lpp.
6. **Gržibovskis M.**, I. Urtāne, M. Pilmane. Specifisko signālmolekulu kvantitatīvā novērtējuma metodika alveolārajā kaulā dažādās vecuma grupās [Tēzes un prezentācija] // Medicīnas nozares 2013. gada zinātniskā konference. – Rīga: RSU, 2013. – 288. lpp.
7. **Gržibovskis M.**, I. Urtāne, M. Pilmane. Specifisko signālmolekulu kvantitatīvā novērtējuma metodika alveolārajā kaulā dažādās vecuma grupās [Tēzes un prezentācija] // RSU 2014. gada zinātniskā konference: Tēzes. – Rīga: RSU, 2013. – 333. lpp.

12. PATEICĪBAS

□ Izsaku lielu pateicību zinātniskā darba vadītājām *Dr. habil. med.* profesorei Mārai Pilmanei un *Dr. med.* profesorei Ilgai Urtānei par darba vadīšanu, konsultācijām, atbalstu un lielo pacietību darba tapšanā.

□ Pateicos mutes, sejas un žokļu ķirurgiem Antonam Vostroilovam, Kasparam Stāmeram, Edgaram Sējam un Vadimam Kļimecam par palīdzību audu materiāla iegūšanā.

□ Paldies RSU Anatomijas un antropoloģijas institūta darbiniekiem, it īpaši laborantei Natālijai Morozaī, par lielo praktisko palīdzību darba morfoloģiskās sadaļas realizēšanā un inženierim Jānim Brēdem un Rihardam Starim par palīdzību mikrofotogrāfiju uzņemšanā.

□ Liels paldies docentam Renāram Ertam par palīdzību un konsultācijām darba rezultātu statistiskajā apstrādē un izvērtēšanā.

□ Paldies docentei Ivetai Jankovskai par palīdzību zinātniskās literatūras materiālu atlasē, par padomiem un morālo atbalstu.

□ Pateicos Rīgas Stradiņa universitātei par iespēju studēt doktorantūras studiju programmā un finansiālo atbalstu, kas tika sniegts no ESF līdzekļiem.

□ Sirsnīgs paldies maniem jaukajiem kolēģiem Zanei Krišjānei un Katrīnai Gardovskai par palīdzību un uzmundrinājumiem.

□ Īpašs paldies manai mīļajai sievai Gitai, dēlam Aleksam un meitai Annikai par neatsveramo atbalstu un izrādīto sapratni visā darba tapšanas laikā, kā arī maniem vecākiem un radiem par atbalstu.