

Māris Gržibovskis

SIGNĀLMOLEKULU
KVANTITATĪVAIS NOVĒRTĒJUMS
DAŽĀDA VECUMA CILVĒKU
INTERRADIKULĀRĀS SEPTAS AUDOS

Promocijas darbs
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – ortodontija

Darba zinātniskās vadītājas:
Dr. habil. med. profesore **Māra Pilmane**
Dr. med. profesore **Ilga Urtāne**



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.

Rīga, 2015

ANOTĀCIJA

Ortodontiska ārstēšana ir kombinēts un bieži arī interdisciplinārs process, it īpaši pieaugušu pacientu ārstēšanā. Tas sastāv no ortodontiskās ārstēšanas ar fiksētām brekešu sistēmām un dažreiz 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, un tas ir saistīts ar pubertātes vecuma sasniegšanu.

Ortodontiskai ārstēšanai nav vecuma ierobežojuma, ja nav citu risku vai faktoru, kas var ietekmēt ārstēšanas iznākumu, taču, pieaugot vecumam, pastāv zināma likumsakarība ārstēšanas ilgumā, proti, vecākiem pacientiem ārstēšanas ilgums pagarinās, kam var būt saistība ar remodelācijas procesā iesaistītiem faktoriem, to daudzumu un aktivitāti.

Pētījuma mērķis bija noteikt specifisko signālmolekulu ekspresiju alveolārajā kaulā un periodontālajos audos, lai pamatotu audu remodelācijas iespējas ortodontiskās ārstēšanas procesā atkarībā no vecuma.

Pētījumā tika iekļauti 45 dažāda vecuma pacienti, kam saskaņā ar ārstēšanas plānu pirms ortodontiskās ārstēšanas uzsākšanas tika nozīmēta zobu ekstrakcija. Pacienti tika sadalīti 3 grupās pa 15 pacientiem katrā grupā atbilstoši vecumam.

Morfoloģiski ar imūnhistoķīmijas metodi tika noteikta un analizēta augšanas faktoru un to receptoru (TGF β , RANKL, OPG, FGFR1, bFGF), citokīnu (IL6), ekstracelulārās matricas proteīnu (OC) un ekstracelulārās matricas degradācijas enzīmu (MMP8, MMP9) ekspresija, kā arī ar TUNEL metodi noteikts apoptotisko šūnu skaita relatīvais biežums pacientu alveolārā kaula interrādikulārās septas kaulaudos un periodonta saitēs.

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

SUMMARY

Orthodontic treatment is a combined and often an interdisciplinary process as well, especially it is observed when adult patients are treated. It consists of orthodontic treatment with fixed braces systems and occasionally of periodontal, prosthetic and surgical treatment. Generally orthodontic treatment is started at age 12–14 when the permanent occlusion has formed. Both boys and girls at this age may have different occlusion development phase that is related to the reach of the age of puberty.

There is no age limit for orthodontic treatment unless there are conditions that may influence the outcome of the treatment, however, with age regularity exists regarding the duration of the treatment which may have a connection with the factors involved in the remodelling process, their amount and activity.

The aim of the study was to determine signalling molecule expression in the alveolar bone and in periodontal tissues in order to substantiate tissue remodelling options in the process of orthodontic treatment depending on age.

In the morphologic part of the study 45 patients of different age were included, whose treatment plan envisaged teeth extractions before the commencement of the orthodontic treatment. The patients were divided into 3 groups by 15 patients in each group according to age.

The relative frequency of growth factors and their receptors (TGF β , RANKL, OPG, FGFR1, bFGF), cytokine IL6, extracellular matrix proteins (OC) and extracellular matrix degradation enzymes (MMP8, MMP9) expression, as well as apoptotic cell amount in the interradicular septum of patients' alveolar bone and periodontal ligament were studied and analysed morphologically.

Apoptotic cell amount statistically significant decrease in human interradicular septum with aging means a reduction of bone remodeling potential. OPG, RANKL, TGF β and apoptotic cell correlation shows decrease in osteoblastic and osteoclastic activity, bone growth and remodelling according to aging.

SATURS

1. DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI	6
2. IEVADS	7
2.1. Darba aktualitāte	7
2.2. Darba novitāte	8
2.3. Darba mērķis	8
2.4. Darba uzdevumi	8
2.5. Darba hipotēze	9
3. LITERATŪRAS APSKATS	10
3.1. Kaula struktūra un remodelācijas process	10
3.2. Periodonta struktūra un novecošanās process	18
3.3. Kaula remodelācijas nozīme ortodontijā	20
3.4. Periodonta remodelācijas nozīme ortodontijā	21
3.5. Augšanas faktoru nozīme kaula un periodonta remodelācijas procesā	24
3.5.1. Transformējošais augšanas faktors β (TGF β)	25
3.5.2. Fibroblastu augšanas faktors (FGF).....	26
3.6. Citokīni un kaula starpšūnu telpas funkcionālie proteīni	27
3.6.1. Interleikīni (IL)	29
3.6.2. Nukleārais kapa B faktors (RANK) un tā ligands (RANKL)	29
3.6.3. Osteoproteģerīns	30
3.7. Kaula ekstracelulārās matricēs (ECM) nozīme kaulaudu remodelācijā	31
3.7.1. Osteokalcīns (OC)	32
3.7.2. Matricēs metālproteināzes (MMP)	32
3.8. Apoptozes procesa raksturojums	34
4. MATERIĀLS UN METODES.....	36
4.1. Pētījuma grupa	36
4.2. Morfoloģisko pētījumu metodes	37
4.2.1. Materiāla fiksācija un sagatavošana	38
4.2.2. Preparātu krāsošana ar hematoksilīnu un eozīnu	38
4.2.3. Biotīna-streptavidīna imūnhistoķīmiskā metode	38
4.3. TUNEL metode apoptozes noteikšanai	40
4.4. Semikvantitatīvo datu konvertācija	40
4.5. Datu apstrādes statistiskās metodes	41
5. REZULTĀTI.....	43
5.1. Pacientu raksturojums.....	43
5.2. Rutīnas histoloģiskā atrade	46
5.3. Imūnhistoķīmiskās atrades: OPG	47
5.3.1. Matricēs metālproteināze 8 (MMP8)	48
5.3.2. Matricēs metālproteināze 9 (MMP9)	50
5.3.3. Nukleārais kapa faktors B105 jeb RANKL	51
5.3.4. Osteokalcīns (OC)	53
5.3.5. Transformējošais augšanas faktors β (TGF β).....	53
5.3.6. Fibroblastu augšanas faktora receptors1 (FGFR1)	55
5.3.7. Bāziskais fibroblastu augšanas faktors (bFGF)	56
5.3.8. Interleikīns 6 (IL6)	57
5.4. Apoptozes raksturojums	59
5.5. Diagnozes un bFGF savstarpējā korelācija	60

5.5.1. Dažādu faktoru relatīvā daudzuma savstarpējās korelācijas	60
6. DISKUSIJA	67
6.1. Morfoloģiskās pārmaiņas audos	68
6.2. Augšanas faktori	68
6.3. Kaula ekstracelulārās matricē proteīni	70
6.4. Matricē metālproteināzes	70
6.5. Citokīni	71
6.6. Kaula starpšūnu telpas funkcionālie proteīni	72
6.7. Apoptoze kaulaudos un PDS	74
7. KOPSAVILKUMS	76
8. SECINĀJUMI	77
9. LITERATŪRAS SARAKSTS	78
10. AUTORA PUBLIKĀCIJAS UN PREZENTĀCIJAS PAR PĒTĪJUMA TĒMU	89
PATEICĪBAS	91
1. pielikums. Mikrofotogrāfijas	92
2. pielikums. Ētikas komitejas atļauja	119
3. pielikums. Ētikas anketas paraugs	120

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	Fibrillu saistītais kolagēns ar pārtrauktām trīskāršām spirālēm
bFGF	Fibroblast growth factor base	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
mRNS	messenger ribonucleinic acid	mesendžer ribonukleīnskābe
NF-κB	Nuclear factor-kappa B	Nukleārais faktors kappa 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	Dezoksinukleotīdtransferāze un digoksigēna nukleotīda gala marķējums
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Vaskulārais endoteliālais augšanas faktors

2. IEVADS

2.1. Darba 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). Parādoties 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 breķešu 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 attiecīgi variē no 11,5 līdz 12,5 gadiem un 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.

2.2. 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.

2.3. Darba mērķis

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

2.4. 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 kapa 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 (IL6) 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.

2.5. Darba hipotēze

Kaulaudu morfoģenēzē analizēto augšanas faktoru un to receptoru, kaula ekstracelulārās matricas proteīnu, deģenerācijas enzīmu, iekaisuma proteīnu un apoptozes rādītāji interrādikulārās septas cietajos un mīkstajos audos ir atšķirīgi atkarībā no pacientu vecuma.

3. LITERATŪRAS APSKATS

3.1. Kaula struktūra un remodelācijas process

Cilvēka organismā notiek nemitīga kaulaudu atjaunošanās. Tiek uzskatīts, ka kaulaudi pilnīgi atjaunojas 10 gadu laikā. Kaulaudiem ir vairākas funkcijas: balsta funkcija, minerālvielu maiņas funkcija, aizsargfunkcija. Cilvēka organisma skelets ir veidots no kauliem, kurus savukārt veido kaulaudi. Savas struktūras dēļ kaulaudi spēj pielāgoties konkrētai mehāniskai slodzei, kas rodas ilgstošas, specifiskas darbības rezultātā. Ta kā kauli pilda balsta funkciju, tiem ir nepieciešama mehāniskā slodze: esot bezsvara stāvoklī, no kauliem izzūd kalcijs un tie kļūst mīksti. Viena no kaula funkcijām ir aizsargfunkcija, kauli aizsargā galvas un muguras smadzenes no jonizējošā starojuma un citām traumām. Kaulaudus var uzskatīt par kalcija krātuvi; vidēji smagam (aptuveni 70 kg) cilvēkam kaulos ir 1200 g hidroksiapatīta kristālu veidā, bet asins plazmā ir tikai 280 g kalcija (*Bloom un Fawcett, 1998; Stevens, 2005*).

Kaulaudi pilda arī asinsrades funkciju. Asinis no kaulu asinsvadiem nokļūst sarkanajās kaulu smadzenēs, kas atrodas kaula spongiozajā vielā. Kaulos uzkrājas dažas vielas, kā arī radioaktīvie izotopi. Osteocīti un šūnstarpas viela veido kaulaudus. Osteocītiem ir raksturīga iegarena šūnas forma ar izaugumiem. Osteocītu citoplazma satur maz organoīdu, kā arī taukus un glikogēnu. Pati šūna atrodas kaula lakūnā, bet izaugumi stiepjas kanāliņos, kuru sienīgu veido īpašs robežslānis.

Kauls satur vairāk nekā 30 mikroelementu (cinku, varu, bāriju, stronciju, magniju u.c.), un tiem ir nozīme gan mineralizācijas, gan demineralizācijas procesā. Neorganisko vielu daudzums kaulaudos ir ap 70%: no tiem 85% ir kalcija fosfāts, 10% – kalcija karbonāts, 2% – nātrijs un kālija sāļi, 1,5% – magnija fosfāts, 0,3% – kalcija fluorīds, 0,2% – kalcija hlorīds (*Mescher, 2013*).

Kaulaudus iedala rupjšķiedrainos un smalkšķiedrainos. Rupjšķiedrainie kaulaudi ir vienkāršāki pēc uzbūves un senāki, tie galvenokārt ir atrodami zemāko mugurkaulnieku skeletos. Cilvēka embriogēnēzes sākumā izveidojas rupjšķiedrainie kaulaudi, bet pakāpeniski tie noārdās un to vietā rodas smalkšķiedrainie kaulaudi ar sarežģītāku struktūru.

Rupjšķiedraino kaulaudu šūnstarpas viela satur daudz oseomukoīda. Resnajiem oseīna kūlīšiem, kuru diametrs variē no 2 līdz 10 μm diametrā, ir dažāds

izvietojuma virziens. Arī osteocītu izaugumu izvietojuma virziens ir dažāds. Kanāliņi ar šūnu izaugumiem atveras uz asinsvadu kanālu, lai barības vielas pa kanāliņiem varētu cirkulēt no šūnas uz šūnu (Stevens, 2005).

Savstarpēji savienotās kaula plātnītes veido smalkšķiedrainos jeb plātņainos kaulaudus, kuros oseīna šķiedras veido tievus kūlīšus. Atsevišķas plātnītes šķiedru virziens atšķiras no šķiedru virziena citās plātnītēs; lai tās cieši saistītos, daļa šķiedru pāriet no vienas plātnītes citā, cieši tās saistot. Par smalkšķiedrainiem kaulaudus sauc tievo kūlīšu dēļ, un tajos ir vairāk oseīna nekā rupjšķiedrainos kaulaudos, kuros ir vairāk oseīna, bet mazāk oseomukoīda (Bloom un Fawcett, 1998; Mescher, 2013).

Osteocīti atrodas lakūnās starp plātnītēm, to izaugumi vērsti uz asinsvadu pusi, pretī barības vielu plūsmai, un uz nākamās šūnas pusi. Organismā, kas jau ir izveidojies, kaulus veido plātņainie kaulaudi. Kaulu virsmā atrodas rupjšķiedrainie kaulaudi, kas ir kā nelīdzenumi un pauguri; pie tiem piesaistās cīpslas, un tie veido arī galvaskausa šuves (Stevens, 2005).

Osteoblasti sintezē proteīnu matricu, kas sastāv galvenokārt no I tipa kolagēna. Proteīnu matrica pakāpeniski mineralizējas, veidojot jaunu kaulu. Pacientiem ar multiplu mielomu kaula plēves šūnas var izdalīt pret inhibitoriem izturīgu skābo fosfatāzi un citus klasiskos osteoklastu marķierus. Katra kaula remodelācijas cikla gala rezultāts ir jauna osteona radīšana. Remodelācijas process kortikālajā un trabekulārajā kaulā pēc būtības ir viens un tas pats, turklāt kaula remodelācijas vienības trabekulārajā kaulā līdzinās kortikālā kaula remodelācijas vienībām, kas sadalītas gareniski uz pusēm (Parffit, 1994). Kaulaudu daudzumu raksturo starpība starp resorbētiem vecajiem kaulaudiem un jaunizveidotajiem kaulaudiem. Pie periosta kaulaudu daudzums ir nedaudz lielāks, kamēr gar endostu trabekulāro kaulaudu daudzums ir mazāks, kas novecojot izraisa kortikālo un trabekulāro kaulaudu samazināšanos. Šīs izmaiņas notiek, kad endosteālā resorbcija pārsniedz periosteālo kaulaudu depoziciju.

Galvenās **kaulu remodelācijas funkcijas** ir kaula mehāniskā stipruma saglabāšana, aizstājot vecos kaulaudus, kuriem ir mikrobojājumi, ar jaunajiem, veselajiem kaulaudiem, un nodrošināt kalcija un fosfāta homeostāzi. Pieaugušajiem ir salīdzinoši zems kortikālo kaulaudu reģenerācijas ātrums – 2–3% gadā, kas ir adekvāti kaula biomehāniskā stipruma saglabāšanai. Trabekulāro kaulaudu

reģenerācijas ātrums ir lielāks, nekā nepieciešams mehāniskā stipruma saglabāšanai, kas liecina, ka trabekulāro kaulaudu reģenerācija ir svarīga minerālu vielmaiņai. Palielināta vajadzība pēc kalcija vai fosfora izraisa degradējošo kaula šūnu palielināšanos, bet daudzos gadījumos tas notiek, palielinoties esošo osteoklastu aktivitātei. Organisma palielināto vajadzību pēc kaulos esošā kalcija un fosfora apmierina osteoklastu darbība un daļēji ar osteoklastiem nesaistīta kalcija pieplūde un aizplūde. Kaula remodelācijas aktivitāte nodrošina pastāvīgu kaulaudu izveidi, kuriem ir salīdzinoši zems minerālu saturs un kas ir spējīgi vieglāk apmainīt jonus ar ārpusšūnu šķidrumu. Kaula remodelācijas vienības parasti ir nejauši sadalītas pa visu skeletu, bet tās var aktivizēt mikroplaisu veidošanās vai osteocītu apoptoze. Kaula remodelācijas telpa atspoguļo visu aktīvo kaula remodelācijas vienību summu skeletā noteiktā laika periodā (*Clowes, 2003*).

Osteoblasti

Osteoprogenitoru šūnas rada osteoblastus, kas sintezē jaunu kaula matricu uz kaula veidošanas virsmām un rada osteocītus kaula matricē, kas balsta kaula struktūru. Osteoblastu līnijas ietvaros šūnu subpopulācijas atšķirīgi reaģē uz dažādiem hormonāliem, mehāniskiem vai citokīnu signāliem. Piemēram, osteoblasti no stobrkauliem un plakanajiem kauliem atšķirīgi reaģē uz šiem signāliem.

Pašatjaunojošas, pluripotentas cilmes šūnas apkārtējās vides ietekmē rada osteoprogenitoru šūnas dažādos audos. Kaulu smadzenes satur nelielu mezenhimālo cilmes šūnu populāciju, kas spēj radīt kaulaudu, skrimšļaudu, taukaudu vai fibrozus saistaudus, savukārt hematopoētisko cilmes šūnu populācija rada asinsšūnu līniju (*Pittenger, 1999*). Šūnas ar īpašībām, kas raksturīgas pieaugušo kaulu smadzeņu mezenhimālajām cilmes šūnām, ir izdalītas no pieaugušo perifērajām asinīm un zobu pulpas, no augļa nabassaites asinīm, aknām, asinīm un kaulu smadzenēm. Ir noteiktas multipotentās miogēnās šūnas, kas spēj diferencēties kaulaudos, muskuļaudos vai adipocītos. Viena tipa mezenhimālās šūnas proliferācijas laikā var diferencēties un attīstīt citu fenotipu atkarībā no vietējās audu vides. Asinsvadu pericīti nepieciešamības (piemēram, traumas) gadījumā diferenciācijas laikā var attīstīt osteoblastu fenotipu (*Doherty u.c., 1998*).

Mezenhimālo cilmes šūnu attīstībai par osteoblastu līnijas šūnām ir nepieciešama Wnt/ β -katenīna un ar to saistīto proteīnu iesaiste (*Logan, 2004*). Wnt/ β -

katēnām ir nozīme embrija skeleta modelēšanā, augļa skeleta attīstībā un pieaugušā skeleta remodelācijā (*Little et al.*, 2002). Wnt sistēma ir svarīga arī hondroģenēzē un hematopoēzē, tā dažādās stadijās var stimulēt vai bremzēt osteoblastu diferenciāciju.

Kaula plēves šūnas tiek uzskatītas par statistiskiem osteoblastiem, kas uz trabekulārajām virsmām veido endostu un periostu. Osteoblasti un plēves šūnas atrodas tuvu un savā starpā ir savienotas ar kadherīniem. Kadherīni ir no kalcija atkarīgie transmembrānas proteīni, kas veido jūglu neatņemamo sastāvdaļu un kopā ar ciešajām saitēm un desmosomām savieno šūnas, sasaistot to citoskeletus (*Shin*, 2000).

Osteoblastu priekšteči kaula matrices virsmā maina formu no vārpstveidīgajiem osteoprogenitoriem uz lieliem diferencētiem osteoblastiem pēc tam, kad ir apstājusies preosteoblastu proliferācija. Aktīvajiem, nobriedušajiem osteoblastiem, kas sintezē kaula matrici, ir lieli kodoli, palielināts Goldži komplekss un izteikts endoplazmatiskais tīkls. Šie osteoblasti izdala I tipa kolagēnu un citus matrices proteīnus kaula veidošanās virsmas virzienā.

Osteoblastu populācijas, atšķirīgiem osteoblastiem pārstāvēt atšķirīgus gēnu paveidus, ir heterogēnas, kas var izskaidrot trabekulārās mikroarhitekūras heterogēno raksturu dažādās skeleta vietās. Tāpēc osteoblasti specifiski un atšķirīgi reaģē uz farmakoloģiskas iedarbības vielām, ko lieto kaulu slimību ārstēšanai.

Osteocīti

Osteocīti ir diferencētas kaulaudu šūnas, kas funkcionē vienotā tīklojumā, balstot kaulaudu struktūru un vielmaiņu. Osteocīti atrodas lakūnās mineralizētajos kaulaudos, un tiem ir izteikti izaugumi, kas atrodas mineralizēto kaulaudu kanāliņos (*Bonewald et al.*, 1999). Osteocīti parasti neizdala sārmaino fosfatāzi, bet izdala osteokalcīnu, galektīnu 3 un CD44, hialuronāta šūnu adhēzijas receptoru, kā arī citus kaula matrices proteīnus, kas uztur starpšūnu kontaktus un regulē minerālu vielmaiņu kaula lakūnās un kanāliņu tīklā. Osteocīti ir aktīvi osteolīzes laikā un var funkcionēt kā fagocītu šūnas, jo tie satur lizosomas.

Osteocīti kontaktē savā starpā un ar kaula virsmu ar savu daudzo šūnu izaugumu palīdzību. Konneksiņi ir integrāli šūnu proteīni, kas palīdz kontaktēt šūnām savā starpā, ļaujot notikt tiešai komunikācijai pa starpšūnu kanāliem. Osteocīti ir metaboliski un elektriski saistīti caur kontaktiem, kas sastāv galvenokārt no

konksina (*Plotkin et al.*, 2002). Kontakti ir nepieciešami osteocītu nobriešanai, aktivitātei un izdzīvošanai.

Osteocītu / osteoblastu kompleksa galvenā funkcija ir mehāniskā jušana (*Rubin*, 1987). Osteocīti pārveido spriedzes signālus no kaula liešanas vai stiepšanas bioloģiskajā aktivitātē. Šķidrums plūsmas kanāļos, reaģējot uz ārējiem spēkiem, osteocītos izraisa dažādas atbildes reakcijas. Ātra kaulu kalcija plūsma caur izaugumu kontaktiem stimulē informācijas nodošanu starp osteoblastiem uz kaula virsmas un osteocītiem kaula iekšienē (*Jorgensen et al.*, 2003). Molekulas, kas iesaistītas signāla transdukcijā, noris ar prostaglandīnu E2, ciklooksigenāzi 2, dažādu kināžu, Runx2 un slāpekļa oksīda palīdzību.

Osteocīti ir visilgāk dzīvojošās šūnas organismā, jo to dzīves ilgums vidēji ir 10 gadi. Tukšas lakūnas novecojušos kaulos liecina, ka osteocīti ir pakļauti apoptozei, ko, iespējams, izraisa to starpsūnu kontaktu pārrāvums vai šūnas-matrices mijiedarbība (*Xing*, 2005). Osteocītu apoptoze kā atbilde uz estrogēnu deficītu vai ārstēšanu ar glikokortikoidiem ir kaitīga kaula struktūrai. Estrogēna un bifosfonātu terapija un fizioloģiskā slodze kauliem var novērst osteoblastu un osteocītu apoptozi (*Plotkin*, 2005).

Osteoklasti

Osteoklasti ir šūnas, par kurām ir zināms, ka tās spēj resorbēt kaulaudus. Aktivētie daudzkodolu osteoklasti ir cēlušies no monocītu-makrofāgu līnijas vienkodola priekšteču šūnām (*Boyle*, 2003). Vienkodola monocītu-makrofāgu priekšteču šūnas ir identificētas dažādos audos, bet tiek uzskatīts, ka lielākā daļa osteoklastu rodas no kaulu smadzeņu monocītu-makrofāgu priekšteču šūnām.

RANKL un makrofāgu kolonijas stimulējošais faktors (M-CSF) ir divi citokīni, kas ir svarīgi osteoklastu veidošanai. Kaulu smadzeņu stromas šūnas un osteoblasti galvenokārt ražo gan RANKL, gan M-CSF ar membrānu saistītajā un šķīstošajā formā, un osteoklastu ģenēzei ir nepieciešama stromas šūnu un osteoblastu klātbūtne kaulu smadzenēs (*Teitelbaum et al.*, 2003). RANKL pieder pie TNF saimes un ir svarīgs osteoklastu veidošanai. M-CSF ir nepieciešams osteoklastu priekšteču proliferācijai, izdzīvošanai un diferenciācijai, tāpat kā osteoklastu izdzīvošana un citoskeleta pārkārtošanās ir nepieciešama kaulaudu resorbcijai. OPG ir ar membrānu

saistītais proteīns, kas savukārt aktīvi saista RANKL, kavējot pēdējā iedarbību uz RANKL receptoriem (Cohen, 2006).

Kaulaudu resorbcija ir atkarīga no ūdeņraža jonu un katepsīna K enzīma sekrēcijas osteoklastos. H^+ joni skābina resorbcijas nišas zem osteoklastiem, izšķīdinot kaula matricē minerālo sastāvdaļu, kamēr katepsīns K sagremo proteīnu matrici, kas lielākoties sastāv no I tipa kolagēna (Boyle, 2003).

Osteoklasti savienojas ar kaula matrici caur integrīna receptoriem osteoklastu membrānā, kas saistās ar kaula matricē peptīdiem. Integrīna receptori $\beta 1$ osteoklastos piesaistās ar kolagēnu, fibronektīnu un laminīnu, bet galvenie integrīna receptori, kas veicina kaulaudu resorbciju, ir $\alpha\beta 3$ integrīna receptori, kas var veidot kompleksus ar osteopontīnu un kaula silaproteīnu (Ross, 1993).

Osteoklastu saskaršanās ar kaula matrici liek tiem polarizēties, turklāt uz kaulaudus uzsūcošas virsmas attīstās viļņotā robeža, kas veidojas, kad pārskābinātie pūslīši, kas satur matricē metālproteināzi un katepsīnu K, tiek transportēti pa mikrocaurulītēm, lai saplūstu ar membrānu. Viļņotā robeža izdala H^+ jonus caur H^+ -ATP-āzes un hlorīdu kanāliem un pārskābinātajos pūslīšos izraisa katepsīna K un citu enzīmu eksocitozi (Teitelbaum, 2003).

Pēc saskarsmes ar kaula matrici osteoklasta citoskeleta fibrilārais aktīns izveido aktīna gredzenu, kas veicina hermētiskas zonas veidošanos apkārt osteoklasta un matricē savienojuma perifērijai. Hermētiskā zona apkļauj un izolē pārskābināto resorbcijas nišu no apkārtējās kaula virsmas (Vaananen, 2000). Gan viļņotās robežas, gan aktīna gredzena pārraušana bloķē kaula resorbciju. Aktīvi resorbējošie osteoklasti drīzāk veido podosomas, kas savienojas ar kaula matrici, nevis adhēzijas perēkļus, ko veido lielākā daļa šūnu. Podosomas sastāv no aktīna serdes, ko apņem $\alpha\beta 3$ integrīns un saistītie citoskeleta proteīni (Clarke, 2008).

Kaula ārpusšūnu matrice

Kaula proteīni galvenokārt sastāv no kolagēna proteīniem (85–90%). Kaula matrice parasti sastāv no I tipa kolagēna (ar III un V tipa kolagēnu piejaukumu) un no FACIT (fibrillu saistītais kolagēns ar pārtrauktām trīskāršām spirālēm) kolagēniem noteiktos kaula veidošanās posmos. Kaulaudu šūnstarpas vielā (*substantia intercellularis*) ir 30–32% organisko vielu (oseīns, oseomukoīds). No olbaltumvielām

kaulos visvairāk ir I tipa kolagēns (90–95%). Kolagēnās jeb oseīna šķiedrās ir daudz lizīna un oksilizīna palieku grupu, kas aktīvi saista pirofosfātus. Amorfā pamatviela jeb oseomukoīds aizpilda visas starpas starp šķiedrām. Oseomukoīdā ir glikoproteīds osteonektīns, kas saistās ar kolagēnām šķiedrām un hidroksiapatītu. Osteokalcīnam ir nozīme mineralizācijā. Oseomukoīdā ir lieli proteoglikānu agregāti. To hondroitīnsulfāti var uzkrāt un pārnest kalcija jonus. Kompleksus ar kalciju veido arī citronskābe. Tādējādi *substantia intercellularis* notiek mineralizācija, bet hidroksiapatīta kristāli ir saistīti ar šķiedrām un oseomukoīdu (Bloom un Fawcett, 1998; Stevens, 2005).

FACIT kolagēni pieder nefibrilāro kolagēnu grupai, kas ir svarīga struktūra ārpusšūnu matrices organizācijai un stabilitātei. Šīs saimes locekļi ir kolagēni IX, XII, XIV, XIX, XX un XXI. Nekolagēna proteīni veido 10–15% no visiem kaulaudu proteīniem. Aptuveni 25% nekolagēna proteīnu ir eksogēna izcelsme, tai skaitā seruma albumīnam un α 2-HS-glikoproteīnam, kas parasti savienojas ar hidroksiapatītu, pateicoties savām skābes īpašībām. Seruma izcelsmes nekolagēna proteīni regulē matrices mineralizāciju un kaula šūnu proliferāciju. Pārējie eksogēnas izcelsmes nekolagēnie proteīni nelielā daudzumā atrodas arī uz citām molekulām, kas var ietekmēt kaula šūnu aktivitāti.

Osteoblasti sintezē un izdala tikpat daudz nekolagēno proteīnu, cik kolagēno. Nekolagēnie proteīni iedalās vairākās kategorijās, ieskaitot proteoglikānus, glikozilētus proteīnus, glikozilētus proteīnus ar potenciālu šūnu pievienošanas aktivitāti un γ -karboksilētus (gla) proteīnus. Katra kaulu proteīna loma šobrīd vēl nav labi noskaidrota, un tiek pieņemts, ka daudzi izpilda vairākas funkcijas, tostarp regulē minerālu uzkrāšanos un apriti kaulos, kā arī regulē kaula šūnu aktivitāti. Piemēram, agrāk domāja, ka osteoblastu sintezētais seruma osteokalcīns funkcionē kā kalcija uzkrāšanās veicinātājs vietās starp kolagēna šķiedru galiem. Tāpēc to uzskatīja par kaulu veidošanās marķieri. Pelēm, kurām ir pazemināts osteokalcīna līmenis, ir augsts kaulu masas fenotips, jo osteokalcīns parasti bremsē kaulaudu veidošanos. Tā kā seruma osteokalcīns rodas gan no matricē esošo osteoklastu aktivitātes, gan no osteoblastu sintēzes, šobrīd to uzskata drīzāk par kaulaudu reģenerācijas, nevis par specifisku kaulaudu veidošanās marķieri.

Galvenais glikozilētais proteīns, kas atrodas kaulos, ir sārmainā fosfatāze. Sārmainā fosfatāze kaulos caur fosfoinositola savienojumiem ir saistīta ar osteoblastu šūnu virsmām, un tā ir atrasta arī brīvā formā mineralizētā matricē. Sārmainās fosfatāzes loma kaulu mineralizācijā vēl precīzi nav noskaidrota. Visvairāk no nekolagēniem proteīniem kaulos ir osteonektīns, kas attīstošos kaulaudos veido aptuveni 2% no visa proteīna. Uzskata, ka osteonektīns ietekmē osteoblastu augšanu un/vai proliferāciju un matricē mineralizāciju (Whyte, 1994).

Kaula matricē mineralizācija

Kaula sastāvā ir 50–70% minerālvielu, 20–40% veido organiskā matricē, 5–10% – ūdens un < 3% – lipīdi. Minerālvielas, kas ietilpst kaula sastāvā, galvenokārt ir hidroksiapatīts $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Parasti nelielā daudzumā ir arī karbonāts, magnijs un skābā fosfatāze ar trūkstošām hidroksilgrupām. Salīdzinot ar ģeoloģiskā hidroksiapatīta kristāliem, kaulu hidroksiapatīta kristāli ir ļoti mazi, to izmērs lielākajā šķērsgriezumā ir tikai aptuveni 200 Å. Šie mazie, vāji kristalizētie kristāli ar aizvietoto karbonātu šķīst labāk nekā ģeoloģiskā hidroksiapatīta kristāli, kas ļauj tiem piedalīties minerālu vielmaiņā (Anderson, 2003).

Matricē nobriešana ir saistīta ar sārmainās fosfatāzes un dažu nekolagēna proteīnu, t. sk. osteokalcīna, osteopontīna un kaula sialproteīna, izstrādi. Uzskata, ka šie kalciju un fosfātu saistošie proteīni palīdz regulēt minerālvielu uzkrāšanas kārtību, regulējot veidojošos hidroksiapatīta kristālu daudzumu un lielumu.

Kaulu minerālvielas nodrošina kaulu mehānisko stingrību un kravnesības stiprumu, kamēr organiskā matricē nodrošina elastību un lokanību. Kaulu minerālvielas sākotnēji uzkrājas “dobumu” zonās starp kolagēna šķiedru galiem (Landis, 1995). Šo procesu var veicināt ārpusšūnu matricē pūslīši kaulaudos, kā tas notiek skrimšļu pārkaļķošanās un tītaru cīpslu mineralizācijas procesā. Matricē ārpusšūnu pūslīšus sintezē hondrocīti un osteoblasti, un tie nodrošina mikrovidi, kurā kalcija un fosfāta koncentrācija var tikt palielināta, lai paātrinātu kristālu veidošanos. Ārpusšūnu šķidrums parasti nav pārsātināts ar hidroksiapatītu, tāpēc hidroksiapatīts spontāni nenogulsnējas. Matricē ārpusšūnu pūslīši satur kodolu serdi, kas sastāv no proteīniem un skābo fosfolipīdu, kalcija neorganiskā fosfāta kompleksa, ar ko pietiek hidroksiapatīta kristālu nogulsnešanai. Vēl nav noskaidrots, kā matricē

ārpusšūnu pūslīši piedalās mineralizācijā konkrētās vietās kolagēna šķiedru galos, jo pūslīši acīmredzot nav tieši notēmēti uz šķiedru galiem (*Anderson, 2003*).

Nav pierādījumu, ka nekristāliska kalcija fosfāta klasteri (amorfs kalcija fosfāts) veidojas kaulos pirms tā pārvēršanās hidroksiapatītā. Kad kaulaudi nobriest, hidroksiapatīta kristāli palielinās un tajos samazinās piemaisījumu līmenis. Kristālu palielināšanās notiek kā kristālu augšanas, tā arī apvienošanās ceļā. Kaula matricēs makromolekulas var veicināt sākotnējo kristālu veidošanos, nošķirot minerālu jonus, palielinot vietējo kalcija un/vai fosfora koncentrāciju, vai arī veicināt heterogēno kristālu veidošanos. Makromolekulas arī piesaistās augošo kristālu virsmām, nosakot veidojošos kristālu lielumu, formu un skaitu (*Weiner, 2005*).

Apstiprinātie mineralizācijas veicinātāji (nukleatori) ietver dentīna matricēs proteīnu 1 un kaula sialproteīnu. I tipa kolagēns nav kaula mineralizācijas veicinātājs. Fosfoproteīna kināzes un sārmainā fosfatāze regulē mineralizācijas procesu. Kaulaudu sārmainā fosfatāze var palielināt vietējo fosfātu koncentrāciju, likvidēt fosfātsaturošus hidroksiapatīta kristālu augšanas inhibitorus vai modificēt fosfoproteīnus, kontrolējot kaula proteīnu spēju darboties kā nukleatoriem.

D vitamīns netieši stimulē nemineralizētās kaula matricēs mineralizāciju. Pēc D vitamīna absorbcijas vai saražošanas ādā aknas sintezē D 25-hidroksiholesterolu, un nieres pēc tam producē bioloģiski aktīvo D 1,25-dihidroksiholesterolu [1,25-(OH)₂D]. Seruma 1,25-(OH)₂D ir atbildīgs par atbilstošu kalcija un fosfora koncentrāciju serumā, ļaujot nemineralizētajai kaula matricē pasīvi mineralizēties. Seruma 1,25-(OH)₂D vispirms stimulē kalcija un fosfora uzsūkšanos zarnās. Seruma 1,25-(OH)₂D arī veicina osteoblastu diferenciāciju un stimulē kaulaudiem specifiskas sārmainās fosfatāzes, osteokalcīna, osteonektīna, OPG un dažādu citu citokīnu izpaušmi osteoblastos. Seruma 1,25-(OH)₂D ietekmē arī citu skeleta šūnu, tai skaitā hipertrofisko hondrocītu, proliferāciju un apoptozi (*Weiner, 2005*).

3.2. Periodonta struktūra un novecošanās process

Periodonts – audi, kas balsta zobus – sastāv no smaganām, periodonta saitēm, cementa un alveolārā kaula. Vairākos pētījumos pierādīts, ka novecojot notiek gan anatomiskas, gan fizioloģiskas izmaiņas periodonta audos (*Ellen, 1998*).

Smaganas ir audi, kas ir ciešā kontaktā ar mutes dobumu, histoloģiski veidotas no epitēlija un saistaudiem. Novecojot cilvēka mutes dobuma epitēlijs kļūst plānāks un samazinās tā keratinizācija. Ir daži pretrunīgi ziņojumi par epitēlija šūnu formu atkarībā no vecuma, kur tiek minēts, ka šūnas saplacinās, bet pagarinās epiteliālās kores (Ellen, 2000). Morfoloģiskā trīsdimensionālā pētījumā tika noteikts, ka epiteliālās kores novērotas jaunākiem indivīdiem, bet vecāka gadagājuma indivīdiem prevalēja saistaudu kārpīņas.

Tajā pašā pētījumā norādīts, ka līdz ar vecumu samazinās arī šūnu skaits. Fibroblasti ir galvenās šūnas, kas sintezē periodontālos audus. Hou (1993) atradis, ka pastāv vairākas fibroblastu subpopulācijas, kam ir atšķirīga funkcija ECM sintēzē un uzturēšanā. *In vivo* un *in vitro* pētījumos Abiko (1998), Dumas (1994), Lee (1997) un Takatsu (1999) ziņoja par funkcionālām un strukturālām fibroblastu izmaiņām, kas saistītas ar novecošanos. Smaganu fibroblasti ir pastāvīgi pakļauti mutes dobuma baktērijām un to metaboliskajiem produktiem, piemēram, lipopolisaharīdiem, ko satur baktēriju sienīņas. Tieši lipopolisaharīdi inducē fibroblastu prostoglandīnu, IL un plazminogēnu aktivatoru izdalīšanos, kas savukārt pasliktina periodonta audu stāvokli (Abiko, 1998).

Johnson (1986) *in vitro* pētījumā konstatēja, ka kolagēna sintēze novecojošos audos samazinās piekārtīgi. Vecos fibroblastos novēroja lielāku kolagēna fagocitozi, kas noteikti ietekmē līdzsvaru saistaudos (Lee, 1997). Novecošanās fibroblastos izraisa DNS struktūru pastiprinātu metilēšanu kolagēna alfa-1 gēnā, kas samazina mRNS līmeni un tam sekojošu pazeminātu I tipa kolagēna sintēzi (Takatsu, 1999). Tā rezultātā notiek ECM strukturālās uzbūves bojājumi. Proteoglikāni, ko izdala veci fibroblasti, palielina heparīnsulfāta un samazina hondroitīnsulfāta daudzumu attiecībā pret jauniem fibroblastiem (Bartold, 1986).

Periodonta saites (PDS), kas pieder pie mīkstajiem saistaudiem, kalpo kā zobu un alveolāro izaugumu savienojšie audi, un to funkcija ir amortizēt košanas slodzi starp cietajiem audiem. Saites sastāv no fibroblastiem, cementoblastiem, osteoblastiem, *Malasse* epitēlija saliņām un kolagēna matrices (Šarpeja šķiedrām). PDS šūnas ir iesaistītas alveolārā kaula, cementa un pašu periodonta saišu atjaunošanā, jo tās spēj diferencēties gan osteoblastos, gan cementoblastos un fibroblastos (Somerman, 1990). Šķiedru un šūnu skaits līdz ar vecumu samazinās, un

PDS kļūst vairāk iregulāras. Līdzīgi kā bakteriālās iedarbības vai paaugstinātas mehāniskas slodzes laikā, PDS izdala iekaisuma faktorus (*Abiko, 1998*).

Novecošanas process PDS šūnās izraisa būtisku hemotakses, motilitātes un proliferācijas samazinājumu. Hemotakse un osteoklastu diferenciācija PDS šūnās, ko inducē kaula matricēs devitalizācija, ir atkarīga no pacienta vecuma. *Groessner-Schreiber* (1992) savā pētījumā vecāku pacientu šūnās novēroja osteoklastu hemotakses samazinājumu un arī zemāku osteoklastu diferenciācijas pakāpi.

Cements ir kalcificēti audi, kas klāj zobu saknes. Tā veidošanās ir nepārtraukts process, kas notiek visa mūža garumā gan cilvēkiem, gan dzīvniekiem. Novecojot cementa slāņa biezums palielinās, it īpaši zobu saknes apikālajā galā (*Van Der Velden, 1984*). Novecošanās un šūnu nāve ir normāla parādība cementocītu dzīves ciklā. Tas notiek vielmaiņas ātrā samazinājuma un vielmaiņas galaproduktu aizvākšanas dēļ. Kopumā cements ir acelulārs, izņemot saknes apikālo un furkācijas zonu, kur sadalās molāru un premolāru saknes. Novecojot cementa veidošanās process kļūst acelulārs. Cementa remodelācija parasti nenotiek, jo pārsvarā ir novērojama lokāla cementa virsmas resorbcija un tā veidošanās (*Van Der Velden, 1984*).

Alveolārais kauls kopā ar PDS kalpo zobiem par balstu. Kaula veidošanās nepārtraukti ar vecumu samazinās, kā rezultātā kopējā kaula masa sarūk (*Roholl, 1994*). Alveolārajam kaulam piemīt augsta plasticitāte, kas saglabājas līdzsvarā, pateicoties osteoblastu un osteoklastu aktivitātei. Šīs šūnas tieši un netieši ietekmē kalcitonīns, vitamīna D metabolīti, estrogēns, kalcija un fosfātu plazmas koncentrācija, neiromediatoru, augšanas faktori un lokālo citokīnu darbība (*Sodek, 1977*).

Kaula veidošanās samazinās arī osteoblastu priekšteču proliferācijas izmaiņu dēļ, jo samazinās gan kaula matricēs pamata proteīnu sintēze, gan izdalīšanās (*Roholl, 1994*). Šajā procesā ir nozīmīga ārpusšūnas matrice, kas aptver osteoblastus un piedalās to vielmaiņā. Iespējams, novecošanās procesā tieši šī disfunkcija ir samazināta kaula daudzuma iemesls (*Abiko, 1998*).

3.3. Kaula remodelācijas nozīme ortodontijā

Bioķīmiskā 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.

Mūsdienās tiek uzskatīts, ka mehāniskā transdukcija sākas no fokālās piestiprināšanās vietas, kas saista ekstracelulāro matrici ar citoskeletu. Mehāniski inducētā remodelācija tiek realizēta caur vairākiem atgriezeniskās saites principa mehānismiem, kuri ietver citokīnu – IL1, IL6 –, osteoblastu un fibroblastu priekšteču sintezētā nukleārā faktora κ B liganda receptora aktivatora (RANKL) sintēzi. Sintēzi autokrīni un parakrīni regulē transkripcijas faktoru ekspresija, t.i., citokīni, augšanas faktori, enzīmi un molekulas, kuras piedalās mezenhimālo un citu šūnu diferenciācijā, proliferācijā un funkcijā (*Masella, 2006*).

Ortodontiska zobu pārvietošanās ir atkarīga no pieliktā spēka lieluma, virziena un ilguma (*Tanne, 1998*). No mehānikas viedokļa pirmā reakcija uz ortodontiskiem spēkiem ir PDS bojājums un apkārt esošā alveolārā kaula bojājums pieliktā spiediena un vilkšanas spēka vietā. Tas izraisa zoba intraalveolāro pārvietošanos un apkārt esošā alveolārā kaula liekšanos (*Cattaneo, 2005*).

Pacientu audu dažādā bioloģiskā atbilde uz mehānisko kairinājumu ir tieši atkarīga no PDS un alveolārā kaula šūnu populācijas, genoma un sintezētiem 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*).

3.4. Periodonta remodelācijas nozīme ortodontijā

Ortodontiskās ārstēšanas laikā sākuma izmaiņas periodonta audos spiediena pusē tiek iedalītas sākuma un sekundārajā fāzē, proti, notiek hialinizācija un kaula resorbcija.

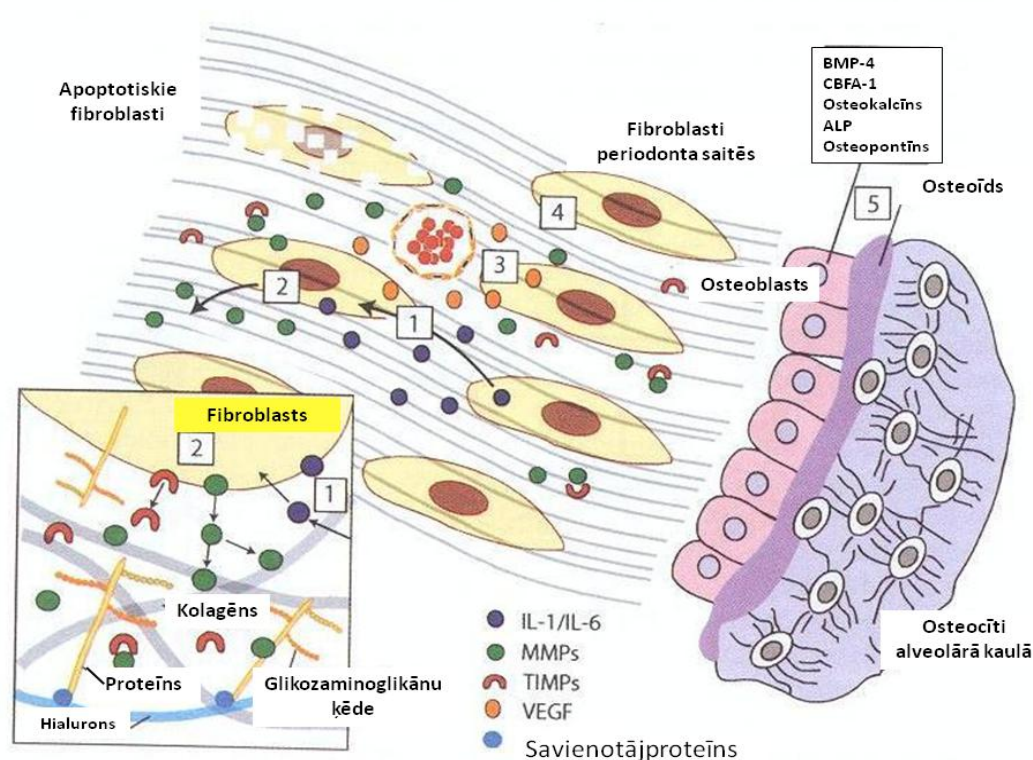
Hialinizācijas pakāpe ir atkarīga no pieliktā spēka stipruma. Tāpēc lieli spēki izraisa kaula nekrozi un plašu hialinizācijas zonu, kas ir atdalīta no nekrotiskās, jo satur jaunveidotas šķiedras un asins kapilārus. Molekulārie mehānismi, kas atšķir hialinizētos audus no nekrotiskiem, nav līdz galam skaidri,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

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) IL1 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. 3. 4. 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 reakciju uz spiedienu. *Kanasaki et al.* (2002) atrada, ka šūnu signāli no saspiestiem PDS fibroblastiem stimulē osteoklastoģenēzi perifērajās 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

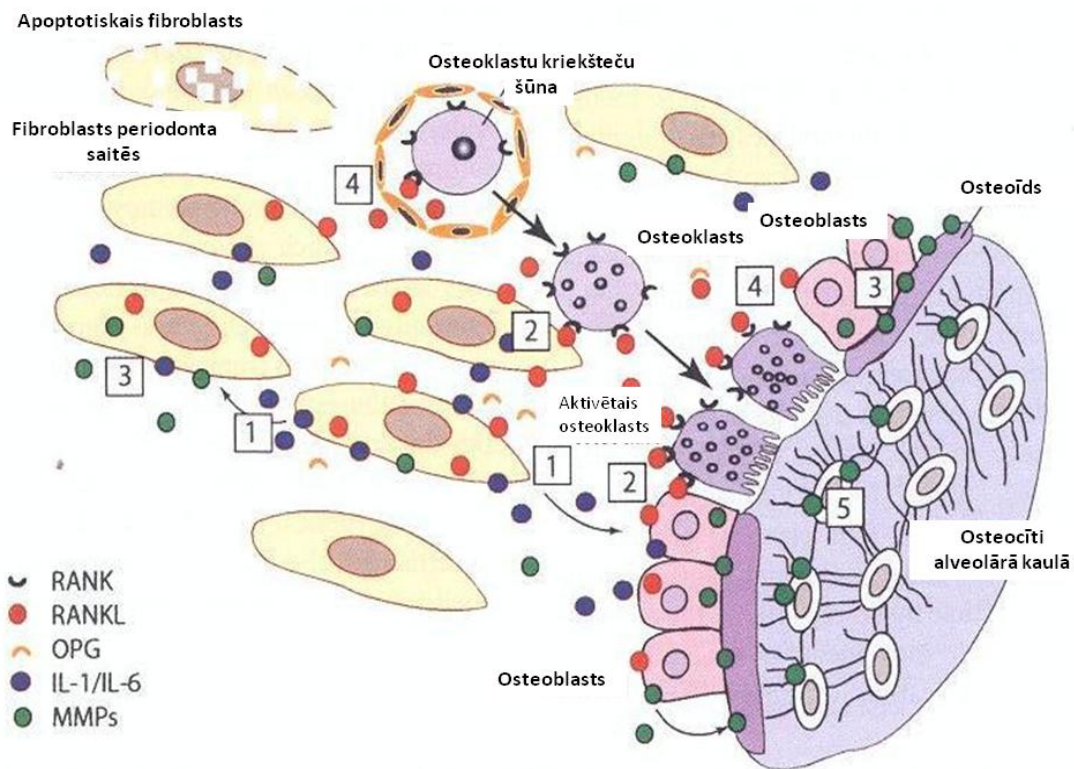
kaula resorbcija. Visvairāk šo procesu pētīšanai ir piemērotas *in vivo* metodes (sk. 3. 4. 2. attēlu), jo molekulārā līmeņa notikumi rada kaskādes tipa reakcijas, piemēram, osteoklastu un gigantšūnu proliferāciju un aktivāciju (Mumm, 2004).

Pētījumos par žurku zobu pārvietošanos ar *in situ* hibridizācijas metodi atklāja IL1 β un IL6, mRNS (bet ne TNF- α) ekspresijas palielināšanos gan no PDS šūnām, gan no osteoblastiem spiediena pusē (Alhashimi *et al.*, 2001), kā arī MMP-8 (kolagenāze-2) un MMP-13 (kolagenāze-3) sintēzi. RANKL, OPG un mRNS tiek plaši sintezēti periodontālo audu osteoblastos un PDS šūnās (Ogasawara *et al.*, 2004). Ortodontiski pārvietojot zobus, pēc Valdo metodes (Waldo un Rothblatt, 1954) daudzkodolainajos osteoklastos tika atrasti pozitīvi RANKL un RANK signāli, kas nodrošina aktīvu kaula resorbciju. Osteoklastos tika konstatēta arī IL1 β un TNF- α ekspresija.



3. 4. 1. attēls. Periodonta pārbūve vilkšanas pusē:

1 – pēc hipotētiskā modeļa PDS fibroblasti spiediena rezultātā sintezē citokīnus, piemēram, IL1 un IL6; 2 – IL1 un IL6 stimulē MMP un inhibē TIMP sintēzi PDS šūnās parakrīnā un autokrīnā veidā; 3 – mehāniski aktivētu fibroblastu producēts VEGF izsauc angiogēnēzi; 4 – MMP ierosinātā ekstracelulārās matricas degradācija turpinās ar šūnu proliferāciju un kapilāru augšanu; 5 – PDS šūnas, osteoblasti un kaulu veidojošās šūnas ieiet biosintēzes fāzē, sintezējot strukturālās un citas matricas molekulas (Meikle, 2006).



3. 4. 2. attēls. **Periodonta pārbūve spiediena pusē:**

1 – pēc hipotētiskās teorijas modeļa PDS fibroblasti spiediena rezultātā sintezē citokīnus, piemēram, IL1 un IL6; 2, 3 – IL1 un IL6 autokrīnā un parakrīnā ceļā stimulē RANKL un

MMP ekspresiju PDS šūnās un osteoblastos. Osteoblastu sintezētās MMP degradē nemineralizēto kaula osteoīda slāni, tikmēr PDS sintezētā MMP degradē ekstracelulāro matrici; 4 – RANKL stimulē osteoklastu veidošanos no mononukleārām priekšteču šūnām, kas migrē uz kaula virsmu un degradē mineralizēto matrici; 5 – alveolārā kaula deformācija stimulē MMP ekspresiju tajos osteocītos, kas atrodas tuvu kaula virsmai (Miekle, 2006).

3.5. Augšanas faktoru nozīme kaula un periodonta remodelācijas procesā

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 (TGFβ) stabilizē kolagēno matrici, samazinot fibroblastu MMP sintēzi un sekrēciju. TGFβ 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, 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 un bieži bez funkcionālās orientācijas, kā arī bez pietiprināšanās blakus esošiem audiem. Pateicoties šūnu aktivitātei, pilnīga šķiedru reorganizācija notiek dažu nedēļu laikā (*Caton, 2000*).

3.5.1. Transformējošais augšanas faktors β (TGF β)

Transformējošais augšanas faktors β ir izplatīts peptīds, ko spēj izdalīt gandrīz visas zināmās organisma šūnas. Tas regulē virkni šūnas procesu – proliferāciju, diferenciāciju, ekstracelulārās šūnas matricas veidošanos, hematopoēzi, angiogēni, imūno atbildi un šūnu apoptozi (*Massague, 2003*).

TGF saime pieder plaši izplatītiem augšanas faktoriem un iekļauj sevī piecas TGF β izoformas (TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, TGF β 4, TGF β 5), kaula morfoģenētiskos proteīnus (BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7), inhibīnus, aktivīnus, augšanas diferenciācijas faktorus (*Kulkarni, 2003*).

TGF β stimulē mezenhimālas izcelsmes šūnas un inhibē ektodermālas izcelsmes šūnas. *In vivo* TGF β inhibē daudzus šūnu veidus, piemēram, epiteliālās, endoteliālās, hemopoētiskās šūnas un limfocītus (*Miyazono, 1994*). TGF β ietekmē audu embriogēni, šūnu normālo fizioloģiju, apoptozi, audu reģenerāciju un iekaisuma procesu (*Oka, 2007*). TGF β tiek atbrīvots no trombocītiem pēc recekļa veidošanās lūzuma vai kaula defekta vietā, un TGF β 1 izdale ir saistīta ar periostālo audu proliferāciju, par ko liecina novērotā izteiktā imūnhistoķīmiskā TGF β reakcija agrīnā lūzuma periodā (*Rosier, 1998*). Visizteiktāko krāsojumu novēroja skrimšļa šūnu augšanas un endohondrālās pārkaulošanās laikā, jo TGF β izdalās vietās, kur notiek aktīva kaulaudu reģenerācija.

Ekstracelulārās matricas veidošanā TGF β darbojas kā hemotaksisks peptīds, kas tieši ietekmē fibroblastus. Izveidojoties receptora liganda kompleksam,

fibroblastos notiek sintēze un izdalās I un IV tipa kolagēns, fibronektīns un tenascīns. Paralēli šiem procesiem TGFβ darbojas kā starpnieks starp ECM noārdošām proteāzēm un to inhibitoriem, kā rezultātā pilnībā rodas ECM veidojošie proteīni (Verrecchia un Mauviel, 2002).

TGFβ1 ir “fundamentāla” molekula, jo tā palīdz veidot līdzsvaru starp šūnu augšanu un apoptozi. Traucējumi šajā regulācijas procesā rada patoloģiskas pārmaiņas, kā rezultātā attīstās dažāda veida slimības. Izteikta apoptoze ir raksturīga hroniski deģeneratīvām slimībām, bet nepietiekama apoptoze ir vērojama audzēju un autoimūno saslimšanu gadījumā. Ir novērots, ka TGFβ1 spēj inducēt apoptozi, lai iznīcinātu nenobriedušās šūnas (Sanchez-Capelo, 2005).

3.5.2. Fibroblastu augšanas faktors (FGF)

FGF ir liela augšanas faktoru grupa, kurā ietilpst 22 polipeptīdi, kuri iedalās pēc tipiskām strukturālām pazīmēm un kuriem ir nepieciešams heparīnsulfāts, lai aktivētu šūnu virsmas receptorus. Ir atklāti 4 tirozīnkināzes receptoru tipi, kuri nepieciešami augšanas faktoru darbībai. Atkarībā no šūnas tipa FGF ligandu signāls, kas caur FGFR tiek nodots mērķšūnai, izraisa atšķirīgas bioloģiskās atbildes reakcijas.

Notiekot organoģenēzei, FGF regulē šūnu pamatfunkcijas – proliferāciju, diferenciāciju, migrāciju, kas notiek embriogēneses laikā (Steiling, 2003). Pieaugušo organismā FGF ir svarīga loma brūču audu reģenerācijā un dzīšanā, kā arī audu homeostāzes nodrošināšanā (Ornitz, 2001; Mohammadi, 2005).

FGF klasē liela nozīme ir FGF1 un FGF2, kurus kaulu lūzumu gadījumā agrīnā dzīšanas stadijā ekspresē fibroblasti. Vairums eksperimentālo pētījumu ar dzīvniekiem liecina par FGF lielo nozīmi skeletālās un agrīnās nervu sistēmas attīstībā (Goldfarb, 1996; Eswarakumar, 2005; Ornitz, 2005).

Daudzos pētījumos tiek pierādīta šo augšanas faktoru spēja stimulēt kaulaudu reģenerācijas procesu (Schmid, 2009). Kato (1998) eksperimentālā pētījumā ar trušu lielo lielakaulu konstatēja, ka lokāla FGF2 aplikācija uzlabo kaula formēšanos plašu kaula defektu rajonos. Powers (2000) savā pētījumā pierādīja FGF1 un FGF2 ietekmi uz dažādu šūnu, piemēram, epiteliocītu, osteoblastu un hondrocītu, augšanu un diferenciāciju.

Traucēta FGFR ekspresija translokācijas un mutācijas skartā gēnā ir saistīta ar dažādu audzēju attīstību. Vienā no pētījumiem ir atzīmēta FGFR1 saistība ar krūts vēzi (*Yoshimura et al.*, 1998), citā pētījumā konstatēta FGFR nozīme prostatas audzēju gadījumos (*Itoh*, 2007). *Källicke* (2007) savā pētījumā pēc lokālas rekombinantā bFGF aplikācijas konstatēja samazinātu kaula rezistenci pret iekaisumu, kas trušiem notiek lūzuma vietā.

Ar FGFR1, FGFR2, FGFR3 saistītām mutācijām tiek saistītas dažādas skeletālas patoloģijas (*Naski*, 1998). Šos traucējumus iedala divās grupās – kraniosinostozēs (Aperta sindroms, Kruzona sindroms, Feifera sindroms, *Jakson-Weiss* sindroms un nesindromiskās kraniosinostozes) un hondrodispāzijas sindromos (hipohondroplāzija, ahondroplāzija). Šīs mutācijas ir autosomāli dominantas un vairumā gadījumu sporādiskas (*Ornitz*, 2005).

3.6. Citokīni un kaula starpšūnu telpas funkcionālie proteīni

Viena no nozīmīgākajām atziņām saistaudu bioloģijā 20. gadsimta 80. gados bija, ka citokīnu darbība neaprobežojas tikai ar imunoloģisko atbildi uz svešu antigēnu, bet tos producē arī saistaudu šūnas fibroblasti un osteoblasti, kuri ir iesaistīti normālā kaula remodelācijas procesā. Citokīni ir proteīni ar zemu molekulāro masu (< 25 kDa), kurus producē šūnas un kuri regulē vai pārveido šūnas reakciju autokrīnā vai parakrīnā veidā. Pie citokīniem pieder interleikīni (IL), tumora nekrozes faktori (TNF), interferoni, augšanas faktori un kolonijas stimulējošie faktori. Citokīnu bioloģiskās iedarbības izpratne ir sarežģīta, jo ir atkarīga no liela ietekmējošo faktoru skaita. Problēma ir faktā, ka vairākiem faktoriem – piemēram, IL1 un TNF – piemīt liela bioloģiskā aktivitāte un daudz bioloģisko efektu (*Meikle*, 2006).

Osteoblastiem ir noteicošā loma kaula remodelācijā – procesā, kas iekļauj mijiedarbību starp osteoblastiem un osteoklastiem, sistēmiskiem hormoniem, citokīniem un augšanas faktoriem. Sistēmiskie hormoni un mehāniskā stimulācija ietekmē remodelācijas procesu ar spēju kontrolēt citokīnu sintēzi un/vai darbību. Notiekot kaula remodelācijai visā skeletā, osteoblastu izdalītie citokīni ir ideāli lokalizēti, lai regulētu un pārveidotu citu šūnu darbību kaulā. Pirmais citokīns, kura iedarbību pierādīja ne tikai limfocītiem, bet arī kaula pārbūves procesā, bija IL1 (*Gowen et al.*, 1983; *Heath et al.*, 1985). Neilgi pēc tam *in vitro* pētījumos tika atklāta

arī TNF iedarbība uz kaula resorbciju un kaula formēšanas palēnināšanos (*Bertolini et al.*, 1986; *Meikle*, 2006).

Eksperimentos, kuros kaula smadzenes tika audzētas kaula resorbīvo aģentu – parathormona, 1,25(OH)₂ vitamīna D₃ un IL1 – klātbūtnē, pierādīja, ka osteoklastu formēšanās un funkcija ir atkarīga no stromas osteoblastu klātbūtnes. Osteoblasti producē stromā šķīstošos faktorus, kas tiek iesaistīti signālu apmaiņā starp osteoblastiem un osteoklastiem. Pēc vairākiem mēģinājumiem iegūt šo faktoru attīrītā veidā un to identificēt ar bioķīmiskām metodēm tika atklāts šūnas virsmas proteīns, kas bija identisks nukleārā faktora κB liganda receptora aktivatoram (*Jager*, 2005).

Osteoklastu priekšteču proliferācija, diferenciācija un nobriešana notiek ar osteoblastu palīdzību. Osteoklastu diferenciācijas pamatā ir starpšūnu signālu pārvade ar RANKL starpniecību. Parathormons un citi sistēmiskie hormoni, kā arī citokīni IL1, TNFα un IL6 stimulē kaula resorbciju ar to spēju regulēt stromas osteoblastu RANKL ekspresiju. Cits citokīns – osteoproteģerīns OPG (*Simonet et al.*, 1997), kuru arī producē stromas osteoblasti – darbojas kā osteoklastu funkcijas inhibitors, konkurējot ar RANKL par piesaisti membrānas receptoram RANK. Neapšaubāmi pierādījumi ļauj secināt, ka RANKL un OPG, kurus producē PDL fibroblasti un osteoblasti, ortodontiskas zobu pārvietošanas gadījumā ir nozīmīgi saistaudu pārbūves un kaula resorbcijas regulācijā (*Kanzaki*, 2004).

Lokālie un sistēmiskie faktori – citokīni, hormoni, augšanas faktori – un mehāniskā stimulācija aktivē osteoblastus producēt osteoproteģerīna ligandu, kas ir vitāli nepieciešams osteoklastu aktivitātei un diferenciācijai (*Lacey et al.*, 1998). Osteoblasti arī regulē nobriedušās osteoklastu kolonijas ne tikai ar osteoproteģerīna liganda sintēzes samazināšanos, bet arī ietekmējot intersticiālās kolagenāzes aktivitāti (*Holliday*, 2003).

Agrāko gadu pētījumi par vilkšanas spēka ietekmi uz šūnu metabolismu liecināja par to, ka, lai kas arī tiktu mērīts, rādītājiem bija tieksme palielināties. Šie novērojumi ļāva secināt, ka šūnu atbilde uz mehānisko kairinājumu drīzāk ir daļa no kopējās metaboliskās aktivitātes pieauguma nekā specifiska atbilde mehāniski pieliktam spēkam. *Rubin et al.* (2002) savos pētījumos ieguva datus, ka pārtrauktā tipa vilkšanas spēks, kas tika pielikts peļu kaula smadzeņu stromas šūnām, samazināja

RANKL mRNS ekspresiju aptuveni par 60%, un tika pieņemts, ka pieliktā spēka inducētā RANKL veidošanās samazinājums attiecināms uz kaula masas saglabāšanu fiziskās aktivitātes laikā. Papildus tam daži pētījumi par IL10 un IL12 ekspresiju (divi citokīni, kas inhibē osteoklastu veidošanos) parādīja, ka divu stundu laikā pēc pārtrauktā tipa vilkšanas spēka pielikšanas peles osteoblastiem galvaskausa velves daļā *in vitro* IL10 sintēze samazinājās (IL10 arī nomāc osteoblastu diferenciāciju) un IL12 sintēze palielinājās (*Garcia-Lopez et al.*, 2005). Tas pierāda, ka mehāniskā slogojuma gadījumā var tikt nomākta dažu citokīnu sintēze, un šie dati ļauj secināt par osteogēnēzi kā osteoblastisko šūnu sākotnējo atbildes reakciju uz mehānisko kairinājumu.

3.6.1. Interleikīni (IL)

1986. gadā *Meikle et al.* izteica pieņēmumu, ka tādi citokīni kā IL1, kas tiek sintezēti lokāli mehāniski aktivētajās šūnās, ir atbildīgi par signāla novadīšanu saistaudu remodelācijas – gan noārdīšanās, gan veidošanās – fāzēs. IL1 β lokalizācija kaķa kanīnu periodontālajos audos pēc pieliktiem spēkiem pierādīja šo hipotēzi (*Davidovitch et al.*, 1988). Kopš tā laika klīniskajos pētījumos ir pierādīts, ka IL1 β , TNF α , IL6 un epidermālais augšanas faktors smaganas rievās šķidrumā agrīnās ortodontiskās zobu pārvietošanas stadijās pieaug visiem pacientiem (*Grieve et al.*, 1994; *Lowney et al.*, 1995; *Uematsu et al.*, 1996). Tomēr IL1 β ir spēcīgāks kaula resorbcijas induktors un kaula veidošanās inhibitors nekā IL1 α , IL1 β inducē arī PGE2 sintēzi, stimulē kolagenāzes aktivitāti. IL1 β polimorfisms 15% fenotipisko variāciju gadījumā izraisa zoba saknes resorbciju. Šos rezultātus kopš tā laika ir apstiprinājuši vairāki pētījumi (*Masella*, 2006).

3.6.2. Nukleārais kappa B faktors (RANK) un tā ligands (RANKL)

Kaulu masa un izturība samazinās līdz ar vecumu. Šīs izmaiņas vēlāk izraisa osteoporozi un palielina kaulu lūzuma risku. Kaulu zudums, kas attīstās līdz ar vecumu, kā patoloģija ir sarežģīta un maz izpētīta. Kaula masa atspoguļo kaula veidošanos un resorbciju, kas šūnu līmenī ir koordinēta osteoblastu un osteoklastu aktivitāte. Osteoblasti regulē osteoklastu formēšanos un aktivitāti ar RANKL un OPG ekspresijas līmeni (*Cao*, 2003).

RANKL ir TNF saimes loceklis, un tas tiek ekspresēts osteoblastu un stromas šūnu virsmā, savienojoties ar tā receptoru RANK uz hemopoētisko priekšteču šūnu virsmas, tā esamība uz M-CFS stimulē osteoklastoģenēzi. OPG ir TNF supersaimes sekretējamais glikoproteīns un darbojas līdzīgi signālu bloķējošam proteīnam, kas sasaistās ar RANKL un novērš RANK aktivāciju. Tādējādi RANK/RANKL/OPG komplekss kontrolē osteoblastu un osteoklastu sasaisti un to aktivitāti, kontrolējot līdzsvaru kaula veidošanās un resorbcijas procesā (Cao, 2003).

Pētījumi ar cilvēka trabekulāro kaulu atklāj, ka RANKL ekspresija palielinās, kamēr OPG ekspresija novecojot paliek nemainīga (Fazzalari, 2001). Šūnu kultūrā atrasts, ka OPG ekspresija samazinās vecāku donoru šūnās (Makhluf, 2000), tomēr Browner *et al.* (2001) ziņoja, ka OPG līmenis serumā cilvēkiem ir gandrīz nemainīgs, taču vecākām žurkām OPG ekspresija locītavu skrimslī, kā arī periostālās šūnās un kortikālā kaula osteocītos ir zemāka (Ikeda, 2001).

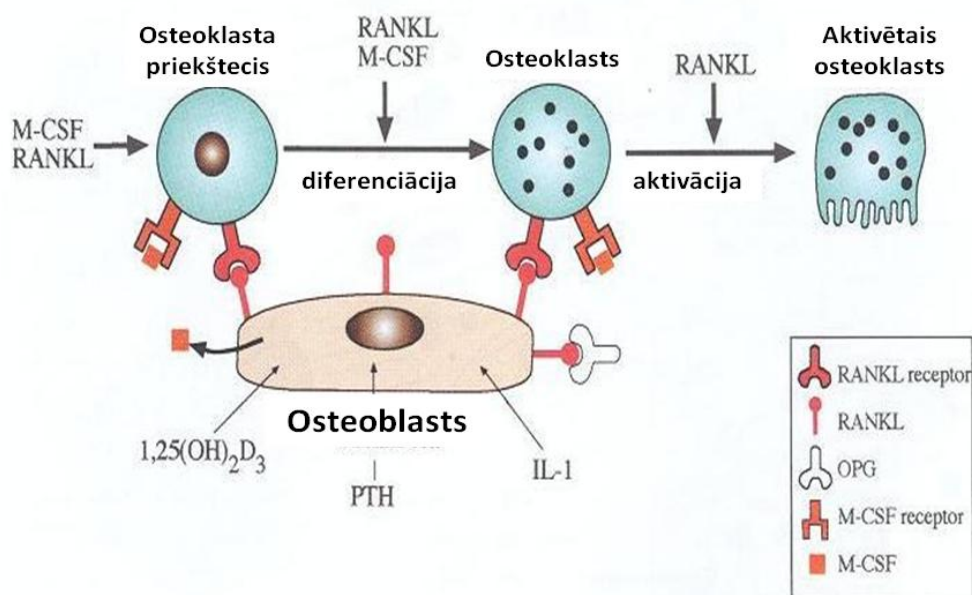
Ja RANKL ekspresija veciem dzīvniekiem ir palielināta, bet OPG ekspresija – samazināta, tad ir jābūt palielinātam arī osteoklastu priekšteču skaitam kaula smadzeņu daļā. Nozīmīgi ir tas, ka monocītu, makrofāgu, osteoklastu priekšteču skaits ar vecumu palielinās. Kaut arī šie dati liecina par to, ka novecošanas gadījumā var tikt bojāta RANKL un OPG ekspresija osteoblastos, *in vivo* rezultāti neuzrāda ar vecumu saistītās sistēmiskās izmaiņas, jo pētījumos ar šūnu kultūrām nav izdevies izmeklēt RANKL un OPG ekspresiju. Turklāt nav veikts neviens pētījums, kas pierādītu saistību starp novecošanos un RANKL/OPG ekspresijas ietekmi uz kaula masu (Cao, 2003).

3.6.3. Osteoproteģerīns (OPG)

Osteoproteģerīns pieder TNF saimei un to klasificē kā osteoklastu inhibējošo faktoru. Bioķīmiski OPG ir sekretorais glikoproteīns, kas sastāv no 401 aminoskābes atlikuma, un tas ir iedalīts 7 domēnos. OPG ir atrodams kā monomērs (60 kDa) un disulfīda saistīts homodimērs (120 kDa). Homodimērs, atšķirībā no monomēra, ir daudz aktīvāks (Venuraju, 2010). OPG ekspresē endoteliālās šūnas, gludās muskulatūras šūnas un osteoblasti (Zannettino, 2005).

OPG savienojas ar RANK un neļauj RANK ligandam savienoties ar receptoru, aktivējot to. Šo proteīnu triāde – OPG/RANK/RANKL – saskaņā ar vairākiem

ģenētiskiem un farmakoloģiskiem pētījumiem spēj regulēt osteoklastu darbību un arī kaula resorbciju (sk. 3.6.3.3. attēlu). OPG un citi RANKL inhibitori darbojas sistēmiski, neatkarīgi no lokālās kaula vielmaiņas un remodelējamās kaula virsmas. OPG kalpo kā lielisks rādītājs tam, kā notiek kaula remodelācijas process, jo OPG strauji samazina osteoklastu proliferāciju bez būtiskas ietekmes uz ostoblastu darbību (Kosteniuk, 2005).



3.6.3.3. attēls. **RANKL, OPG, un M-CSF loma osteoklastu nobriešanas un osteoblastu funkcijas regulācijā**

RANKL tika atrasts gan transmembranāli, gan šķīstošā formā, OPG – tikai sekretējamā formā. RANKL un OPG veido stabilu liganda un receptora sistēmu, kas regulē osteoklastu diferenciāciju. OPG darbojas kā osteoklastoģenēzes inhibitors, konkurējot ar RANKL par membrānas receptori. M-CSF iedarbojas tieši uz osteoklastu priekštečiem un kontrolē to proliferāciju un diferenciāciju. Kaula noārdīšanas stimulatori – 1,25(OH)₂, vitamīns D₃, parathormons un IL1 – palielina osteoklastu veidošanos, stimulējot RANKL ekspresiju osteoblastos (Meikle, 2006).

3.7. Kaula ekstracelulārās matricēs (ECM) nozīme kaulaudu remodelācijā

Kaula ekstracelulārās matricēs nozīme skeleta attīstībā agrāk netika pienācīgi novērtēta. Uzlabojoties rekombinantās DNS noteikšanas tehnoloģiskajām un dažādu struktūru ekstrakcijas procedūru metodēm, notika plašāka ECM pētījumu izpratne un padziļināta fizioloģisko procesu nozīmes izvērtēšana. Tika uzskatīts, ka ECM ir strukturāla matrice, kurā atrodas glikozaminoglikāni ar kolagēnu. ECM pēc

definīcijas ir statistiska struktūra, kas minimāli spēj ietekmēt audu struktūru, funkciju, attīstību un arī gēnu ekspresiju. Mūsdienās ECM vairs nav statistiska struktūra, bet dinamisks šūnu sekretētu biomarkieru un molekulu tīkls, kas ne tikai veido kompleksu arhitektūru starpšūnu telpā, bet arī regulē šūnu darbību, veicinot šūnu proliferāciju un diferenciāciju, ietekmējot augšanas faktorus un signāltransdukcijas ceļus (*Velleman, 2000*).

Nav noslēpums, ka kaula matrici veido organiskie un minerālie komponenti. Visvairāk pārstāvētais olbaltums kaula organiskajā ekstracelulārajā matricē ir I tipa kolagēns, kas sastāda apmēram 90% no kaula kopējā organiskā sastāva (*Sasano, 2000*). Otra lielākā ECM komponentu grupa ir nekolagēnie kaula ekstracelulārās matricē proteīni, kuriem ir nozīme kaula osifikācijas regulācijā un remodelācijā. Tādi proteīni kā, piemēram, osteonektīns, osteopontīns, kaulu sialoproteīns II, biglikāns un osteokalcīns pieder pie šīs grupas (*Gundberg, 2003*).

3.7.1. Osteokalcīns (OC)

Osteokalcīns (OC) pieder nekolagēniem kaula matricē proteīniem un to uzskata par kaula formēšanās marķieri (*Lee, 2000*). Kaut gan ir daudz pētījumu par osteokalcīnu, vēl joprojām nav precīzi definēta tā bioloģiskā funkcija kaula formēšanās un remodelācijas procesos (*Gundberg, 2003*). Osteokalcīns ir no K un D vitamīniem atkarīgs olbaltums, ko sekretē kaulu radošie osteoblasti, un tas saistās ar kalciju un hidroksiapatītu (*Desbois, 1995*).

Ducy (1996) eksperimentā ar ģenētisku osteokalcīna deficītu sirgstošām pelēm novēroja palielinātu kaulaudu masu, labāku kaula biomehānisko kvalitāti, osteoklastu skaita palielināšanos un pieaugošu kaula formēšanās ātrumu, bet kaula resorbcija tomēr netika ietekmēta.

Imūnhistoķīmiski izmeklējot osteokalcīna lokalizāciju cilvēka kaulos (*Ohta, 1989*), tika konstatēts, ka tas visaktīvāk tiek ekspresēts augļa 12. attīstības nedēļā. Arī vēlākās attīstības laikā un pieauguša cilvēka kaulos var konstatēt OC, bet tas vairāk lokalizējas osteoīdā.

3.7.2. Matricē metālproteināzes (MMP)

Matricē metālproteināzes (MMP) ir 26 proteolītisku, cinka atkarīgu enzīmu saime – endopeptidāzes, kas nodrošina ekstracelulārās matricē noārdīšanas un

remodelācijas procesus (*Kyrkanides et al.*, 2000), kā arī morfoģenēzi un brūču dzīšanu (*Holliday et al.*, 2003).

Pie kolagenāzēm pieder MMP-1, MMP-8, MMP-13 un MMP-18, tām piemīt spēja šķelt intersticiālo I, II un III tipa kolagēnu. MMP-8 (cilvēku neitrofilu kolagenāzi, kolagenāzi-2) producē ne tikai polimorfnukleārie (PMN) leukocīti, bet arī ne-PMN ģints šūnas – fibroblasti smaganās, kaula šūnas un plazmocīti (*Hanemaaijer et al.*, 1997; *Wahlgren et al.*, 2001; *Sasano et al.*, 2002). MMP-8 visefektīvāk hidrolizē I tipa kolagēnu (*Hasty et al.*, 1987) un tā ir galvenā intersticiālā kolagenāze iekaisušās cilvēka smaganās (*Kiili et al.*, 2002). MMP-1 (intersticiālā kolagenāze, kolagenāze-1) tiek sintezēta un sekretēta gan saistaudu šūnās, gan makrofāgos, un tā vairāk ir saistīta ar normālu audu pārbūvi un hidrolizē pārsvarā III tipa kolagēnu (*Welgus et al.*, 1981). Vairāki pētījumi liecina, ka MMP ir nozīmīga loma osteoklastu aktivācijā kaula noārdīšanās procesā. *Zhao et al.* (1999) *in vivo* eksperimentos ar pelēm atklāja, ka intersticiālās kolagenāzes aktivitāte ir nepieciešama parathormona inducētai kaula noārdīšanai (*Ingmann et al.*, 2005).

MMP2 un MMP9 ir želatināzes, kas šķeļ denaturētos kolagēnus, I, II un III tipa kolagēnus šķeļ MMP2. Pelēm ar MMP2 gēna trūkumu nenovēro nekādas anomālijas, tādējādi apstiprinot organisma efektīvu kompensācijas mehānismu. Cilvēkiem, kuriem MMP2 gēnā novēro mutācijas, attīstās multicentriskā osteolīze, kas ir reta autosomāli recesīva saslimšana ar raksturīgu kaula resorbciju un destrukciju. Tas liecina par MMP2 nozīmīgo lomu osteoģenēzes procesā (*Visse*, 2003).

MMP grupa, kas sevī ietver MMP3, MMP10 un MMP11, tiek dēvēta par stromlezīniem. Tie galvenokārt šķeļ proteoglikānus, fibronektīnus, kā arī IV, IX un X tipa kolagēnu. MMP7 un MMP26 pieder pie matrilizīniem, kas fizioloģiskos apstākļos siekalu dziedzeru epiteliālajās šūnās sekretē MMP7, kā arī aktīvā defensīnus, kas organismā darbojas kā dabīgie antimikrobie proteīni. MMP26 tiek ekspresēts placentā un endometrija audzēja gadījumos (*Visse*, 2003).

MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 un MMP-25 pieder pie membrānas tipa matricas metālproteināzēm. Individīdiem ar nulles MMP14 gēnu novēro skeletālas anomālijas, kas veidojas nepilnīgas kolagenolīzes rezultātā.

Lamaitre (2006) savā pētījumā norāda uz MMP svarīgo lomu šūnu proliferācijā, diferenciācijā un apoptozē, kā arī citokīnu, augšanas faktoru, to receptoru un enzīmu bioloģiskās aktivitātes regulēšanā. MMP piedalās gan orgānu attīstībā, gan iekaisuma, dzīšanas un citos fizioloģiskos, kā arī patoloģiskos procesos, pie kuriem pieder arī metastazēšanās (*Verma*, 2007). Dažādu saistaudu šūnas – fibroblasti, osteoblasti, endoteliālās šūnas – un proinflammatorās šūnas – makrofāgi, limfocīti un neitrofilie leukocīti – izdala MMP (*Haeusler*, 2005).

3.8. Apoptozes procesa raksturojums

Apoptoze ir absolūti nepieciešams process skeleta nobriešanā, nobriedušā kaula remodelācijā un kaula atjaunošanā. Veselā organismā pastāv cieša saistība starp kaula šūnu proliferāciju, diferenciāciju un apoptozi, kā rezultātā rodas adekvāta osteoklastu un osteoblastu mijiedarbība un pastāv kaula homeostāze.

1885. gadā V. Flemings pētīja zīdītāju olnīcu folikulus un ievēroja sadalījušos šūnu kodolus, nosaucot šo procesu par hromatolīzi (*Majno*, 1995). Terminu “apoptoze” (tas radies no sengrieķu vārda, kas apzīmēja “lapu krišanu”) 1972. gadā ieviesa *Kerr*, lai aprakstītu šūnu nāvi, ko novēroja, histoloģiski izmeklējot audu griezumus bez patoloģiskām izmaiņām (*Uren*, 1996).

Apoptoze jeb programmēta šūnu nāve ir šūnas realizēta nāve noteiktu ārēju vai iekšēju faktoru ietekmē. To raksturo specifiskas morfoloģiskas pārmaiņas – samazinās šūnas tilpums, kondensējas kodols, sakrokojas šūnas plazmatiskā membrāna un fragmentējas kodols (*Jilka*, 1998). Apoptozes turpinājumā fragmentējas pati šūna un veidojas apoptotiskie ķermenīši, kas tiek aizvākti ar fagocitozes palīdzību. Apoptozes norises laikā membrāna netiek pārrauta, tāpēc citoplazmas vielu nokļūšana starpšūnu vidē nenotiek un neattīstās iekaisums (*Saikumar*, 1999; *Maslinska*, 2003).

Apoptozes ierosināšana var notikt divējādi. Pirmkārt, apoptoze saistās ar kaspāzes proteolītisko aktivāciju un tiek ierosināta ar iniciatoru kaspāzēm 8 un 9, kas kaskādes mehānismā pavairo efektoru kaspāzes 3, 6, 7. Kaspāzes efektori ir atbildīgi par šūnas morfoloģijas degradāciju (*Earnshaw et al.*, 1999). Otrkārt, tas notiek ar nāves receptoru aktivāciju un oksidatīvā stresa palīdzību. Nāves receptoru aktivācija notiek ar receptoru ligandiem uz šūnas virsmas. Šis ceļš tiek aktivēts ar TNF receptoriem, kas savukārt aktivē kaspāzi 8. Otrais ceļš tiek aktivēts ar tādu molekulu

palīdzību kā citohroms c, ko sekretē mitohondriji. Tas izraisa oksidatīvo stresu, kas rada izdzīvošanas signālmolekulu – augšanas faktoru un citokīnu – zudumu un kaspāzes 9 aktivāciju (Hengartner, 2000).

Apoptoze nodrošina visa organisma līdzsvaru. Ar apoptozi netiek ietekmētas audu funkcijas, bet tiek aizvāktas šūnas ar ģenētisku defektu, novecojošas, kā arī patoloģisku procesu skartas šūnas (Kiechle, 2002). Apoptoze pastiprinās vīrusu infekcijas laikā, kad audi atbild uz toksīnu darbību (Uren, 1996). Apoptozes procesu traucējumu rezultātā, palielinoties vai samazinoties apoptotiskai aktivitātei, rodas vairākas patoloģiskas saslimšanas, tādas kā audzēji, neirodeģeneratīvas, autoimūnas un asinsrades patoloģijas (Kiechle, 2002).

Atšķirībā no apoptozes, nekroze ir deģeneratīvs process, kas var notikt išēmijas, toksīnu, traumas un citu patoloģisku stimulu rezultātā. Nekrozi raksturo šūnas organelļu sabrukšana un šūnu membrānas pārrāvumi, kā rezultātā intracelulārais saturs izdalās un veidojas iekaisums (Manjo, 1995).

Programmētu šūnu nāvi novēro visās skeleta veidošanās stadijās un kaula remodelācijas procesā, tādejādi nodrošinot normālu kaula histoloģisko uzbūvi, kad pastāv nepieciešamais līdzsvars starp šūnu proliferāciju, diferenciāciju un apoptozi (Xing, 2002). Ar apoptozes palīdzību notiek kaula remodelācijas nodrošinošo šūnu nomaiņa. Augšanas faktori un citokīni var ne tikai stimulēt šūnas, bet arī izraisīt to apoptozi. Piemēram, TGF- β ir duālas dabas citokīns, jo vienlaikus var nodrošināt gan osteoklastu apoptozi, gan osteoblastu apoptozes inhibīciju (Manolagas, 2000).

Apoptozi nosaka, izmantojot dažādas metodes – gaismas mikroskopiju, elektronmikroskopiju, lāzera skenējošo mikroskopiju, gēnu ekspresijas analīzi vai arī, piemēram, ELISA, *Western blot* (Kiechle, 2002) metodes, nosakot ar apoptozi saistītos proteīnus. Tomēr visbiežāk izmanto TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling* jeb Tdt-gala dezoksīnukleotīdtransferāzes un digoksigēna marķēto nukleotīdu) metodi (Labat-Moleur, 1998). Šī metode efektīvi nosaka kodola DNS fragmentāciju, kas saistīta ar apoptozi (Liu, 2005).

4. MATERIĀLS UN METODES

4.1. Pētījuma grupa

Pētījumā tika iekļauti 45 pacienti, kuriem bija diagnosticētas dentoalveolāras anomālijas un nepieciešama ortodontiska ārstēšana. Pacienti tika sadalīti 3 grupās (Proffit, 2008):

1. grupa – pacienti vecumā no 12 līdz 14 gadiem raksturo pubertātes periodu, kad remodelācijas procesi notiek strauji un metabolā aktivitāte sasniedz savu augstāko punktu.

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

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

Pacientu skaits, dzimums, vecums un to sadalījumu pa grupām ir aplūkojams 4.4.1. tabulā.

4.4.1. tabula

**Pacientu absolūtais un procentuālais sadalījums pa pētījuma grupām
saistībā ar dzimumu**

Grupa	Dzimums				Kopā	
	Vīrietis		Sieviete		Skaits	Procenti
	Skaits	Procenti	Skaits	Procenti		
1. grupa (12–14 gadi)	5	33,3	10	66,6	15	33,3
2. grupa (15–22 gadi)	7	45,0	8	55,0	15	33,3
3. grupa (23–49 gadi)	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 (RSU) Stomatoloģijas institūta Mutes, sejas un žokļu ķirurģijas klīnikā no 2010. gada decembra līdz 2013. gada augustam pētījuma ietvaros pētāmos audus ieguva pēc ambulatoras zobu ekstrakcijas ortodontijas pacientiem un plānveida ortognātiskiem pacientiem – no augšžokļa premolāru, molāru un apakšžokļa molāru ekstrakcijas 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 faktoru un apoptotisko šūnu klātbūtni. Pētījumam tika izmantota anonīmu pacientu numerācija. Pētījumam būtiski bija dzimums, vecums, anamnēzes, kā arī klīniskie dati (ekstrakcijas vieta un ekstrahētā zoba diagnoze).

Zobu ekstrakcijas tehnika notika atbilstoši BO VAS “Veselības statistikas un medicīnas tehnoloģiju aģentūra” apstiprinātām tehnoloģijām (MK 01.02.2005. noteikumi Nr. 82). Adu gabaliņi (1–2 mm³ lieli) tika ņemti pacientiem no zobu ekstrakcijas vietu interrādikulārās septas, kuriem saistībā ar ortodontisko ārstēšanu tika indicēta zobu ekstrakcija, neveicot papildu operatīvu iejaukšanos.

4.2. Morfoloģisko pētījumu metodes

Adu fiksācija tika veikta nekavējoties – uzreiz operācijas telpā. Šim nolūkam tika izmantots piesātināts pikrīnskābes šķīdums (2% formaldehīda un 0,2% pikrīnskābes 0,1 M fosfātbufferī (pH 7,2)) jau iepriekš sagatavotā Ependorfa stobriņā. Šī metodika ir paredzēta imūnhistoķīmiskiem izmeklējumiem, kad jāfiksē īpaši maigas struktūras, piemēram, receptori, neuropeptīdi un augšanas faktori. Tā ir daudzkārt pārbaudīta praksē un operācijas palīgpersonālam prasa tikai apmēram 2 minūtes, tādējādi netraucējot pašas operācijas norisi.

Pēc tam adu gabaliņi tika nogādāti RSU Anatomijas un antropoloģijas institūta (AAI) 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, kas atrodas RSU Anatomijas un antropoloģijas institūtā (sistēmas un mikroskopi iegādāti 2003. gadā un ietver plašas

audu analīzes sistēmas). Audu bloki glabājas arhīvā RSU AAI Morfoloģijas laboratorijā šim nolūkam paredzētā skapī.

Kopumā no 45 cilvēku kaulaudu preparātiem tika sagatavoti 540 histoloģiskie griezumumi, 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*).

4.2.1. 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). Tad audu gabaliņus 12 stundas skaloja tiroīda buferī (pH 7,6), kas saturēja 10% saharozes, pēc tam audus ieguldīja parafīnā un ar mikrotomu sagrieza 3–5 µm biezus griezumus (*Stefanini et al., 1967*).

4.2.2. Preparātu krāsošana ar hematoksilīnu un eozīnu

Pēc preparātu deparafinēšanas tos 7 minūtes krāsoja ar hematoksilīnu, pēc tam tos 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 reižu lielu palielinājumu.

4.2.3. 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 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 pētījumā izmantotie faktori apkopoti 4.2.3.2. tabulā.

4.2.3.2. tabula

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

Faktors	Avots	Kods	Darba atšķaidījums	Ražotājfirma 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>
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	ab7971	1 : 100	<i>Abcam, UK</i>

Deparafinizāciju veica pēc vispārpieņemtās shēmas. Pēc 10 minūšu ilgas preparātu skalošanas PBS (fosfātu buferis, pH 7,4) šķīdumā tos uz 20 minūtēm ievietoja mikroviļņu krāsnī 4% sālsskābā nātrija citrāta buferšķīdumā. Pēc atdzesētu preparātu skalošanas ar PBS uz katra griezuma uzklāja pa 150 fl 3% ūdeņraža peroksīda un turēja 10 minūtes. Pēc tam preparātus atkal skaloja destilētā ūdenī un PBS, tad uz preparātiem uzpilināja primārās antivielas (piemēram FGFR1) – uz katra griezuma pa 30 μl (eksponēcijas laiks – 2 stundas), uz 30 minūtēm uzklāja LSAB + LINK (ar biotīnu saistītās sekundārās antivielas; kods K1015, *DakoCytomation*, Dānija), tad uz 25 minūtēm uzklāja LSAB + KIT (streptavidīnu, kas saistīts ar enzīmu peroksidāzi; kods K0690, *DakoCytomation*, Dānija) un uz 10 minūtēm – DAB

(substrāta hromogēno sistēmu; kods K3468, *Dako*, Dānija). Pēc tam preparātus īslaicīgi krāsoja hematoksilīnā.

Pozitīvas reakcijas gadījumā pētāmās struktūras nokrāsojās brūnas.

4.3. 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 griezumi tika ievietoti citrāta buferšķīdumā un ievietoti mikroviļņu krāsnī uz 10 minūtēm, lai fiksētu antigēnu. Pēc tam tos atdzesēja istabas temperatūrā, mazgāja PBS šķīdumā un uz 10 minūtēm ievietoja 0,1% BSA (vērša 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 30 minūtes inkubēja POD (aitas anti fluorescences antivielas ar mārutku peroksidāzi saistītais Fab fragments). Pēc tam griezumus uz 7 minūtēm pārklāja ar DAB (diaminobenzidīna hromogēnu) šķīduma peroksidāzes noteikšanai. Tad audu griezumus noskaloja destilētā ūdenī, kontrastkrāsošanai (20 sek.) lietoja hematoksilīnu un eozīnu. Nokrāsotos preparātus apstrādāja ar polistirolu un nosedza ar segstikliņu.

Histoloģiskie griezumi tika mikroskopēti ar *Leica* DM RB gaismas mikroskopu 400 reižu lielā palielinājumā. Apoptotisko šūnu skaita novērtēšanai tika skaitītas apoptotiskās šūnas nejauši izvēlētos trīs redzes laukos, kas histoloģiskajā preparātā savstarpēji nepārklājās (*Itoh*, 2007).

4.4. Semikvantitatīvo datu konvertācija

Imūnhistokīmiski 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 matricēs proteīnu un deģenerācijas enzīmu daudzums tika analizēts viena griezuma trīs redzes laukos. Lietotie apzīmējumi apkopoti 4.4.3. tabulā.

Lai iegūtos datus apstrādātu statistiski, mikroskopa redzeslaukā novēroto šūnu skaits 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.

4.4.3. tabula

Imūnhistoķīmiski noteikto augšanas faktoru, kaula ekstracelulārās matricēs 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

4.5. 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 $0,3 < r < 0,7$,
- cieša korelācija ir, ja $r \geq 0,7$.

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

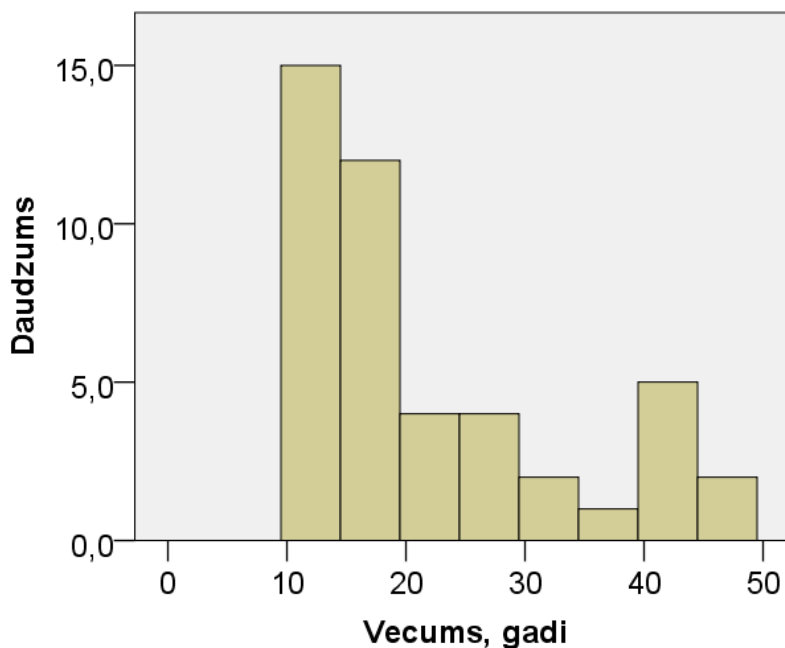
Analizējot nominālu vai rangu datus, lai salīdzinātu divu vai vairāku pazīmju proporcionālo sadalījumu, tika izmantota Pīrsona Hī kvadrāta statistiskā analīze (ja kontingences biežums > 5), savukārt Fišera precīzais tests izmantots, ja kontingences tabulas biežums < 5 .

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

5. REZULTĀTI

5.1. 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 15,5 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 iegūts, ka pacientu vecums neatbilda normālajam sadalījumam ($p < 0,001$). Visu pacientu vecuma histogramma attēlota 5.1.4. attēlā.



5.1.4. attēls. **Visu pacientu vecuma histogramma** - uz vertik. ass **Pacientu skaits, n**

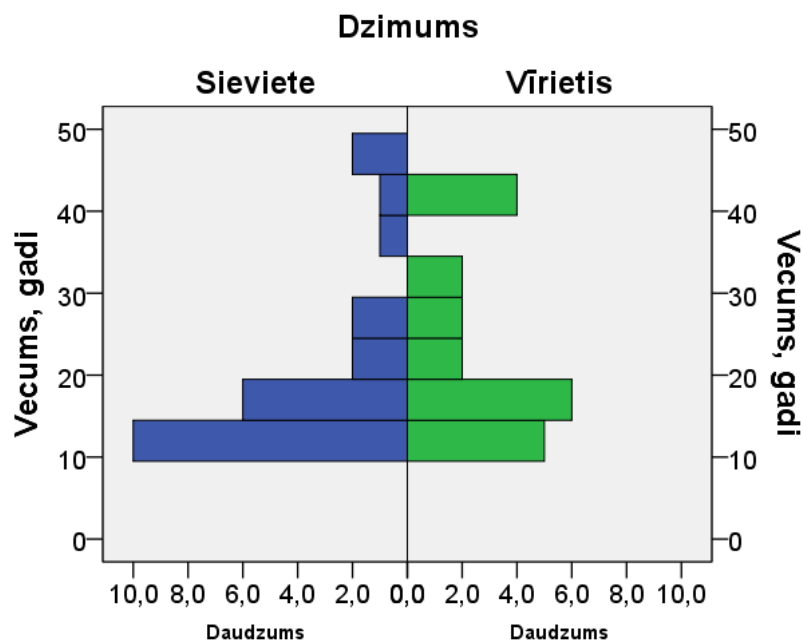
Pētījumā bija iesaistīts 21 vīrietis (46,67 %) un 24 sievietes (53,33 %), sk. 5.1.5. attēlu; izmantojot binomiālo testu, secināts, ka pētījumā vīriešu un sieviešu skaita proporcijas statistiski ticami neatšķīrās ($p = 0,76$).

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 ($t(43) = 0,92$; $p = 0,36$). Lēvena testa rezultāts rādīja, ka vīriešu un sieviešu vecuma sadalījuma dispersijas statistiski ticami neatšķiras ($F = 0,14$; $p = 0,70$).

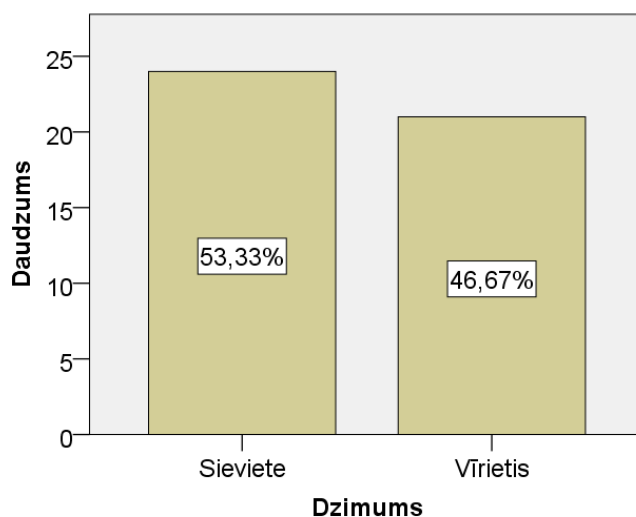
Izmantojot Šapiro–Vilka testu, atsevišķi pārbaudot vīriešu un sieviešu vecuma sadalījumu atbilstību normālajam sadalījumam, atrada, ka tie neatbilst normālajam sadalījumam (atbilstoši $p < 0,001$). Vīriešu un sieviešu vecuma histogramma attēlota 5.1.5. attēlā.



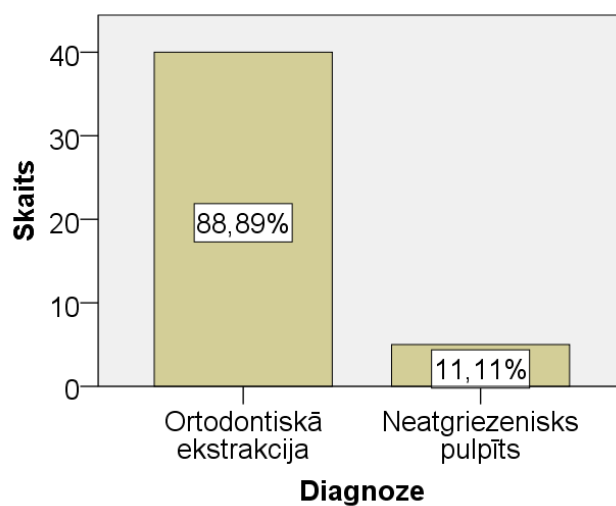
5.1.5. attēls. Vīriešu un sieviešu vecuma histogramma - uz horizont. ass Skaits, n

Sieviešu un vīriešu dzimuma pacientu procentuālā attiecība bija 53,33% pret 46,67% (5.1.6. attēls).

Pētījumā iekļauto pacientu skaits ar ortodontisko ekstrakciju bija vairāk nekā 4 reizes lielāks nekā pacientu skaits ar neatgriezenisku pulpītu (sk. 5.1.7. attēlu).



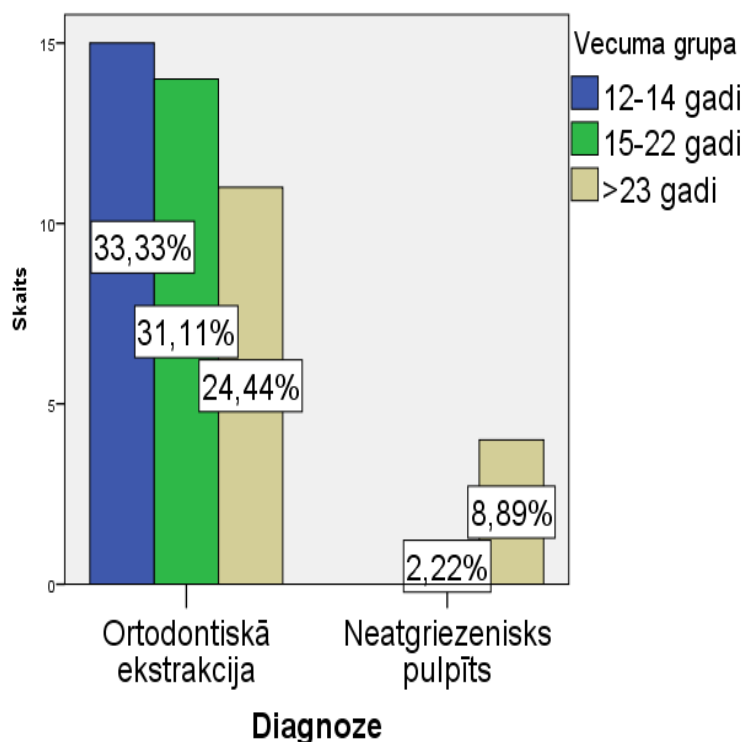
5.1.6. attēls. **Pētījumā iekļauto sieviešu un vīriešu procentuālais sadalījums - Skaits, %** (bet uz vertik. ass = absolūtie sk. n)



5.1.7. attēls. **Pētījumā iekļauto pacientu procentuālais sadalījums pēc diagnozes, Skaits, %** (bet uz vertik. ass = absolūtie sk. n)

Pētījumā iekļauto pacientu skaits pēc diagnozes dažādās vecuma grupās bija šāds: 1. grupā visiem pacientiem tika veiktas zobu ekstrakcijas ortodontisku indikāciju dēļ, 2. grupas pacientiem 31,11% gadījumu tika veiktas zobu ekstrakcijas pēc ortodontiskām indikācijām, bet 2,22% gadījumu – sakarā ar neatgriezeniskā pulpīta diagnozi, 3. grupas pacientiem 24,44% gadījumu ekstrakcijas tika veiktas ortodontisku indikāciju dēļ, bet 8,89% pacientu zobi tika ekstrahēti neatgriezeniskā pulpīta dēļ. Pētot sakarību starp vecuma grupu un diagnozi (5.1.8. attēls), izmantojot

Fišera eksakto testu, secinājām, ka tā pastāv un ir statistiski ticama ($p < 0,001$).



5.1.8. attēls. Pētījumā iekļauto dažāda vecuma pacientu diagnožu procentuālā attiecība

5.2. Rutīnas histoloģiskā atrade

Veicot hematoksilīna un eozīna pārskata krāsojumus, analizējamajos preparātos bija redzams, ka 1. grupas pacientiem (pacienti vecumā no 12 līdz 14 gadiem) morfoloģiskā aina atbilda augošo kaulaudu vispārpieņemtai normai. Bija atrodami pareizas formas osteocīti, osteonu kanāli ar izteiktiem asinsvadiem, kā arī saistaudi dažos osteonu kanālos (sk. 1. un 2. mikrofotogrāfiju pielikumā).

2. grupas pacientiem (pacienti 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 (sk. 3. un 4. mikrofotogrāfiju pielikumā).

Histoloģiskā aina, ko novēroja 3. grupas pacientiem (pacienti vecumā no 23 līdz 49 gadiem), atbilda nobrieduša kaula struktūrai ar novecošanās pazīmēm, arī ar saistaudu proliferāciju osteonu kanālos (sk. 5. un 6. mikrofotogrāfiju pielikumā).

5.3. Imūnhistoķīmiskās atrades: OPG

Analizējot OPG ekspresiju interrādikulārajā septā, konstatējām, ka 1. grupā bija vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru (sk. 7. mikrofotogrāfiju pielikumā), 2. grupā bija no maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru (sk. 8. un 9. mikrofotogrāfiju pielikumā), bet 3. grupā – neliels daudzums pozitīvu struktūru (sk. 10. un 11. mikrofotogrāfiju pielikumā). Balstoties uz Kruskala–Vallisa testu, secinājām, ka OPG daudzums dažādām vecuma grupām atšķiras statistiski ticami ($\chi^2 = 27,20$; $df = 2$; $p < 0,001$). OPG šūnu sadalījums pacientiem dažādās pacientu vecuma grupās redzams 5.3.4. tabulā.

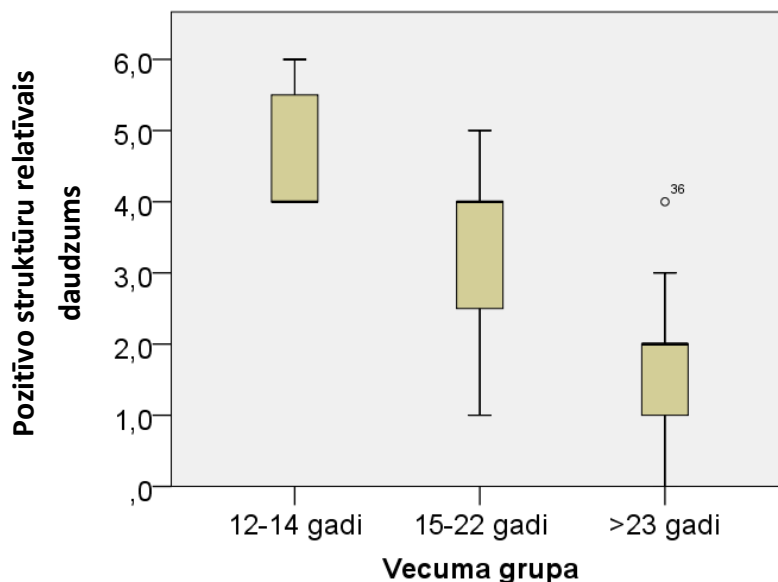
5.3.4. tabula

OPG* saturošo šūnu relatīvais daudzums interrādikulārajā septā dažāda vecuma pacientu grupās

Šūnu relatīvais daudzums	12–14 gadi (pacientu skaits, n)	15–22 gadi (pacientu skaits, n)	23 – 49 gadi (pacientu skaits, 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 – osteoproteģerīns

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 struktūru mediānas vērtības un 95% ticamības intervāls pacientu grupās redzams 5.3.9. attēlā.



5.3.9. attēls. **Osteoprotegerīna 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.

5.3.1. Matrices metālproteināze 8 (MMP8)

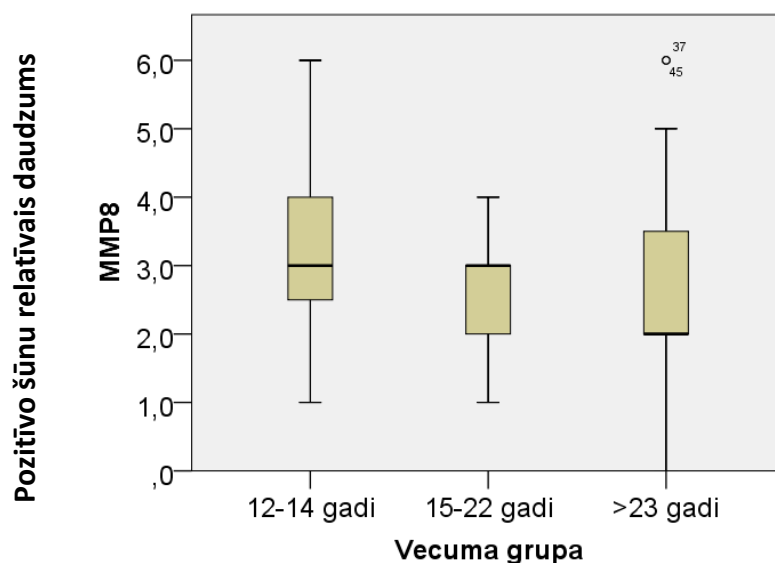
Analizējot MMP8 ekspresiju interrādikulārajā septā, konstatējām, ka 1. grupā bija galvenokārt maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru (sk. 12. un 13. mikrofotogrāfiju pielikumā), 2. grupā arī galvenokārt bija vidēji daudz pozitīvu struktūru, bet dažkārt to nebija vispār (sk. 14. mikrofotogrāfiju pielikumā), bet 3. grupā galvenokārt bija maz pozitīvu struktūru (sk. 15. mikrofotogrāfiju pielikumā). Balstoties uz Kruskala–Vallisa testu, tika secināts, ka MMP8 dažādām vecuma grupām statistiski ticami neatšķiras ($\chi^2 = 1,72$; $df = 2$; $p = 0,42$). MMP8 pozitīvo struktūru sadalījums kaulaudos dažādās pacientu vecuma grupās redzams 5.3.1.5. tabulā.

**MMP8* pozitīvo struktūru relatīvais daudzums dažāda vecuma
pacientu grupās**

Pozitīvo struktūru relatīvais daudzums	12–14 gadi (pacientu skaits, n)	15–22 gadi (pacientu skaits, n)	23 – 49 gadi (pacientu skaits, 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 – matricas metālproteināze

MMP8 pozitīvo struktūru 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 5.3.1.10. attēlā.



5.3.1.10. attēls. **MMP8 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.

5.3.2. Matrices metālproteināze 9 (MMP9)

Analizējot MMP9 ekspresiju interradikulārajā septā, konstatējām, ka 1. grupā galvenokārt bija vidēji daudz pozitīvu šūnu ar atsevišķiem izņēmumiem (sk. 16. mikrofotogrāfiju pielikumā), 2. grupā – maz līdz vidēji daudz pozitīvu šūnu (sk. 17. mikrofotogrāfiju pielikumā), bet 3. grupā – pārsvarā neliels daudzums pozitīvu šūnu (sk. 18. un 19. mikrofotogrāfiju pielikumā). 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 5.3.2.6. tabulā.

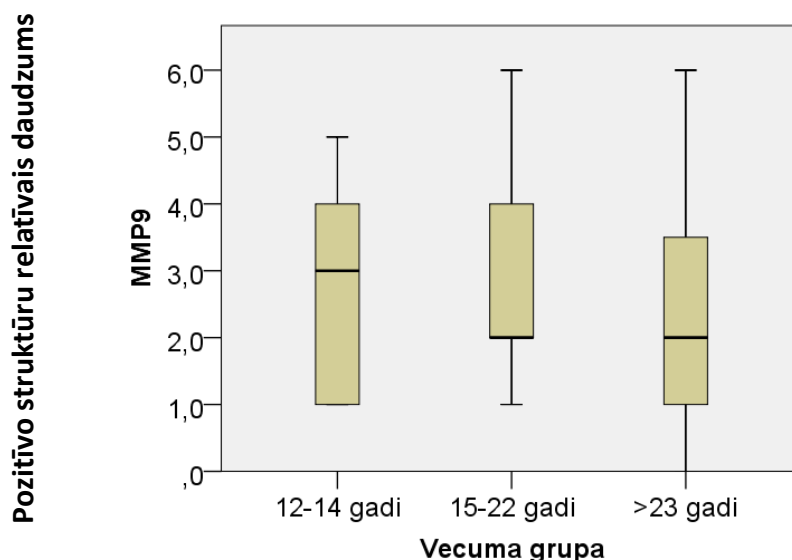
5.3.2.6. tabula

MMP9* pozitīvo struktūru relatīvais daudzums dažāda vecuma pacientu grupu kaulaudos

Pozitīvo struktūru relatīvais daudzums	12–14 gadi (pacientu skaits, n)	15–22 gadi (pacientu skaits, n)	23 – 49 gadi (pacientu skaits, 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 – matrices metālproteināze

MMP9 pozitīvo struktūru 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 5.3.2.11. attēlā.



5.3.2.11. attēls. **MMP9 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.

5.3.3. Nukleārais kappa faktors B105 jeb RANKL

Analizējot RANKL ekspresiju interradikulārajā septā, konstatējām, ka 1. grupā bija vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru (sk. 20. mikrofotogrāfiju pielikumā),

2. grupā galvenokārt bija vidēji daudz pozitīvu struktūru (sk. 21. un 22. mikrofotogrāfiju pielikumā), bet 3. grupā – neliels daudzums pozitīvu šūnu (sk. 23. un 24. mikrofotogrāfiju pielikumā). 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 pacientu vecuma grupās redzams 5.3.3.7. tabulā.

5.3.3.7. tabula.

RANKL* pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma sadalījums dažāda vecuma pacientu grupās

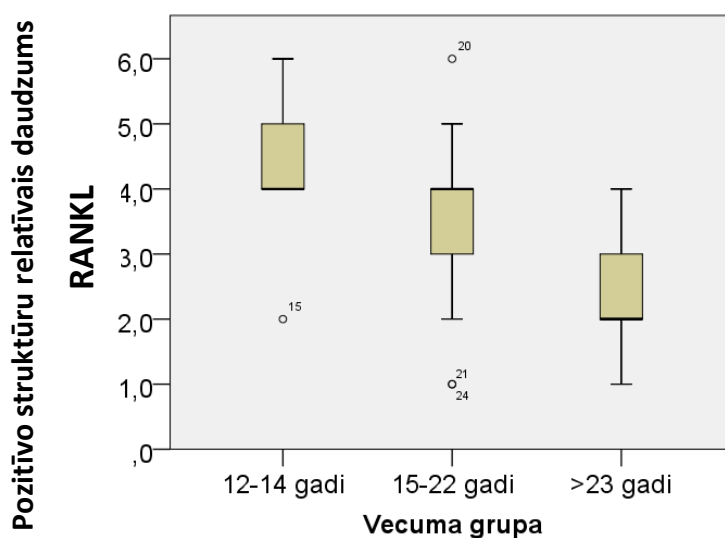
Pozitīvo struktūru relatīvais daudzums	12–14 gadi (pacientu skaits, n)	15–22 gadi (pacientu skaits, n)	23 – 49 gadi (pacientu skaits, n)
0	–	–	–
0/+	0	2	3

(tabulas nobeigums)

+	1	1	8
+/++	0	2	0
++	9	8	4
++/++++	1	1	0
+++	3	1	0

* RANKL – nukleārais faktors kappa B105

RANKL pozitīvo struktūru 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 5.3.3.12. attēlā.



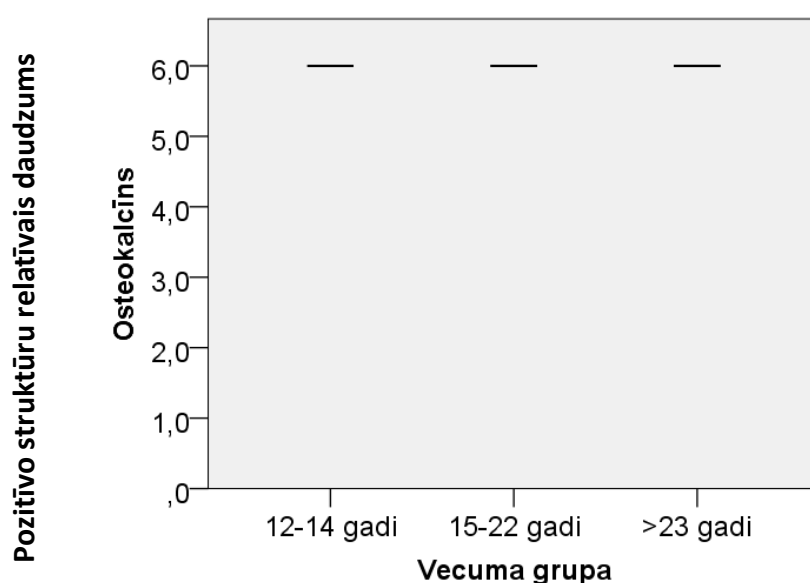
5.3.3.12. attēls. **RANKL pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma saistība ar pacientu vecumu**

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.

5.3.4. Osteokalcīns (OC)

Analizējot osteokalcīna pozitīvo struktūru relatīvo daudzumu interrādikulārajā septā, konstatējām, ka gan 1. grupā (sk. 25. mikrofotogrāfiju pielikumā), gan 2. grupā (sk. 26. un 27. mikrofotogrāfiju pielikumā), gan 3. grupā galvenokārt bija daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru (sk. 28. mikrofotogrāfiju pielikumā).

Osteokalcīna pozitīvo struktūru 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 5.3.4.13. attēlā.



5.3.4.13. attēls. **Osteokalcīna 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.

5.3.5. Transformējošais augšanas faktors β (TGF β)

Analizējot TGF β ekspresiju interrādikulārajā septā, konstatējām, ka 1. grupā galvenokārt bija daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru (sk. 29. un 30. mikrofotogrāfiju pielikumā), 2. grupā galvenokārt bija vidēji daudz pozitīvu struktūru (sk. 31. un 32. mikrofotogrāfiju pielikumā), bet 3. grupā bija vidēji daudz un arī maz pozitīvu struktūru (sk. 33. mikrofotogrāfiju pielikumā). Pēc Kruskala–Vallisa testa secinājām, ka TGF β dažādām vecuma grupām atšķiras statistiski ticami ($\chi^2 = 8,91$;

df=2;p = 0,01). TGFβ pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma sadalījums pacientiem dažādās pacientu vecuma grupās redzams 5.3.5.8. tabulā.

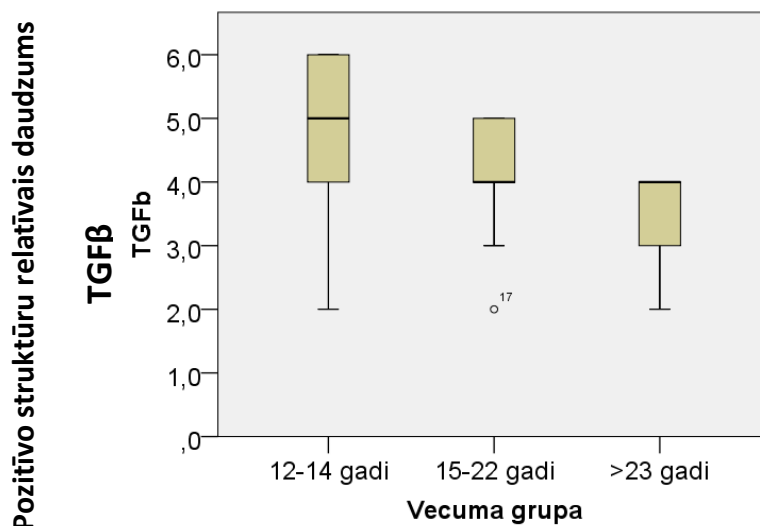
5.3.5.8. tabula

TGFβ* pozitīvo struktūru daudzums dažāda vecuma pacientu grupās

Pozitīvo struktūru relatīvais daudzums	12–14 gadi (pacientu skaits, n)	15–22 gadi (pacientu skaits, n)	23 – 49 gadi (pacientu skaits, n)
0	–	–	–
0/+	–	–	–
+	2	1	2
+/++	0	2	4
++	3	5	9
++/+++	3	5	0
+++	5	0	0

* TGFβ – transforējošais augšanas faktors beta

TGFβ pozitīvo struktūru 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 5.3.5.14. attēlā.



5.3.5.14. attēls. **TGFβ 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.

5.3.6. Fibroblastu augšanas faktora receptors 1 (FGFR1)

Analizējot FGFR1 ekspresiju interradikulārajā septā, konstatējām, ka 1. grupā bija izteikti daudz pozitīvu struktūru (sk. 34. un 35. mikrofotogrāfiju pielikumā), 2. grupā bija vidēji daudz pozitīvu struktūru (sk. 36. un 37. mikrofotogrāfiju pielikumā), kā arī 3. grupā bija vidēji daudz pozitīvu struktūru (sk. 38. mikrofotogrāfiju pielikumā). Balstoties uz Kruskala–Vallisa testu, secinājām, ka FGFR1 dažādām vecuma grupām neatšķiras statistiski ticami ($\chi^2 = 5,20$; $df = 2$; $p = 0,07$). FGFR1 pozitīvo struktūru daudzums kaulaudos dažādās pacientu vecuma grupās redzams 5.3.6.9. tabulā.

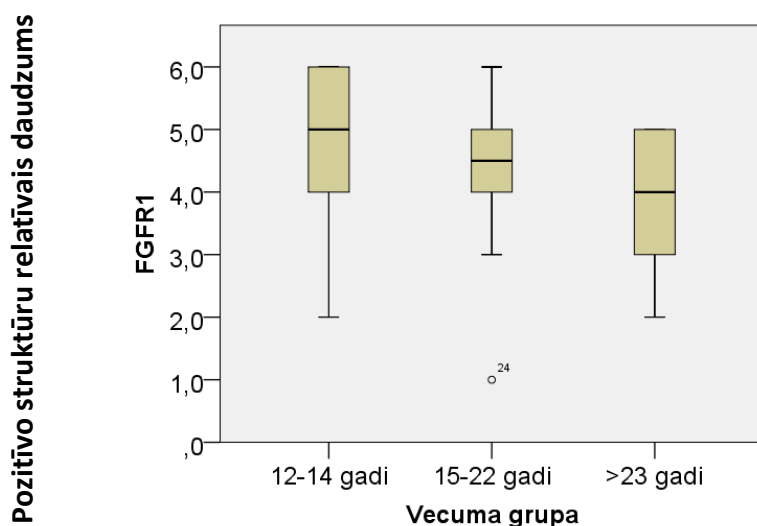
5.3.6.9. tabula

FGFR1* pozitīvo struktūru relatīvais daudzums dažāda vecuma pacientu kaulaudos

Pozitīvo struktūru relatīvais daudzums	12–14 gadi (pacientu skaits, n)	15–22 gadi (pacientu skaits, n)	23 – 49 gadi (pacientu skaits, n)
0	—	—	—
0/+	0	1	0
+	2	0	3
+/++	1	1	3
++	2	5	3
++/+++	3	5	6
+++	7	2	0

* FGFR1 – fibroblastu augšanas faktora receptors 1

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 5.3.6.15. attēlā.



5.3.6.15. attēls. **FGFR1 struktūru relatīvā daudzuma saistība ar pacientu vecumu**

Redzes laukā: 0 – netika redzēta 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.

5.3.7. Bāziskais fibroblastu augšanas faktors (bFGF)

Analizējot bFGF ekspresiju interrādikulārajā septā, konstatējām, ka 1. grupā bija nedaudz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru (sk. 39. un 40. mikrofotogrāfiju pielikumā), 2. grupā bija vidēji daudz pozitīvu struktūru (sk. 41. mikrofotogrāfiju pielikumā), bet 3. grupā galvenokārt bija nedaudz pozitīvu struktūru (sk. 42. un 43. mikrofotogrāfiju pielikumā). Balstoties uz Kruskala–Vallisa testu, secinājām, ka bFGF dažādām vecuma grupām atšķiras statistiski ticami ($\chi^2 = 9,50$; $df = 2$; $p < 0,01$). bFGF pozitīvo struktūru daudzums pacientiem dažādās pacientu vecuma grupās redzams 5.3.7.10. tabulā.

5.3.7.10. tabula

bFGF* pozitīvo struktūru daudzums dažāda vecuma pacientu grupu kaulaudos

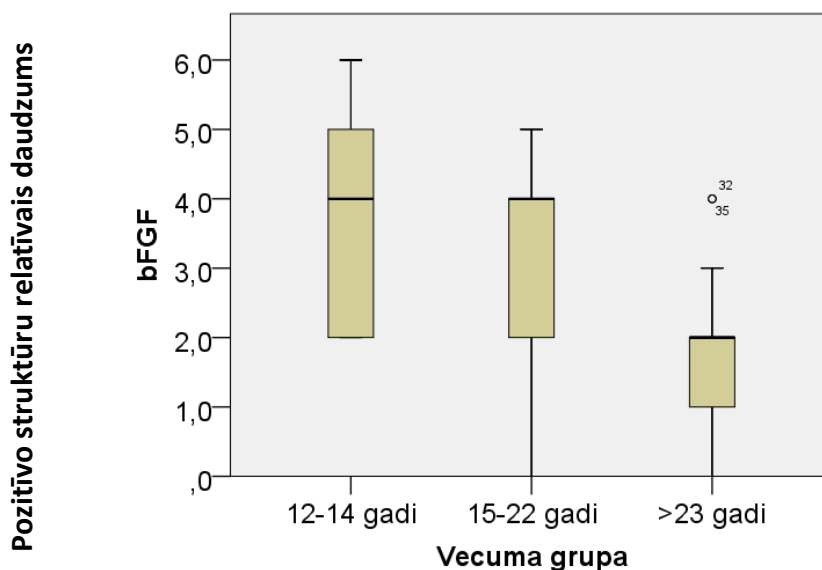
Pozitīvo struktūru relatīvais daudzums	12–14 gadi (pacientu skaits, n)	15–22 gadi (pacientu skaits, n)	23 – 49 gadi (pacientu skaits, n)
0	0	1	1
0/+	0	2	5
+	7	2	6
+/++	0	1	1
++	3	7	2

(tabulas nobeigums)

++/+++	2	2	0
+++	3	0	0

* bFGF – bāziskais fibroblastu augšanas faktors

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 5.3.7.16. attēlā.



5.3.7.16. attēls. **bFGF pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma saistība ar pacientu vecumu**

Redzes laukā: 0 – netika redzēta 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.

5.3.8. Interleikīns 6 (IL6)

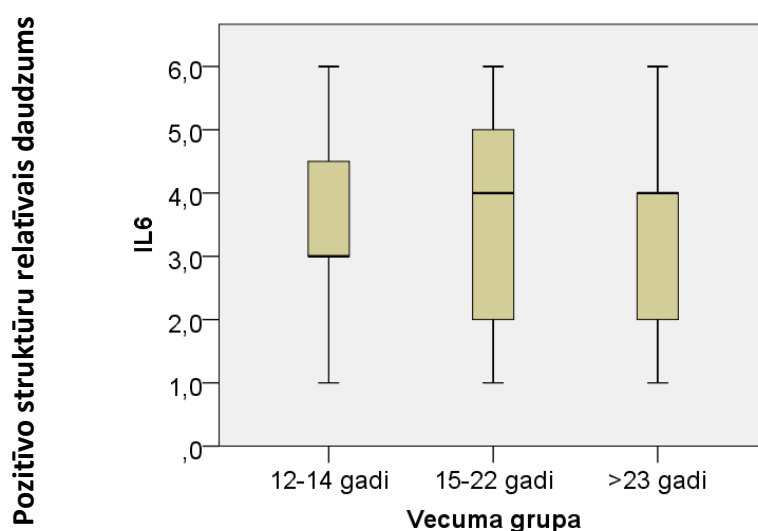
Analizējot IL6 ekspresiju interradikulārās septas audos, konstatējām, ka 1. grupā bija nedaudz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru (sk. 44. un 45. mikrofotogrāfiju pielikumā), 2. grupā bija maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru ar dažiem izņēmumiem (sk. 46. un 47. mikrofotogrāfiju pielikumā), bet 3. grupā galvenokārt bija vidēji daudz pozitīvu struktūru ar atsevišķiem izņēmumiem, kad to bija maz (sk. 48. un 49. mikrofotogrāfiju pielikumā). Balstoties uz Kruskala–Vallisa testu, secinājām, 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 pacientu vecuma grupās redzams 5.3.8.11. tabulā.

IL6* relatīvā daudzuma sadalījums dažāda vecuma pacientu grupās

Relatīvais daudzums	12–14 gadi (pacientu skaits, n)	15–22 gadi (pacientu skaits, n)	23 – 49 gadi (pacientu skaits, n)
0	—	—	—
0/+	1	3	3
+	1	2	2
+ /++	6	1	1
++	3	4	6
++ /+++	1	3	1
+++	3	2	1

* IL6 – interleikīns 6

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 5.3.8.17. attēlā.



5.3.8.17. attēls. **IL6 pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma saistība ar pacientu vecumu**

Redzes laukā: 0 – netika redzēta 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.

5.4. Apotozes raksturojums

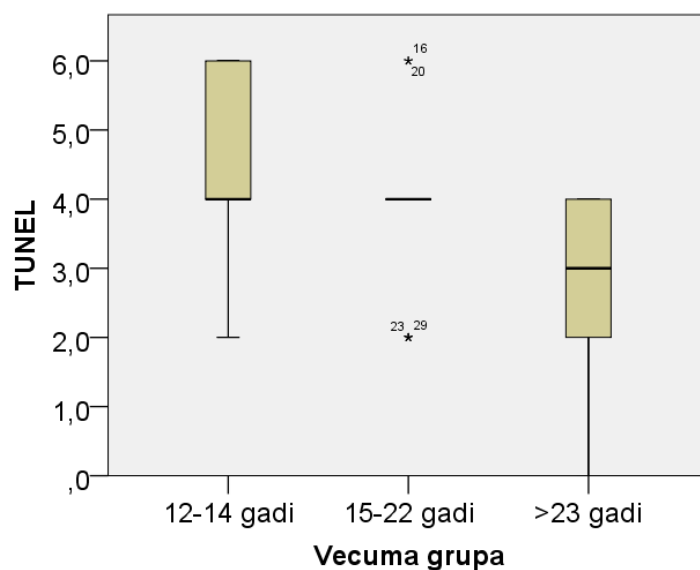
Analizējot apoptotisko šūnu relatīvo daudzumu interrādikulārās septas audos, konstatējām, ka 1. grupā bija izteikti līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru (sk. 50. mikrofotogrāfiju pielikumā), 2. grupā galvenokārt bija vidēji daudz pozitīvu struktūru ar izņēmumiem starp maz un daudz (sk. 51. un 52. mikrofotogrāfiju pielikumā), bet 3. grupā bija maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru (sk. 53. un 54. mikrofotogrāfiju pielikumā). Balstoties uz Kruskala–Vallisa testu, secinājām, ka apoptotisko šūnu skaits dažādām vecuma grupām statistiski ticami atšķiras ($\chi^2 = 10,82$; $df = 2$; $p = 0,004$). Apoptotisko šūnu sadalījums kaulaudos dažādās pacientu vecuma grupās redzams 5.4.12. tabulā.

5.4.12. tabula

Apoptotisko šūnu relatīvā daudzuma sadalījums dažāda vecuma pacientu grupās

Apoptotisko šūnu relatīvais daudzums	12–14 gadi (pacientu skaits, n)	15–22 gadi (pacientu skaits, n)	23 – 49 gadi (pacientu skaits, n)
0	0	0	0
0/+	–	–	–
+	1	3	3
+/++	1	0	3
++	4	8	4
++/++++	–	–	–
++++	5	2	0

Apoptotisko šūnu relatīvais daudzums 1. grupā bija $5,1 \pm 0,9$, 2. grupā $4,2 \pm 1,75$, 3. grupā $3,1 \pm 0,9$. Apoptotisko šūnu relatīvā daudzuma mediānas vērtības un 95% ticamības intervāls pacientu grupās redzams 5.4.18. attēlā.



5.4.18. attēls. **Apoptotisko šūnu relatīvā daudzuma saistība ar pacientu vecumu**

Redzes laukā: 0 – netika redzēta 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.

5.5. 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 neatšķiras ($p > 0,05$).

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

5.5.1. Dažādu faktoru relatīvā daudzuma savstarpējās korelācijas

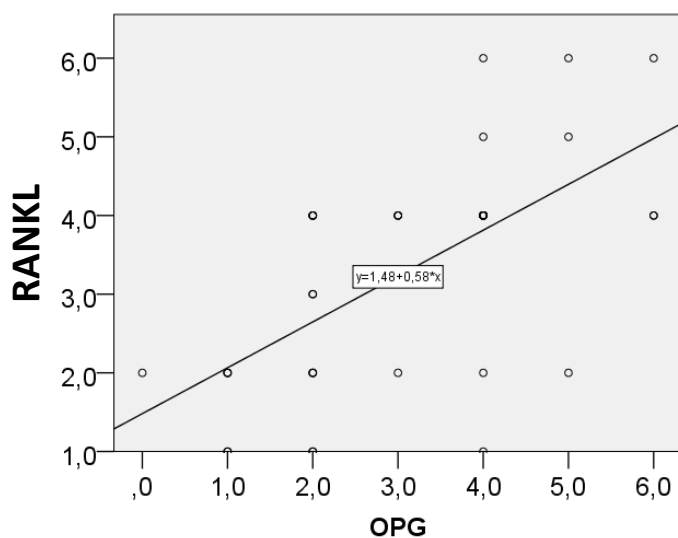
Iegūtie imūnhistoķīmisko pētījumu rezultāti tika analizēti, lai noteiktu savstarpējās korelācijas (5.5.1.13. tabula). Tika konstatētas vairākas faktoru relatīvā daudzuma savstarpējās saistības.

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

		OPG	MMP8	MMP9	RANKL	TGF β	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		
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	,42**	0,00	0,33*	0,46**	0,21	0,36*	0,10	0,19
	p	0,00	0,98	,045	0,00	0,20	0,03	0,53	0,26

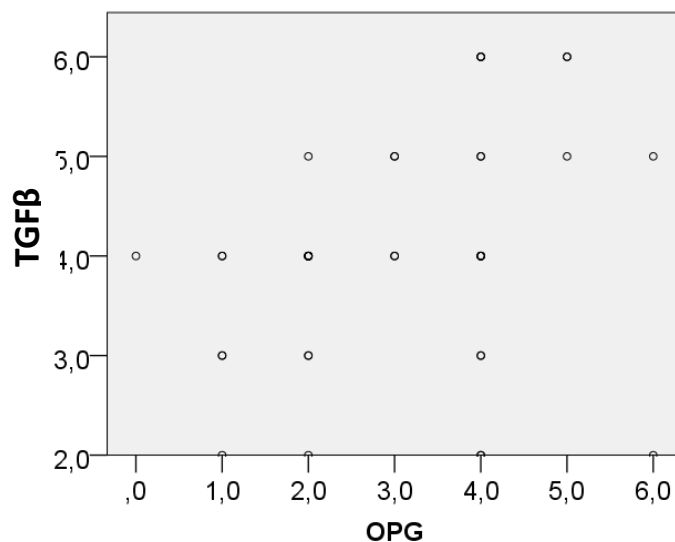
* – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,001$

Balstoties uz Spīrmena korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka, palielinoties OPG relatīvajam daudzumam, pieaug arī RANKL šūnu skaits, jo abus šos rādītājus saista **vidēja un statistiski ticama korelācija** ($r_s = 0,66$; $p < 0,001$). Korelācija starp OPG un RANKL relatīvo daudzumu ir parādīta 5.5.1.19. attēlā.



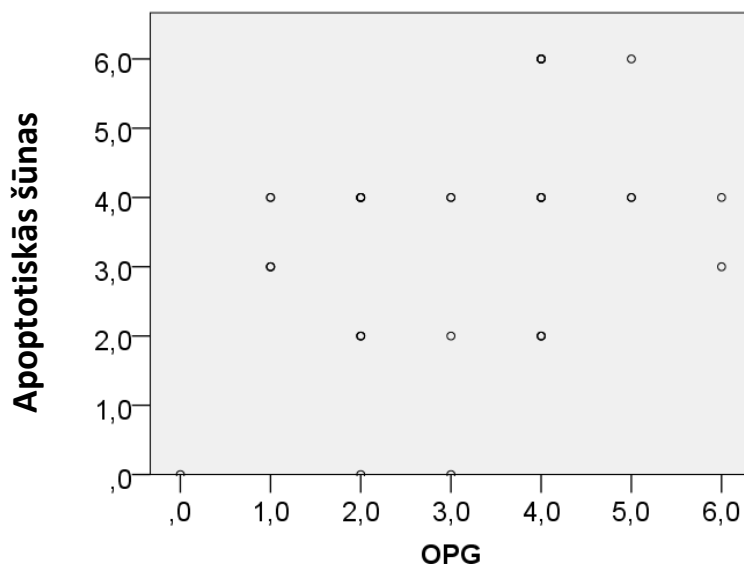
5.5.1.19. attēls. Korelācija starp OPG un RANKL relatīvo daudzumu

Balstoties uz Spīrmena korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka starp OPG un TGFβ struktūru relatīvo daudzumu pastāv **vidēja un statistiski ticama korelācija** ($r_s = 0,38$; $p = 0,01$). 5.5.1.20. attēlā parādīta korelācija starp OPG un TGFβ.



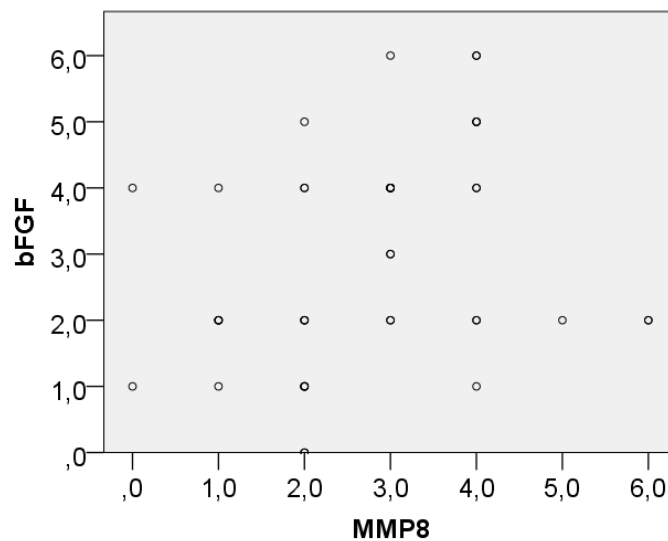
5.5.1.20. attēls. **Korelācija starp OPG un TGFβ relatīvo daudzumu**

Balstoties uz Spīrmena korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka starp OPG un apoptozes pozitīvo struktūru relatīvo daudzumu pastāv **vidēja un statistiski ticama korelācija** ($r_s = 0,42$; $p < 0,001$). 5.5.1.21. attēlā parādīta korelācija starp OPG un apototisko šūnu relatīvo daudzumu.



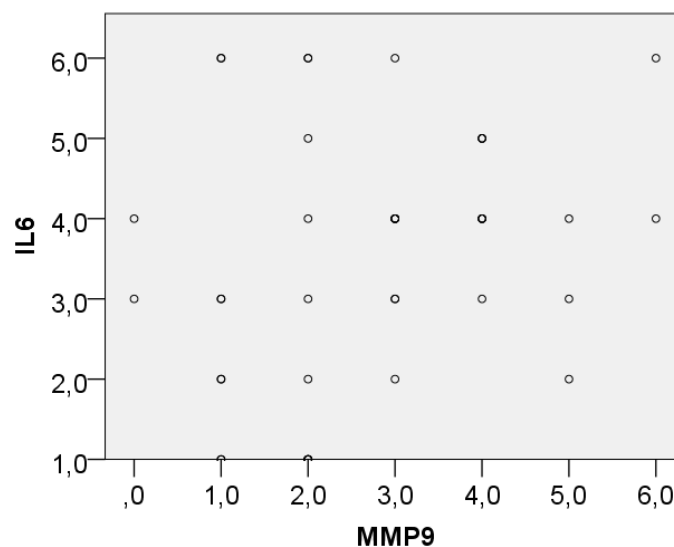
5.5.1.21. attēls. **Korelācija starp OPG un apoptotisko šūnu relatīvo daudzumu**

Balstoties uz Spīrmēna korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka starp MMP8 un bFGF relatīvo daudzumu pastāv **vidēja un statistiski ticama korelācija** ($r_s = 0,32$; $p = 0,02$). (5.5.1.22. attēls).



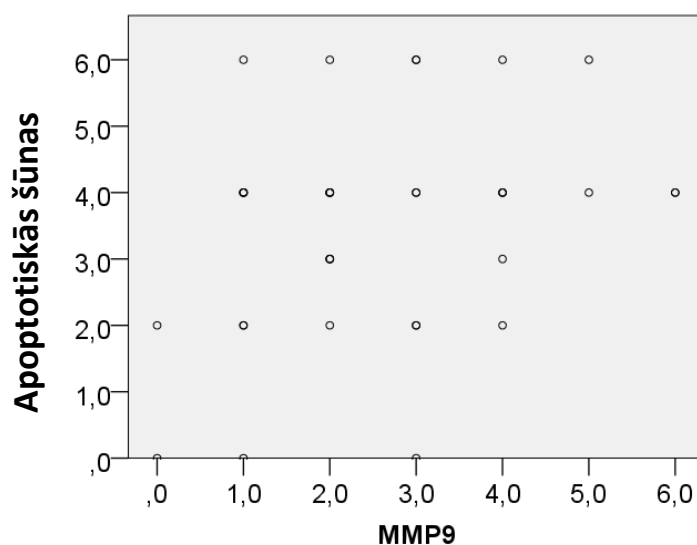
5.5.1.22. attēls. **Korelācija starp MMP8 un bFGF relatīvo šūnu daudzumu**

Balstoties uz Spīrmēna korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka starp MMP9 un IL6 relatīvo daudzumu pastāv **vāja un statistiski ticama korelācija** ($r_s = 0,30$; $p = 0,04$). (5.5.1.23. attēls).



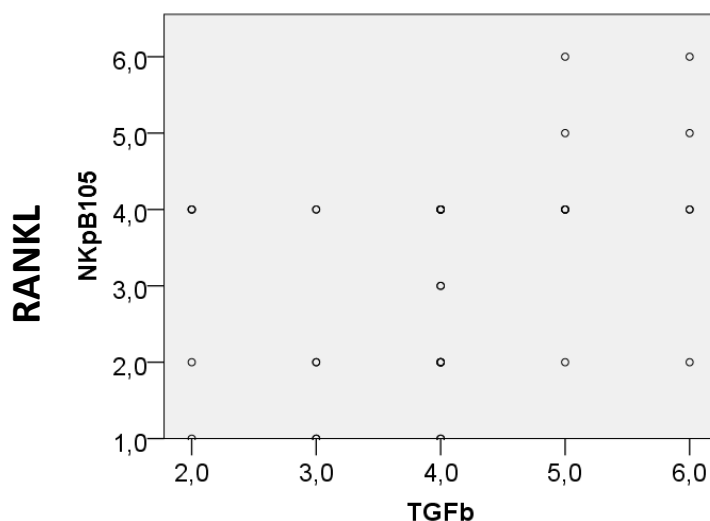
5.5.1.23. attēls. **Korelācija starp MMP9 un IL6 relatīvo šūnu daudzumu**

Balstoties uz Spīrmēna korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka starp MMP9 šūnu relatīvo daudzumu un apoptotisko šūnu relatīvo daudzumu pastāv **vidēja un statistiski ticama korelācija** ($r_s = 0,33$; $p = 0,04$) (5.5.1.24. attēls).



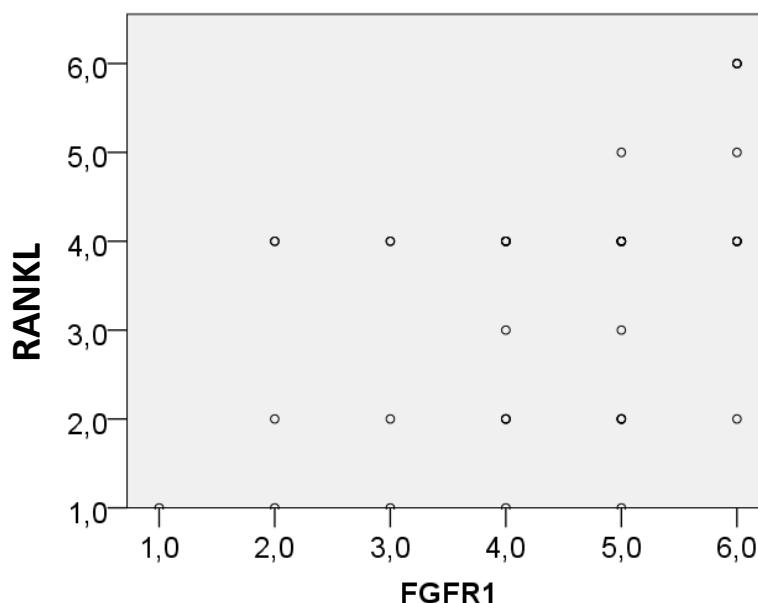
5.5.1.24. attēls. **Korelācija starp MMP9 un apoptotisko šūnu relatīvo daudzumu**

Balstoties uz Spīrmēna korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka starp RANKL un TGFβ relatīvo daudzumu pastāv **vidēja un statistiski ticama korelācija** ($r_s = 0,43$; $p < 0,001$) (5.5.1.25. attēls).



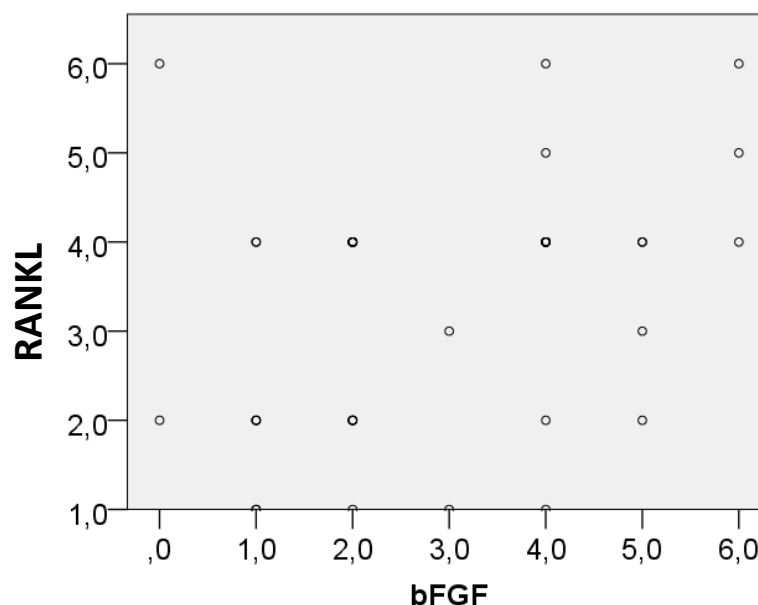
5.5.1.25. attēls. **Korelācija starp RANKL un TGFβ relatīvo šūnu daudzumu**

Balstoties uz Spīrmena korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka starp RANKL un FGFR1 relatīvo daudzumu pastāv **vidēja un statistiski ticama korelācija** ($r_s = 0,37$; $p = 0,01$) (5.5.1.26. attēls).



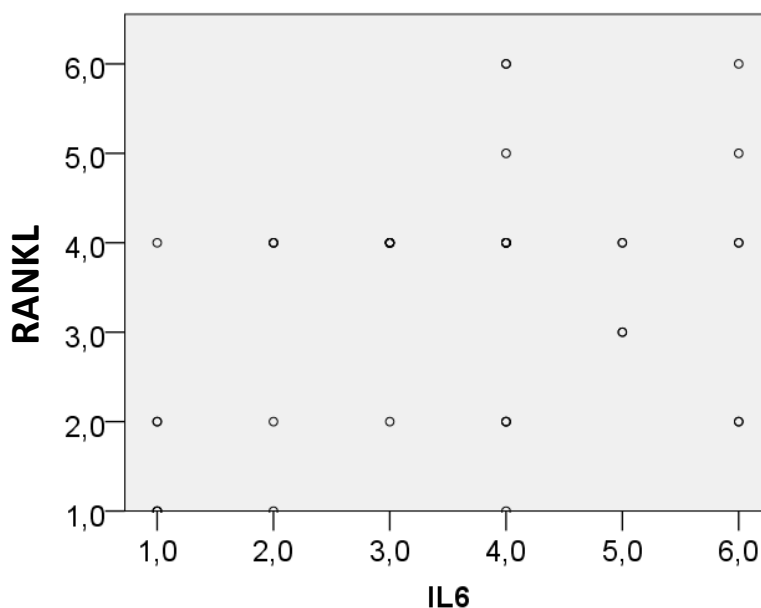
5.5.1. 26. attēls. **Korelācija starp RANKL un FGFR1 relatīvo daudzumu**

Balstoties uz Spīrmena korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka starp RANKL un bFGF pozitīvo struktūru relatīvo daudzumu pastāv **vidēja un statistiski ticama korelācija** ($r_s = 0,31$; $p = 0,03$) (5.5.1.27. attēls).



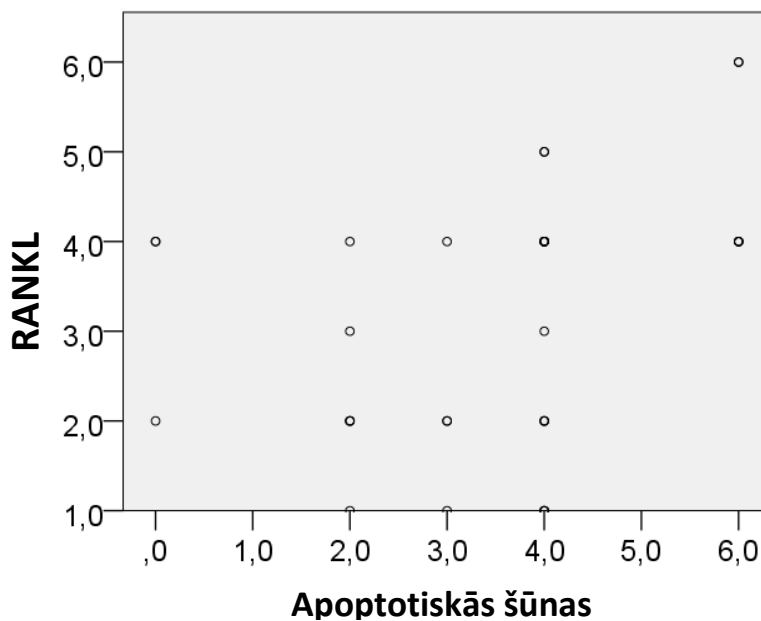
5.5.1.27. attēls. **Korelācija starp RANKL un bFGF relatīvo struktūru daudzumu**

Balstoties uz Spīrmena korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka starp RANKL un IL6 relatīvo daudzumu pastāv **vidēja un statistiski ticama korelācija** ($r_s = 0,36$; $p = 0,01$) (5.5.1.28. attēls).



5.5.1.28. attēls. **Korelācija starp RANKL un IL6 relatīvo struktūru daudzumu**

Balstoties uz Spīrmena korelāciju koeficienta analīzi, atradām, ka starp RANKL un apoptotisko šūnu relatīvo daudzumu pastāv **vidēja un statistiski ticama korelācija** ($r_s = 0,42$; $p < 0,001$) (5.5.1.29. attēls).



5.5.1.29. attēls. **Korelācija starp RANKL un apoptotisko šūnu relatīvo daudzumu**

6. 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 rezultātos var ieviest korekcijas. 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 saspiestību 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 noris 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 ontoģenētisko 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.

6.1. Morfoloģiskās pārmaiņas audos

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

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

6.2. 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 pacientiem, vidēja ekspresija – 2. grupas pacientiem, bet 3. grupas pacientiem tā jau bija samazināta. Tas norāda uz to, ka TGFβ ekspresija samazinās līdz ar vecumu. Šos rezultātus apstiprina arī *Sanchez-Capelo* (2005) pētījums, kurā viņa secina, 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 TGFβ izdale ir saistīta ar periostālo audu proliferāciju. Turklāt visizteiktākais krāsojums tika novērots skrimšļa šūnu augšanas un endohondrālās pārkaulošanās zonās, jo TGFβ izdalās vietās, kur notiek aktīva kaulaudu reģenerācija.

Verrecchia un *Mauviel* (2002) secina, ka ekstracelulārās matricēs veidošanā TGFβ darbojas kā hemotaksisks peptīds, kas tieši ietekmē fibroblastus. TGFβ darbojas kā starpnieks ECM noārdošām proteāzēm un to inhibitoriem, kā rezultātā rodas ECM veidojošie proteīni. Tātad, notiekot aktīvai kaula remodelācijai, TGFβ 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 TGFβ ekspresija samazinās.

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

Tocharus (2004) pētījumā ar pelēm nonāca pie līdzīga rezultāta, parādot, ka TGFβ 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 ar vecumu samazinās. 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 pietiekams reģenerācijas potenciāls, un tas vairāk ir izteikts 1. un 2. grupas pacientiem.

Mūsu pētījumā FGFR1 ekspresija interrādikulārās septas kaulaudos visās grupās bija vidēji līdz ļoti daudz struktūrās redzes laukā, savukārt 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 nobriedušiem dzīvniekiem. 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, ka labāka adaptācija remodelācijas procesiem ir iespējama tieši jaunākiem indivīdiem.

6.3. 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 vienlīdz aktīvi noris 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 līdz 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 smaganu recesijas risks, kas reti novērojams jaunākiem pacientiem.

6.4. Matricē metālproteīnāzes

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 paraugos no 3. grupas, ko varētu skaidrot ar ECM degradējošiem procesiem, kas vairāk ir novērojami pieaugušiem pacientiem. Tas saskan arī ar *Lemaitre* 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, kā, piemēram, angioģenēzē, 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 osteoģenēzei, 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 redzama kā savstarpēji atkarīga.

6.5. 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 NkPb105, kas liecina par IL6 nozīmi gan fizioloģiskās norisēs remodelācijas procesa, gan arī ortodontiskās ārstēšanas laikā.

Pie līdzīgiem secinājumiem nonāca arī *Alfons* ar līdzautoriem (2004); viņš 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 būtisku IL6 nozīmi osteoģenēzē, osteoklastoģenēzē un kaula remodelācijas procesos. Autors secina, ka IL6 ekspresijas un aktivācijas izmaiņas ir smagu patoloģiju, piemēram, periodontīta, artrīta un osteoporozes, cēlonis.

Benatti ar līdzautoriem (2006) savā pētījumā secināja, ka IL6 un 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 iepriekš minēto 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 daudz citu pētījumu par interleikīniem, par interleikīnu ietekmi ne tikai uz sejas un žokļa rajonu, bet arī uz citām cilvēka ķermeņa daļām. Tādējādi IL6, iespējams, ir multifunkcionāla ietekme uz visiem audiem.

6.6. Kaula starpšūnu telpas funkcionālie proteīni

Mūsu pētījuma ietvaros pacientiem interrādikulārās septas paraugos tika noteikts arī NkPb105 proteīns, kas literatūras avotos vairāk ir zināms kā RANKL (*receptor activator nuclear kappa ligand*) jeb nukleārā kappa 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. Atšķirās 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 pētījumā 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, no tā, vai tas ir fizioloģisks vai arī patoloģisks.

Tādējādi iepriekš minēto autoru dati apstiprina arī 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. Tā 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.

6.7. 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 interradikulārajā septā samazinājās līdz ar pacientu vecumu (konstatējām, ka apoptotisko šūnu daudzums interradikulārajā 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 osteoblasti, bet tādā pašā biopsijas materiālā graužēja kaulā ir 800–1200 osteoblastu.

Analizējot mūsu iegūto rezultātu korelācijas, konstatējām, ka pastāv statistiski ticama cieša korelācija starp OPG, RANKL un FGFR1 un apoptotisko šūnu skaitu – interradikuleārās septas audos, palielinoties OPG, RANKL un FGFR1 ekspresijai, pieaug arī apoptotisko šūnu skaits. 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, kuri norāda uz RANKL un apoptozes korelāciju.

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

7. 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 darbā 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 atrasti 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 ļautu ortodontiem prognozēt pacientu ārstēšanas ilgumu.

8. SECINĀJUMI

1. Interradikulārās septas kaulaudu novecošanas process nekorelē ar dzimumu, bet korelē ar pašu novecošanos. Kopējā morfoloģiskā aina novecojošos intaktos interradikulārās septas 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.

9. LITERATŪRAS SARAĶSTS

Žurnālu raksti

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., Bakhiet M. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines // *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 2001; 119: 307–312.
4. Anderson H. C., Hsu H. H., Morris D. C. Matrix vesicles in osteomalacic hypophosphatasia bone contain apatite-like mineral crystals // *Am J Pathol*, 2003; 151(6): 1555–1561.
5. Bartold P. M. The effect of chronic inflammation on gingival connective tissue proteoglycans and hyaluronic acid // *J Oral Pathol*, 1986; 15(7): 367–374.
6. Benatti B. B. Periodontal healing may be affected by aging: a histologic study in rats // *J Periodontal Res*, 2006; 41(4): 329–333.
7. 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.
8. Bertolini D. R., Nedwin G. E., Bringman T. S. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors // *Nature*, 1986; 319: 516–518.
9. 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.
10. Bodine P. Wnt signaling control of bone cell apoptosis // *Cell Res.*, 2008; 18: 248–253.
11. Bonewald L. Mechanosensation and transduction in osteocytes // *BoneKEY Osteovision*, 1999; 10: 7–15.
12. 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.
13. Boyle W. J., Simonet W. S., Lacey D. L. Osteoclast differentiation and activation // *Nature*, 2003; 423(6937): 337–342.
14. Browner W. S. Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women // *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86(2): 631–637.

15. Böttcher R., Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development // *Endocrine Review*, 2005; 26: 63–77.
16. 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.
17. Caton M. P. Comparative action of carbocyclic thromboxane A(2) stereoisomers on platelets // *Eur J Med Chem*, 2000; 35(12): 1099–1107.
18. Cattaneo P. M., Dalstra M. and Melsen B. The Finite Element Method: A Tool to Study Orthodontic Tooth Movement // *Journal of Dental Research*, 2005; 84(5): 428–433.
19. Chan G. K. Age-related bone loss: old bone, new facts // *Gerontology*, 2002; 48(2): 62–71.
20. Clowes J. A. Octreotide Abolishes the Acute Decrease in Bone Turnover in Response to Oral Glucose // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003; 88: 4867–4873.
21. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology // *Clinical J of the Am Soc of Nephrology*, 2008; 3: 131–139.
22. Cohen M. M., Jr. The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates // *Am J Med Genet Part A*, 2006; 140A: 2646–2706.
23. Davidovitch Z. Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics // *Dent Clin North Am.*, 1988; 32(3): 411–435.
24. Desbois C., Karsenty G. Osteocalcin cluster: implications for functional studies // *J Cell Biochem.*, 1995; 57: 379–383.
25. Doherty M., et al. Identification of genes expressed during the osteogenic differentiation of vascular pericytes in vitro // *Biochem Soc Trans.*, 1998; 26(1): S4.
26. Ducy P., Desboise C., Boyce B., et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice // *Nature*, 1996; 382: 448–452.
27. Dumas M., Chaudagne C. In vitro biosynthesis of type I and III collagens by human dermal fibroblasts from donors of increasing age // *Mech Ageing Dev*, 1994; 73: 179–187.
28. Earnshaw B. Apoptosis. A cellular poison cupboard // *Nature*, 1999; 397(6718): 387–389.
29. Ellen R. P. Periodontal disease among older adults: what is the issue? // *Periodontol.*, 1998; 16: 7–8.
30. Ellen R. P. Effects of human aging on periodontal tissues // *Periodontol.*, 2000; Volume 29, Issue 4.
31. Eswarakumar V., Lax I., Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors // *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2005; 16: 139–149.

32. Fazzalari N. L. The ratio of messenger RNA levels of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand to osteoprotegerin correlates with bone remodeling indices in normal human cancellous bone but not in osteoarthritis // *J Bone Miner Res.*, 2001; 16(6): 1015–1027.
33. 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.
34. Goldfarb M. Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development // *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 1996; 7: 311–325.
35. Gowen A. An interleukin 1 like factor stimulates bone resorption *in vitro* // *Nature*, 1983; 306 (5941): 378–380.
36. Graves D. T. Growth factors in periodontal regeneration // *Compend Suppl.*, 1994; 18: S672–677.
37. Grieve A. Prostaglandin E (PGE) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) levels in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement // *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*, 1994; 105(4): 369–374.
38. Groessner-Schreiber B. Osteoclast recruitment in response to human bone matrix is age related // *Mech Ageing Dev.*, 1992; 62: 143–154.
39. Gundberg C. Matrix proteins // *Osteoporos Int.*, 2003; 14(5): 37–42.
40. Haeusler G. Localization of matrix metalloproteinases, (MMPs) their tissue inhibitors, and vascular endothelial growth factor (VEGF) in growth plates of children and adolescents indicates a role for MMPs in human postnatal growth and skeletal maturation // *Calcif Tissue Int.*, 2005; 76(5): 326–335.
41. Hanemaaijer H. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor-alpha and doxycycline // *J Biol Chem.*, 1997; 272(50): 31504–31509.
42. Hasty L. Effects of fibronectin and other salivary macromolecules on the adherence of *Escherichia coli* to buccal epithelial cells // *Infect Immun.*, 1987; 55(9): 2103–2109.
43. Hayama H. Cell kinetic study of the endometrium by nonisotopic *in situ* hybridization for histone H3 messenger RNA and immunohistochemistry for Ki-67 and for estrogen and progesterone receptors // *Anat Rec.*, 2002; 266(4): 234–240.
44. He G. Compression and tension: differential effects on matrix accumulation by periodontal ligament fibroblasts *in vitro* // *Connective Tissue Research*, 2004; 45: 28–39.
45. Heath M. Pig interleukin 1 (catabolin) is a potent stimulator of bone resorption *in vitro* // *Calcified Tissue International*, 1985; 37: 95–97.
46. Hengartner M. O. The biochemistry of apoptosis // *Nature*, 2000; 407(6805): 770–776.

47. Hofbauer L. C., Hofbauer S., Khosla S., et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption // *J Bone Miner. Res.*, 2000; 15: 2–12.
48. Holliday L. S., Vakani A., Archer L. Effects of Matrix Metalloproteinase Inhibitors on bone resorption and orthodontic tooth movement // *Journal of Dental Research*, 2003; 82 (9): 687–691.
49. Hou L. T., Yaeger J. A. Cloning and characterization of human gingival and periodontal ligament fibroblasts // *J Periodontol*, 1993; 64: 1209–1218.
50. 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.
51. Ikeda T., Yamaguchi A., Yokose S., et al. Changes in biological activity of bone cells in ovariectomized rats revealed by *in situ* hybridization // *J Bone Miner. Res.*, 1996; 11: 780–788.
52. 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.
53. Ingmann T. Matrix metalloproteinase-1 and -8 in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: a pilot study during 1 month of follow-up after fixed appliance activation // *Eur J Orthod.*, 2005; 27(2): 202–207.
54. 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.
55. 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.
56. Jager A., Zhang D., Kawarizadeh A., Tolba R., Braumann B., Lossdorfer S., Gotz W. Soluble cytokine receptor treatment in experimental orthodontic tooth movement in the rat // *European Journal of Orthodontics*, 2005; 27: 1–11.
57. Jilka R., Weinstein R., Bellido T., Parfitt M., Manolagas S. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines // *J Bone & Mineral Res.*, 1998; 13(5): 793–802.
58. Johnson B. D. Effects of donor age on protein and collagen synthesis *in vitro* by human diploid fibroblasts // *Lab Invest.*, 1986; 55: 490–496.
59. Jorgensen N. R. Activation of L-type calcium channels is required for gap junction-mediated intercellular calcium signaling in osteoblastic cells // *J Biol Chem.*, 2003; 278(6): 4082–4086.
60. Källicke T., Köller M., Frangen T., et al. Local application of basic fibroblast growth factor increases the risk of local infection after trauma: an in-vitro and in-vivo study in rats // *Acta Orthop.*, 2007; 78(1): 63–73.

61. Kanasaki M. Differential regulation of pituitary hormone secretion and gene expression by thyrotropin-releasing hormone. A role for mitogen-activated protein kinase signaling cascade in rat pituitary GH3 cells // *Biol Reprod.*, 2002; 67(1): 107–113.
62. 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.
63. Kato T., Kawaguchi H., Hanada K., et al. Single local injection of recombinant fibroblast growth factor-2 stimulates healing of segmental bone defects in rabbits // *J Orthop Res.*, 1998; 16(6): 654–659.
64. Khosla S., Arrighi H., Melton L. J., et al. Correlates of osteoprotegerin levels in women and men // *Osteoporos Int.*, 2002; 13: 394–399.
65. Kiechle F., Zhang X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implication // *Clinica Chimica Acta*, 2002; 326: 27–45.
66. Kiili M. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue// *J Clin Periodontol.*, 2002; 29(3): 224–232.
67. Kloss F. R., Gassner R. Bone and aging: effects on the maxillofacial skeleton // *Exp Gerontol.*, 2006; 41(2): 123–129.
68. 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.
69. Knabe C., Nicklin S., Yu Y., et al. Growth factor expression following clinical mandibular distraction osteogenesis in humans and its comparison with existing animal studies // *J of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 2005; 33: 361–369.
70. Kosteniuk P. J. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength // *Curr Opin Pharmacol.*, 2005; 5(6): 618–625.
71. Kulkarni S. Effect of proinflammatory cytokines on PIGA-hematopoiesis // *Exp Hematol.*, 2003; 31(9): 770–778.
72. Kwabbi-Addo B., Ropiquet F., Giri D., et al. Alternative splicing of fibroblast growth factor receptors in humane prostate cancer // *Prostate*, 2001; 46: 163–172.
73. Kyrkanides S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in orthodontic tooth movement: metalloproteinase activity and collagen synthesis by endothelial cells // *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*, 2000; 118(2): 203–209.
74. Labat-Moleur F., Guillermat C., Lorimier P., et al. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement // *J Histochemistry & Cytochemistry*, 1998; 46(3): 327–334.

75. Lacey D. L., Timms E., Tan H. L., et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation // *Cell*, 1998; 93: 165–176.
76. Lamaitre V., D'Armiento J. Matrix metalloproteinases in development and disease // *Birth Defects Research*, 2006; 78: 1–10.
77. Landis W. J. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix // *Bone*, 1995; 16(5): 533–544.
78. Lee L. E., Aspnes S. S., Chung R., et al. Influences of caloric restriction on age-associated skeletal muscle fiber characteristics and mitochondrial changes in rats and mice // *Ann. N Y Acad. Sci.*, 1997; 854: 182–191.
79. Lee S. F. Coupling of osteopontin and its cell surface receptor CD44 to the cell survival response elicited by interleukin-3 or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor // *Mol. Cell. Biol.*, 2000; 20: 2734–2742.
80. Little R. D., Carulli J. P., Del Mastro R. G., et al. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant highbone-mass trait // *Am. J. Hum. Genet.*, 2002; 70: 11–19.
81. Liu Z. J., Anderson M. W., Gu G. M., King G. J. Apoptosis in the regenerate produced by mandibular osteodistracton in the mature rat // *Orthod Craniofac Res.*, 2005; 8: 41–51.
82. Logan C. Y. The Wnt signaling pathway in development and disease // *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 2004; 20: 781–810.
83. 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.
84. Lowney A. Orthodontic forces increase tumor necrosis factor alpha in the human gingival sulcus // *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 1995; 108: 519–524
85. Majno G., Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis // *Am J Pathol.*, 1995; 146(1): 3–15.
86. Makhluf H. A. Age-related decline in osteoprotegerin expression by human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges // *Biochem Biophys Res Commun.*, 2000; 24:268(3): 669–672.
87. Malcolm R. Calcium waves in fluid flow stimulated osteoblasts are G protein mediated // *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2006; 326: 31–38.
88. Manello F. Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells // *Stem Cells*, 2006; 24(3): 475–481.
89. Manolagas S. C., Kousteni S., Jilka R. L. Sex steroids and bone // *Recent Prog. Horm. Res.*, 2002; 57: 385–409.

90. Masella R. S. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement // *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 2006; 129: 458–468.
91. Maslinska D. Apoptosis: physiological cell death and its role in pathogenesis of diseases // *Neurol Neurochir Pol.*, 2003; 37(2): 315–326.
92. Massague J. Integration of Smad and MAPK pathways: a link and a linker revisited // *Genes Dev.*, 2003; 15(24): 2993–2997.
93. Maugeri D. Interleukin-18 (IL-18) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in post-menopausal osteoporosis // *Arch Gerontol Geriatr.*, 2005; 40(3): 299–305.
94. Meikle M. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt // *Eur J Ortho*, 2006; 28: 221–240.
95. 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.
96. Mina M., Havens B. FGF signaling in mandibular skeletogenesis // *Orthod Craniofacial Res.*, 2007; 10: 59–66.
97. Miyazono K., Ten Dijke P., Ichijo H. Receptors for transforming growth factor-beta // *Adv Immunol.*, 1994; 55: 181–220.
98. Mohammadi M., Olsen S. H., Ibrahimi OA. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation // *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2005; 16: 107–137.
99. Mumm S. Heritable disorders of the RANKL/OPG/RANK signaling pathway // *J Musculoskelet Neuronal Interact.*, 2004; 4: 254–267.
100. 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.
101. Naski M. C. FGF signaling in skeletal development // *Front Biosci.*, 1998; 3: 781–794.
102. Negoescu A., Guillermet C., Lorimer P. TUNEL apoptotic cell detection in archived paraffin-embedded tissues // *Biochemica*. 1998; 3: 36–41.
103. Ogasawara M. Osteoclast differentiation by RANKL requires NF-kappaB-mediated downregulation of cyclin-dependent kinase 6 // *J Bone Miner Res.*, 2004; 19(7): 1128–1136.
104. Ohta T., Mori M., Ogawa K., et al. Immunocytochemical localization of BGP in human bones in various developmental stages and pathological conditions // *Virchows Arch Pathol Anat Histochem.*, 1989; 415(5): 459–466.
105. 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.

106. Ornitz D., Itoh N. Fibroblast growth factors // *Genome Biology*, 2001; 2(3): 3005.1–3005.12.
107. Ornitz D. FGF signaling in the developing endochondral skeleton // *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2005; 16: 205–213.
108. Parffit A. M. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone // *J Cell Biochem.*, 1994; 55: 273–286.
109. 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.
110. Pittenger M. F. Multilineage potential of adult human 1. mesenchymal stem cells // *Science*, 1999; 284: 143–147.
111. Plotkin J. B. The different effects of apoptosis and DNA repair on tumorigenesis // *J Theor Biol.*, 2002; 7(214): 453–467.
112. Plotkin L. I. Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation // *J Biol Chem.*, 2005; 25:280(8): 7317–7325.
113. Powers C. J. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling // *Endocr Relat Cancer*, 2000; 7(3): 165–197.
114. 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.
115. Roholl P. J. M., Blauw E., Zurcher C., et al. Evidence for a diminished maturation of preosteoblasts into osteoblasts during aging in rats: an ultrastructural analysis // *J. Bone. Miner. Res.*, 1994; 9: 355–366.
116. Rosier R. N. The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing // *Clin Orthop Relat Res.*, 1998; 355: 294–300.
117. Ross F. P. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin α v β 3 potentiate bone resorption // *The Journal of Biological Chemistry*, 2003; 268: 9901–9907.
118. Rouster-Stevens K. A. RANKL:osteoprotegerin ratio and bone mineral density in children with untreated juvenile dermatomyositis // *Arthritis Rheum.*, 2007; 56(3): 977–983.
119. Rubin J., Ackert-Bicknell C. L., Zhu L., et al. IGF-I regulates osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand *in vitro* and OPG *in vivo* // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002; 87: 4273–4279.
120. Rubin J. Activation of extracellular signal-regulated kinase is involved in mechanical strain inhibition of RANKL expression in bone stromal cells // *Journal of Bone and Mineral Research*, 2002; 17: 1452–1460.

121. Saikumar P., Dong Z., Mikhailov V., et al. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease // *Am J Med.*, 1999; 107: 489–506.
122. 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.
123. Sanchez-Capelo A. Dual role for TFG- β 1 in apoptosis // *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2005; 16: 15–34.
124. Sasano M. Gene expression of MMP8 and MMP13 during embryonic development of bone and cartilage in the rat mandible and hind limb // *J Histochem Cytochem.*, 2002; 50(3): 325–332.
125. Sasano Y. Expression of major bone extracellular matrix proteins during embryonic osteogenesis in rat mandibles // *Anat Embryol.*, 2000; 202: 31–37.
126. Schmid G. J., Kobayashi C., Ornitz D. M. Fibroblast growth factor expression during skeletal fracture healing in mice // *Dev Dyn.*, 2009; 238(3): 766–774.
127. 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.
128. Shin C. S. Relative abundance of different cadherins defines differentiation of mesenchymal precursors into osteogenic, myogenic, or adipogenic pathways // *J Cell Biochem.*, 2000; 78: 566–577.
129. Simonet W. S. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density // *Cell*. 1997; 89: 309–319.
130. Sodek J. A comparison of the rates of synthesis and turnover of collagen and non-collagen proteins in adult rat periodontal tissues and skin using a microassay // *Arch Oral Biol.*, 1977; 22: 655–665.
131. Somerman M. J. Characteristics of human periodontal ligament cells *in vitro* // *Arch Oral Biol.*, 1990; 35(3): 241–247.
132. Stefanini M. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy // *Nature*, 1967; 216: 173–174.
133. Steiling H., Werner S. Fibroblast growth factors: key players in epithelial morphogenesis, repair and cytoprotection // *Curr Opin Biotechnol.*, 2003; 14: 533–537.
134. 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.
135. 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.
136. Teitelbaum S. L. Osteoclasts: What do they do and how do they do it? // *The American Journal of Pathology*, 2003; 170(2): 427–435.

137. 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.
138. Uematsu S. Increase of transforming growth factor-beta 1 in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement // *Arch Oral Biol.*, 1996; 41(11): 1091–1095.
139. Uren A., Vaux D. Molecular and clinical aspects of apoptosis // *Pharmacol Ther.*, 1996; 72(1): 37–50.
140. Vaananen H. K. The cell biology of osteoclast function // *J Cell Sci.*, 2000; 113: 377–381.
141. Van Der Velden U. Effect of age on the periodontium // *J Clin Periodontol.*, 1984; 11: 281–294.
142. Velleman S. The role of the extracellular matrix in skeletal development // *Poultry Science*, 2000; 79: 985–989.
143. 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.
144. Verma R., Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMP's): Chemical-biological functions and (Q)SARs // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007; 15: 2223–2268.
145. Verrecchia F., Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation // *J Invest Dermatol.*, 2002; 118(2): 211–215.
146. Visse R., Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases // *Circulation Research*, 2003; 92: 827–839.
147. Wahlgren E. Expression and induction of collagenases (MMP-8 and -13) in plasma cells associated with bone-destructive lesions // *J Pathol.*, 2001; 194(2): 217–224.
148. 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.
149. Weiner R. I. Targeted expression of a dominant-negative fibroblast growth factor (FGF) receptor in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons reduces FGF responsiveness and the size of GnRH neuronal population // *Mol Endocrinol.*, 2005; 19(1): 225–236.
150. 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.
151. Welgus H. G. The collagen substrate specificity of human skin fibroblast collagenase // *J Biol Chem.*, 1981; 256(18): 9511–9515.
152. Whyte M. P. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization // *Endocr Rev.*, 1994; 15(4): 439–461.

153. Xing L. Expression of transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor in molar and placental tissues // Arch Gynecol Obstet., 2002; 269(1): 1–4.
154. Xing L. Osteoclast precursors, RANKL/RANK, and immunology // Immunol Rev., 2005; 208: 19–29.
155. Yoshimura C. The expression and localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF receptor-1 (FGFR-1) in human breast cancer // Clin. Immunol Immunopathol., 1998; 89(1): 28–34.
156. Zannettino A. C. Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor // J Cell Physiol., 2005; 204(2): 714–723.
157. Zhao W. Bone resorption induced by parathyroid hormone is strikingly diminished in collagenase-resistant mutant mice // J Clin Invest., 1999; 103: 517–524.

Grāmatas

1. Aughey E., Frye F. L. Comparative Veterinary. Histology with Clinical Correlates. – 1st ed. / Ed. J. Northcott. – London: Manson Publishing Ltd, 2001; 143–148.
2. Bloom and Fawcett. Textbook of histology. – Mosby, 1998. – Pp. 85–97.
3. Garant P. R. Oral cells and tissues. – Quintessence publishing, 2003. – Pp. 153– 73.
4. Graber T. Orthodontics: Current principles and techniques. – Elsevier Mosby, 2005. – Pp. 221–289.
5. Proffit W. R., Fields H., Jr., Sarver D. Contemporary Orthodontics. – 4th ed. – Elsevier: Mosby, 2007. – Pp. 331–393.
6. Stevens A., Lowe J. Human histology. – 3rd edition. – Elsevier/Mosby, 2005. – Pp. 132–183.

10. AUTORA 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. **Grzibovskis 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.

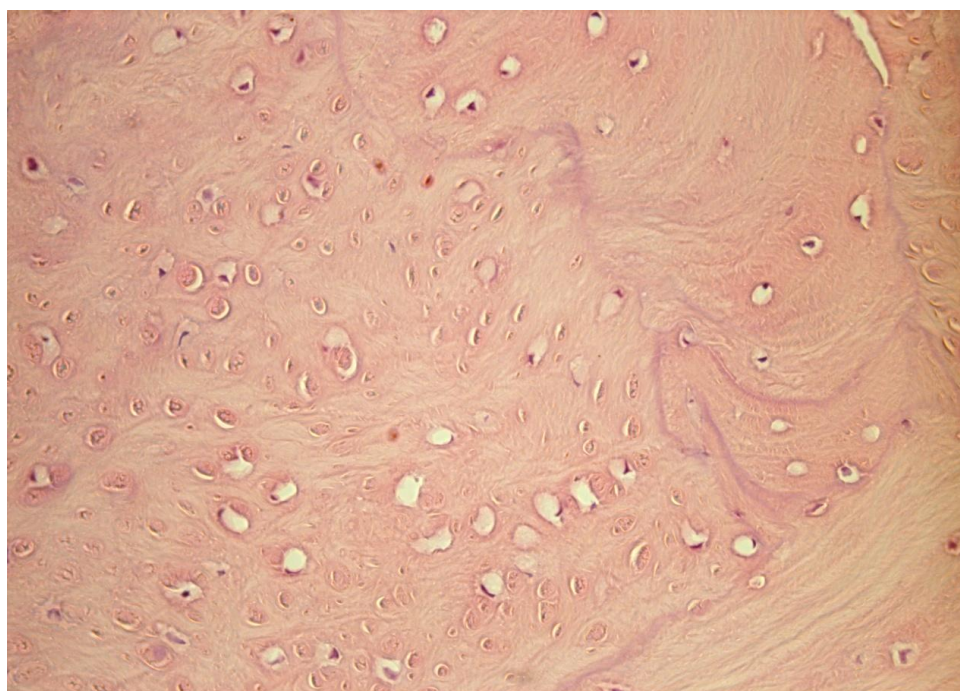
PATEICĪBAS

- 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 tapšanas laikā.
- 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 Morozai, 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 par 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.

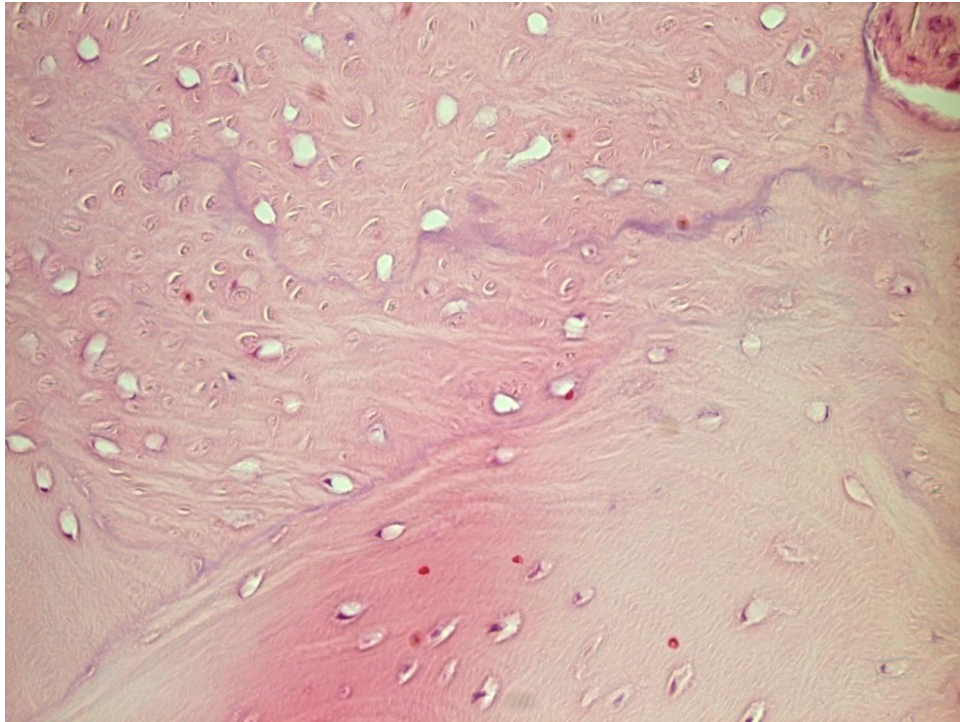
PIELIKUMS – I



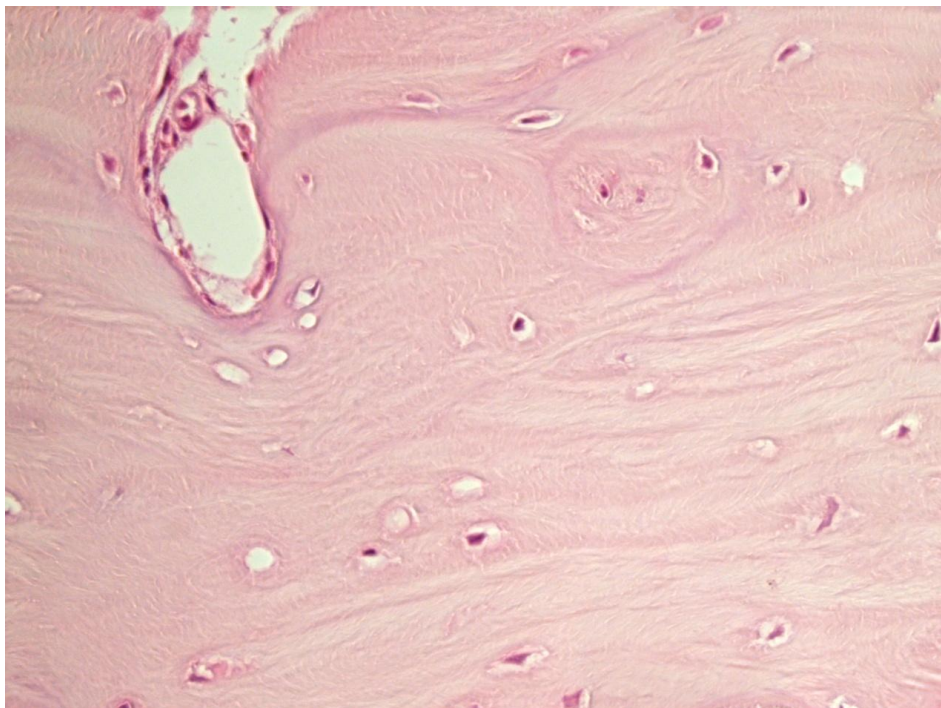
1. mikrofotogrāfija. 1. grupas pacienta kaulaudu mikrofotogrāfija no *septum interradiculare* daļas ar saistaudiem osteonu kanālos (hem/eo., X 400).



2. mikrofotogrāfija. 1. grupas pacienta kaulaudu mikrofotogrāfija no *septum interradiculare* daļas ar atsevišķām izteiktām mineralizācijas līnijām (hem/eo., X 400).



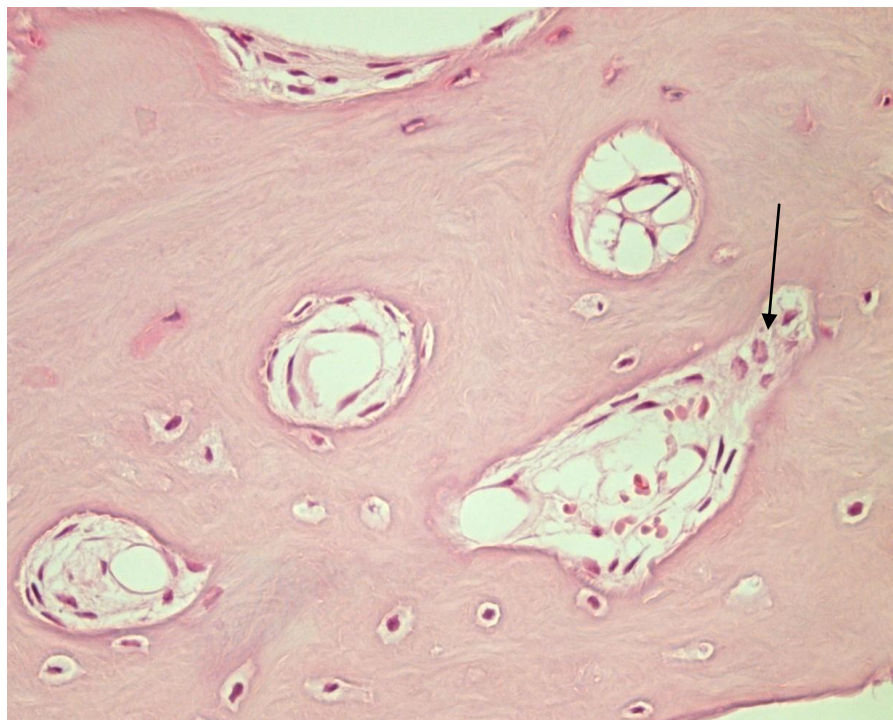
3. mikrofotogrāfija. 2. grupas pacienta kaulaudu mikrofotogrāfija no *septum interradiculare* daļas ar izšķiramām kaulaudu plātnītēm (hem/eo., X 400).



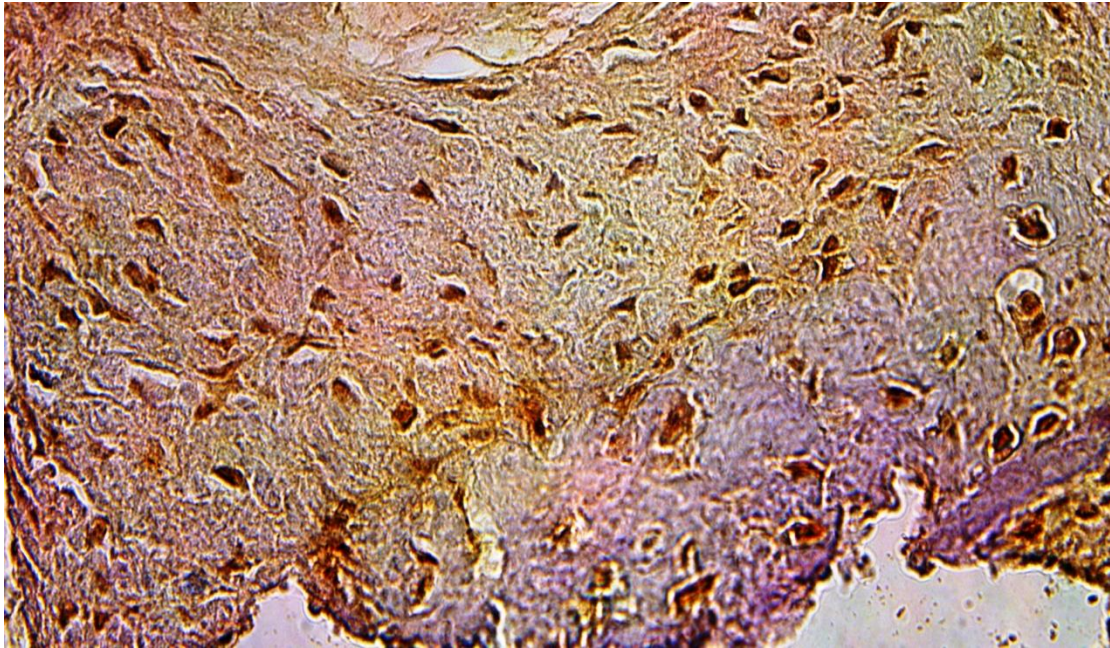
4. mikrofotogrāfija. 2. grupas pacienta kaulaudu mikrofotogrāfija no *septum interradiculare* daļas ar korekti veidotu caururbējkanālu, kas tikai nedaudz ietver saistaudus (hem/eo., X 400).



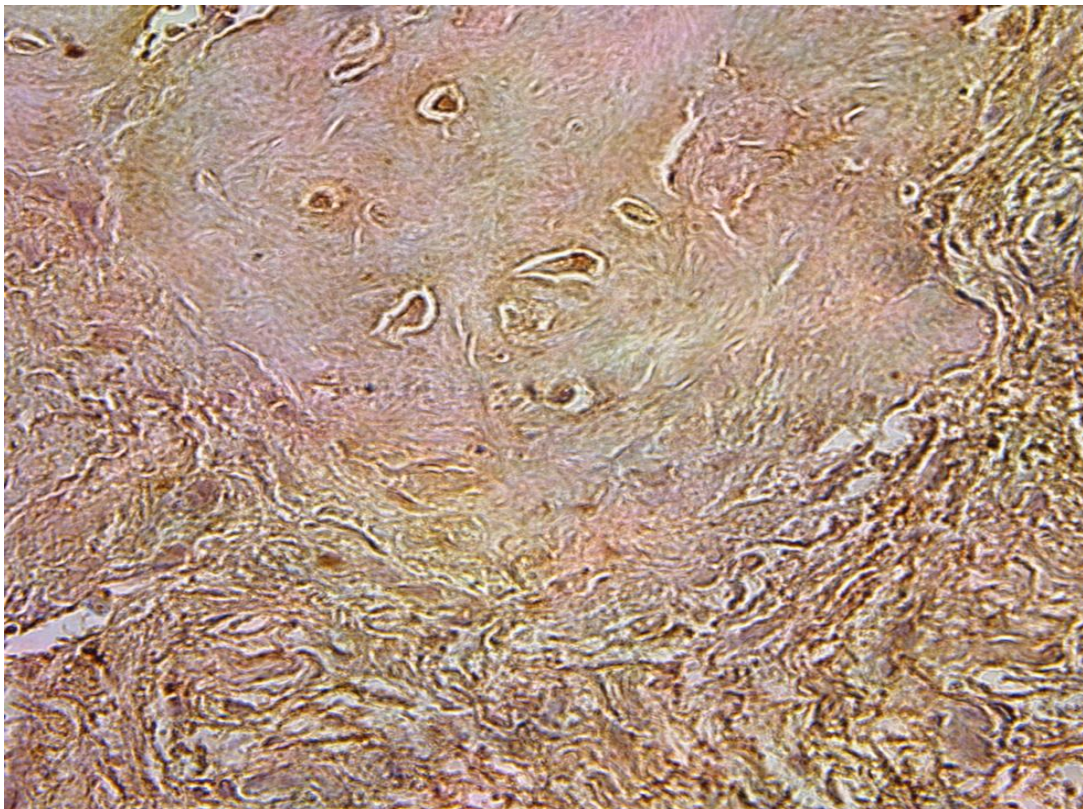
5. mikrofotogrāfija. 3. grupas pacienta kaulaudu mikrofotogrāfija no *septum interradiculare* daļas ar saistaudu proliferāciju (bultiņa) osteonu kanālos (hem/eo., X 400).



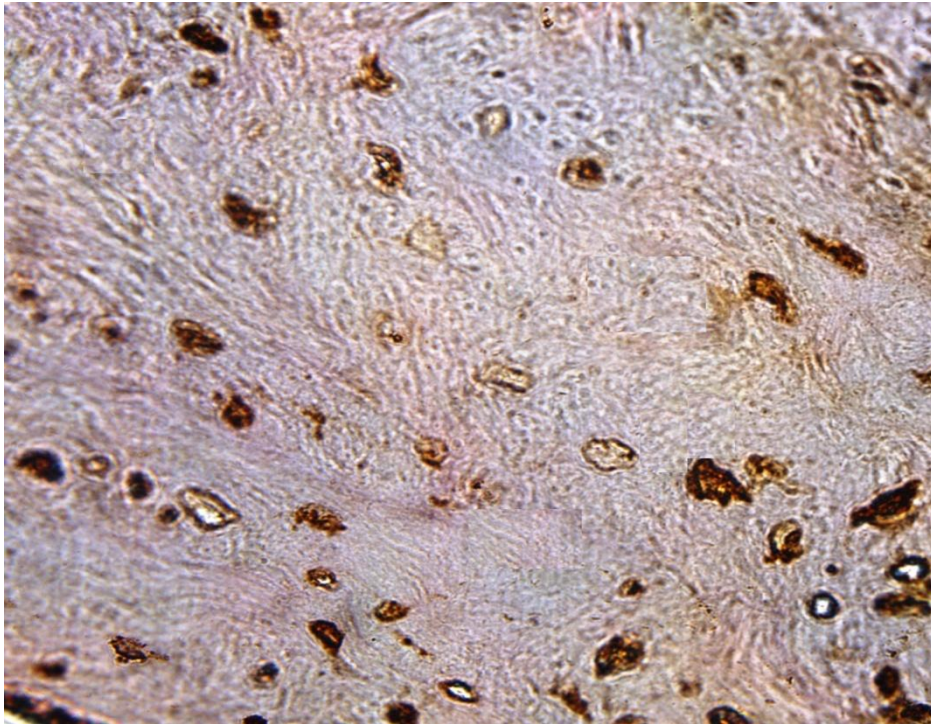
6. mikrofotogrāfija. 3. grupas pacienta kaulaudu mikrofotogrāfija no *septum interradiculare* daļas ar saistaudu proliferāciju (bultiņa) osteonu kanālos un relatīvi maz osteocītiem (hem/eo., X 400).



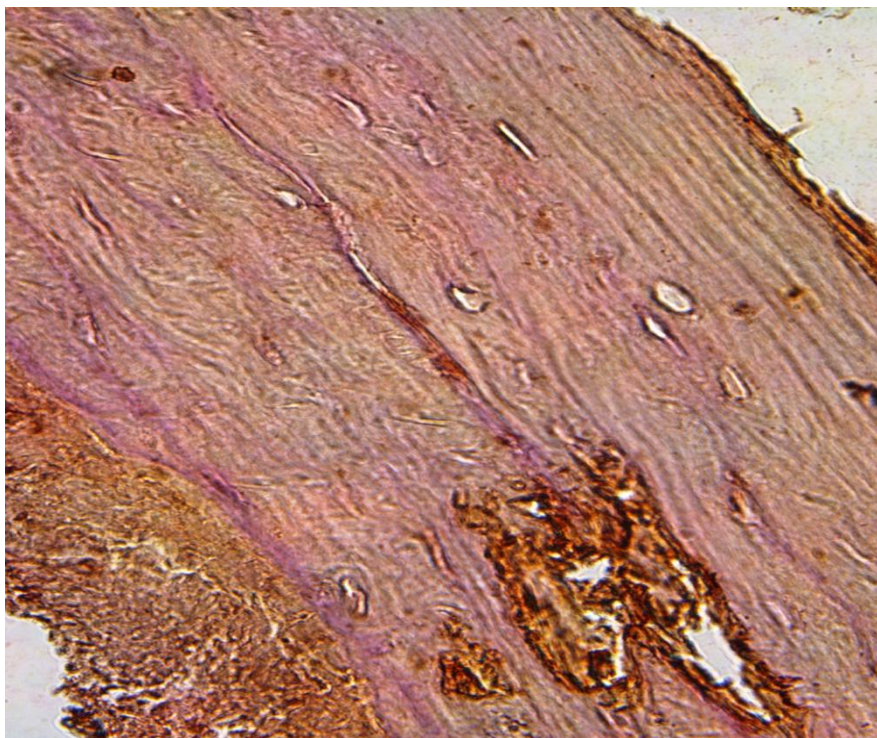
7. mikrofotogrāfija. Daudz OPG pozitīvo *septum interradiculare* kaulaudu un periodonta audu šūnu (1. grupas pacients, OPG, IMH, X400).



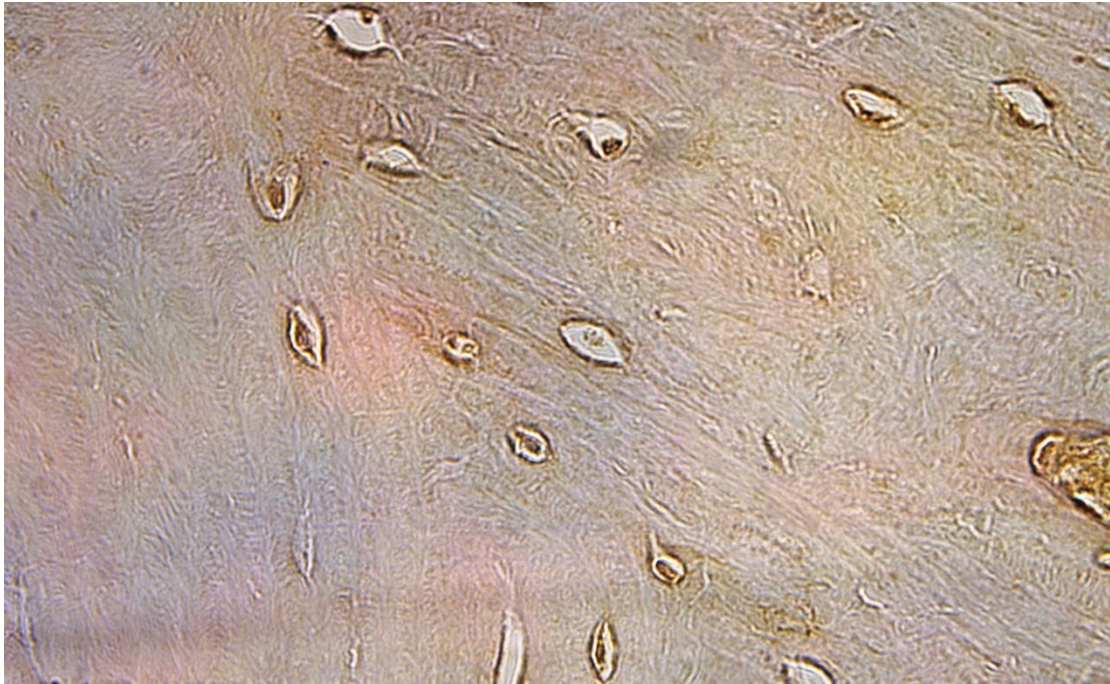
8. mikrofotogrāfija. Maz OPG pozitīvo *septum interradiculare* periodonta audu šūnu (2. grupas pacients, OPG, IMH, X400).



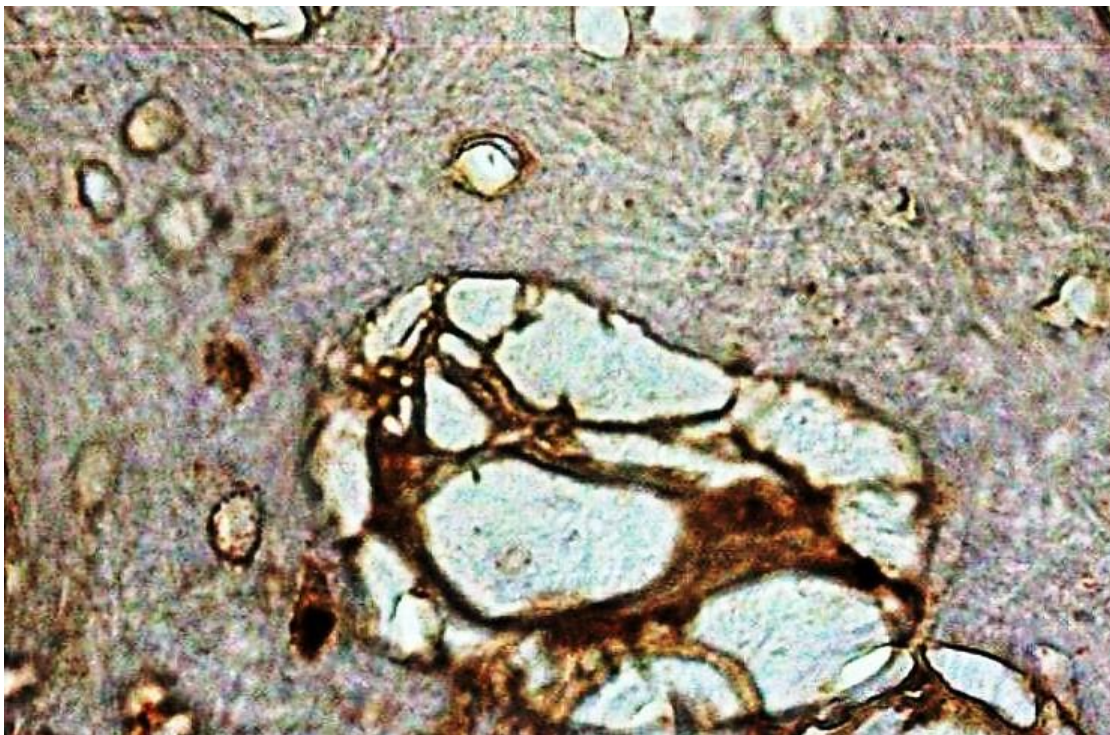
9. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz OPG pozitīvo *septum interradiculare* kaulaudu šūnu (2. grupas pacients, OPG, IMH, X400).



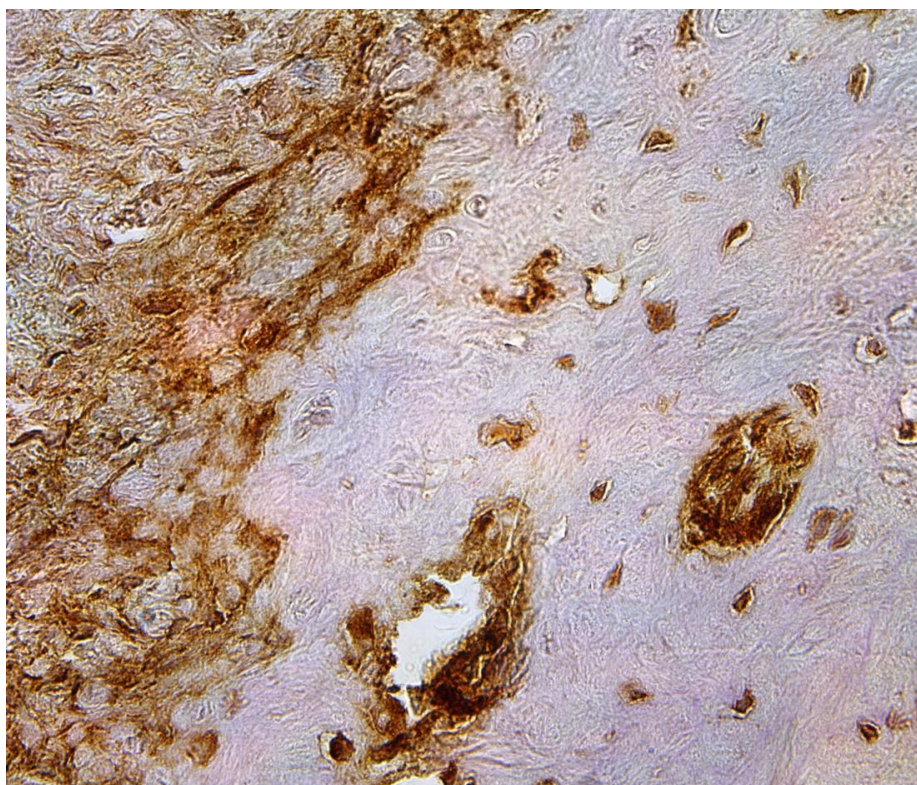
10. mikrofotogrāfija. Maz OPG pozitīvo *septum interradiculare* kaulaudu šūnu (3. grupas pacients, OPG, IMH, X400).



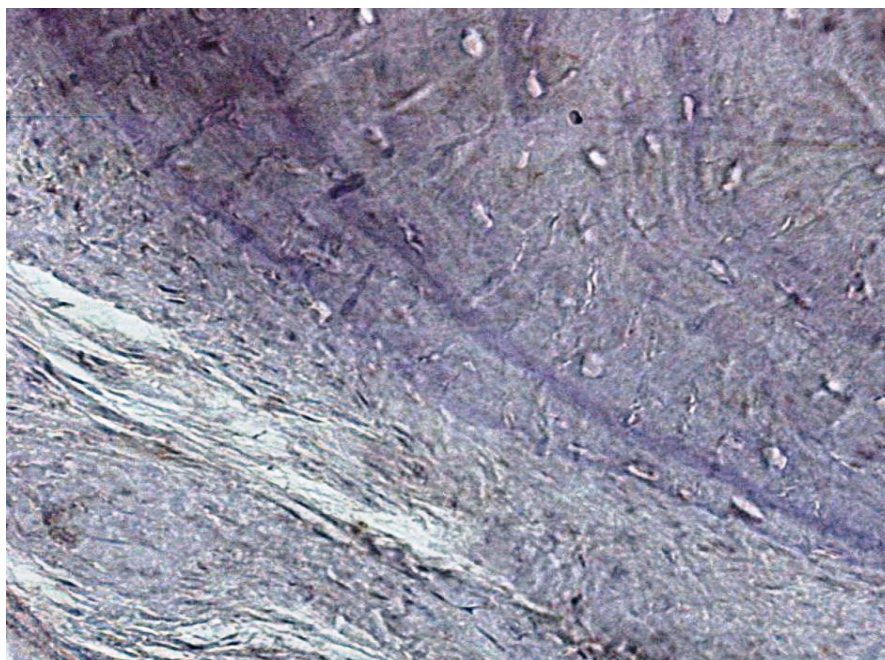
11. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz OPG pozitīvo struktūru *septum interradiculare* kaulaudu šūnu (3. grupas pacients, OPG, IMH, X400).



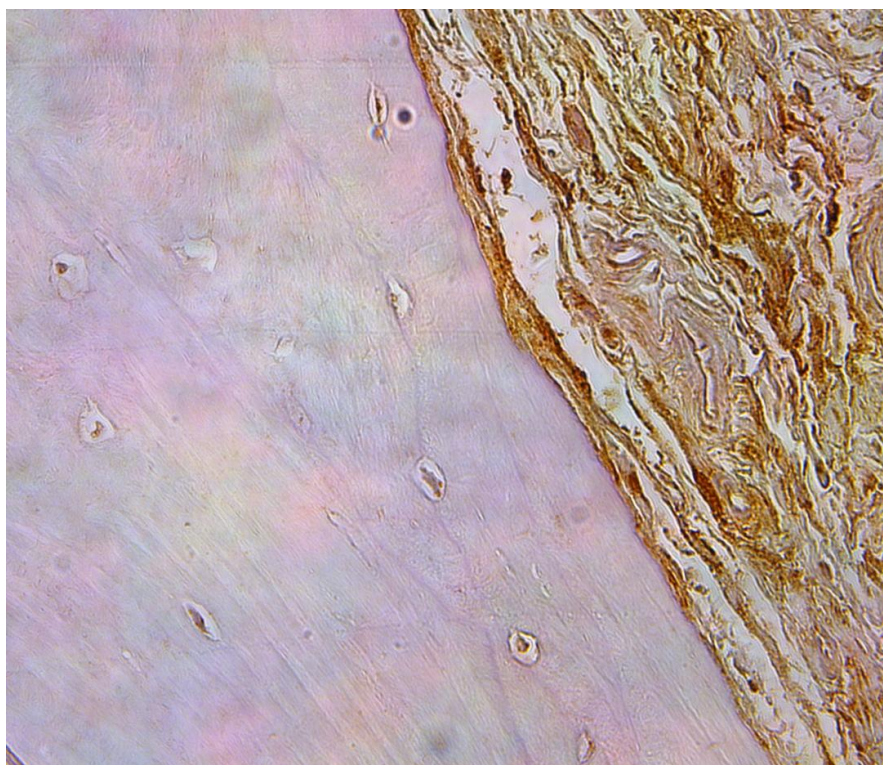
12. mikrofotogrāfija. Maz MMP 8 saturošas šūnas *septum interradiculare* kaulaudos (1. grupas pacients, MMP8, IMH, X400).



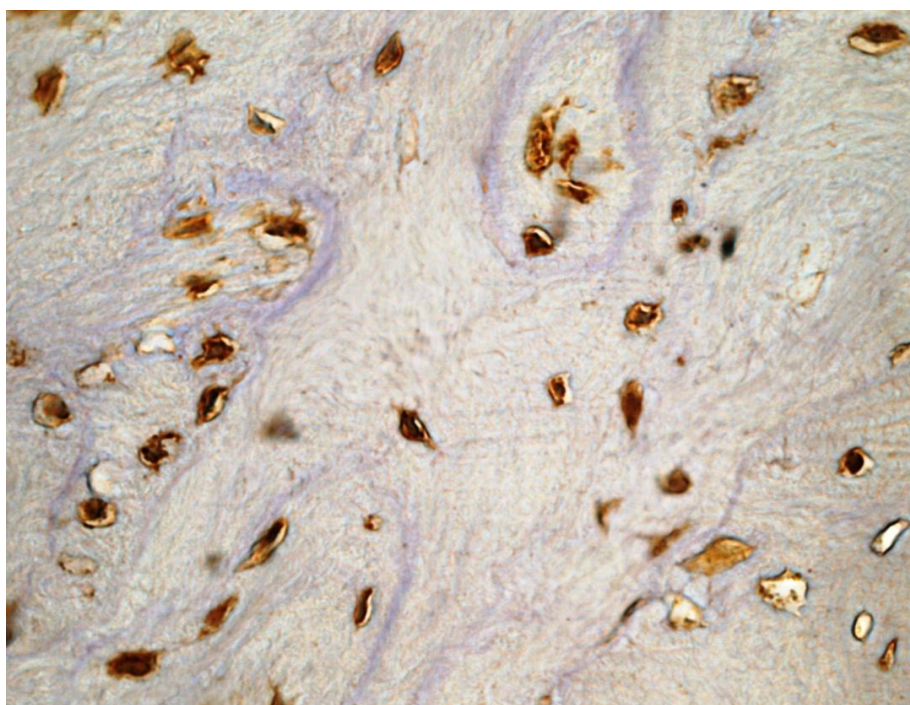
13. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz MMP 8 saturošas šūnas septum *interradiculare* kaulaudos un vidēji daudz MMP 8 saturošas periodonta šūnas (1. grupas pacients, MMP8, IMH, X400).



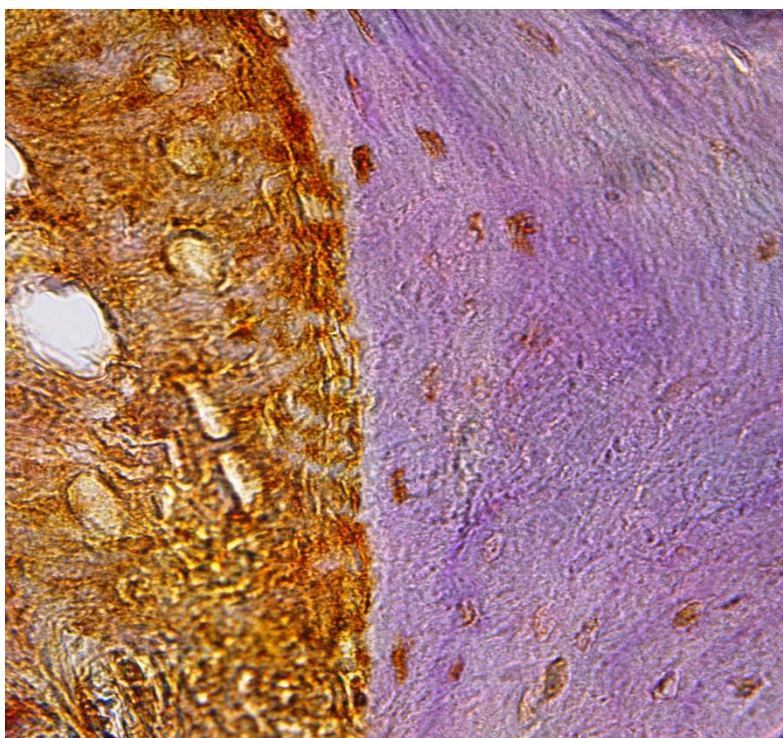
14. mikrofotogrāfija. MMP 8 saturošo šūnu trūkums septum *interradiculare* kaulaudos un periodontā (2. grupas pacients, MMP8, IMH, X400).



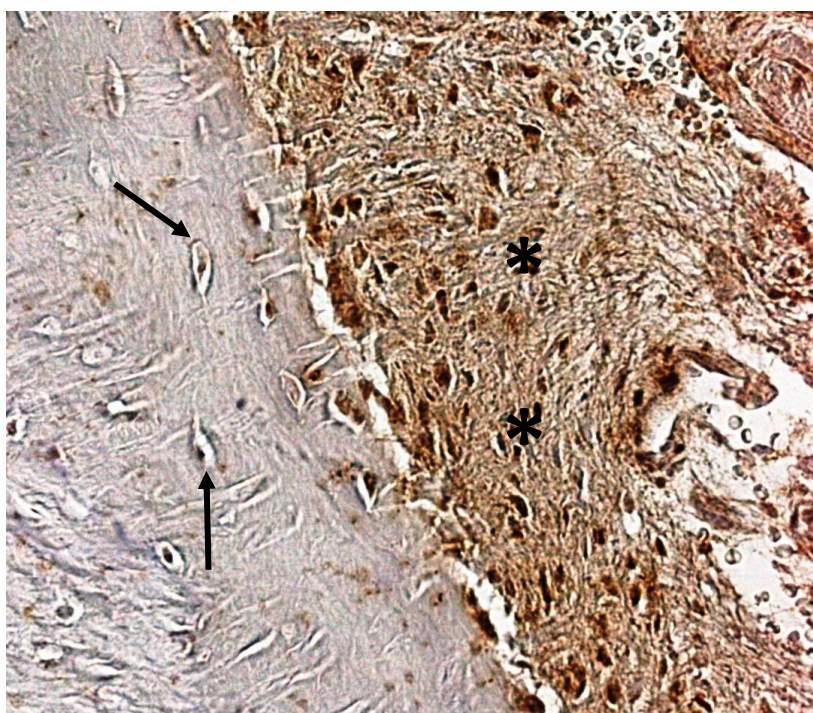
15. mikrofotogrāfija. Maz MMP 8 saturošo šūnu *septum interradiculare* kaulaudos (3. grupas pacients, MMP8, IMH, X400).



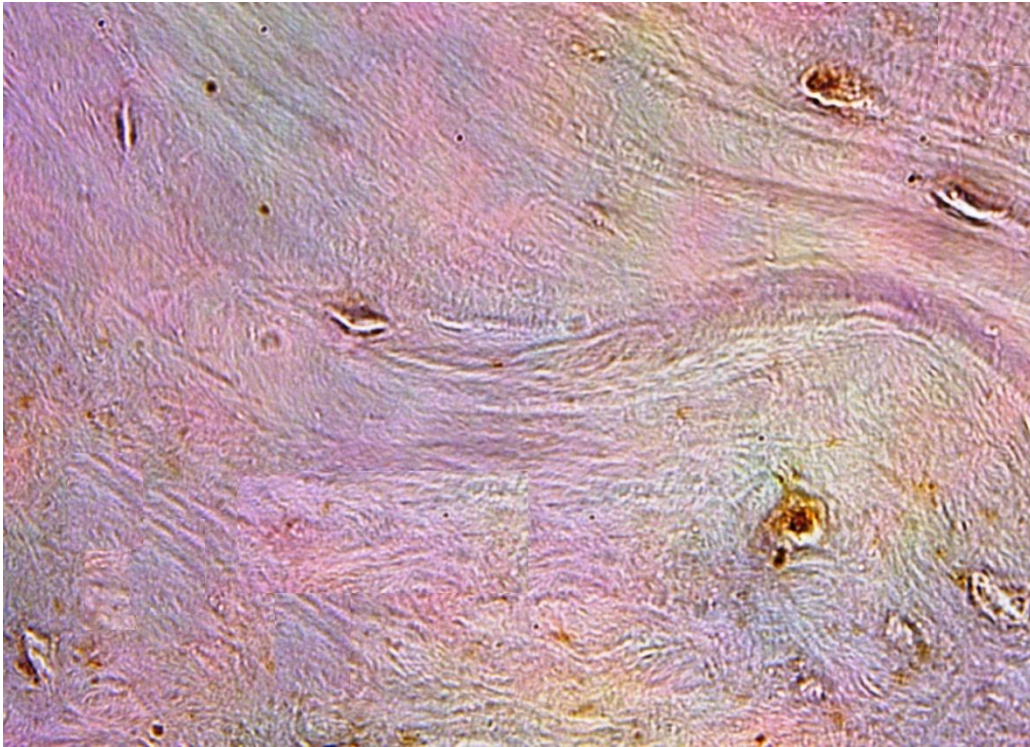
16. mikrofotogrāfija. Daudz MMP 9 saturošas šūnas *septum interradiculare* kaulaudos (1. grupas pacients, MMP9, IMH, X400).



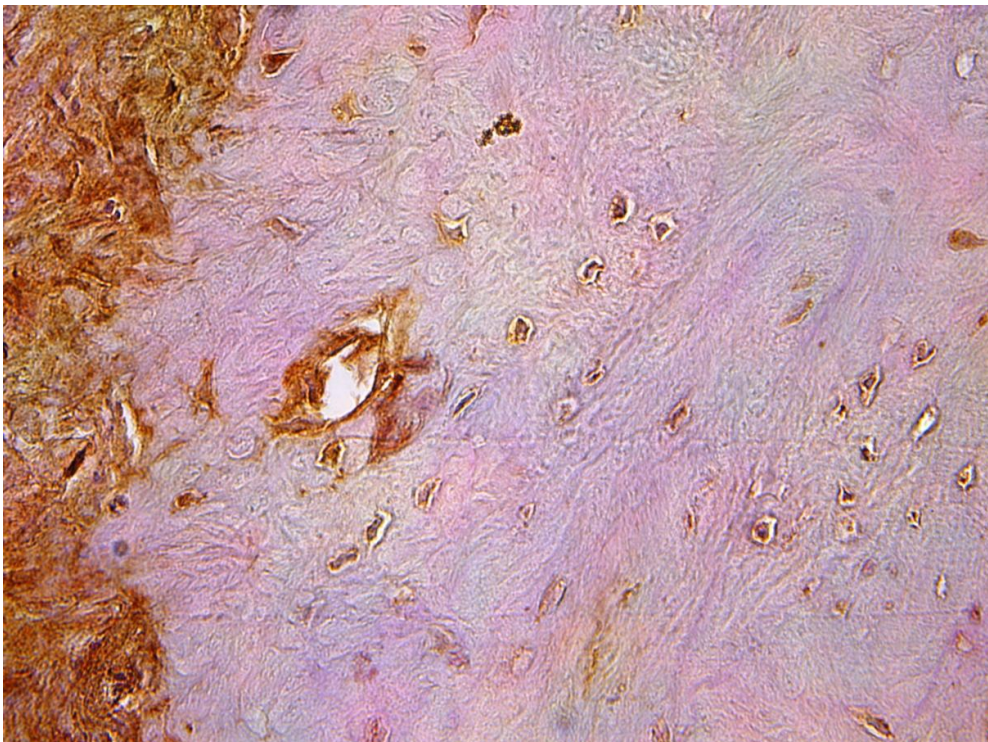
17. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz MMP 9 saturošu šūnu *septum interradiculare* kaulaudos un periodonta saitē (2. grupas pacients, MMP9, IMH, X400).



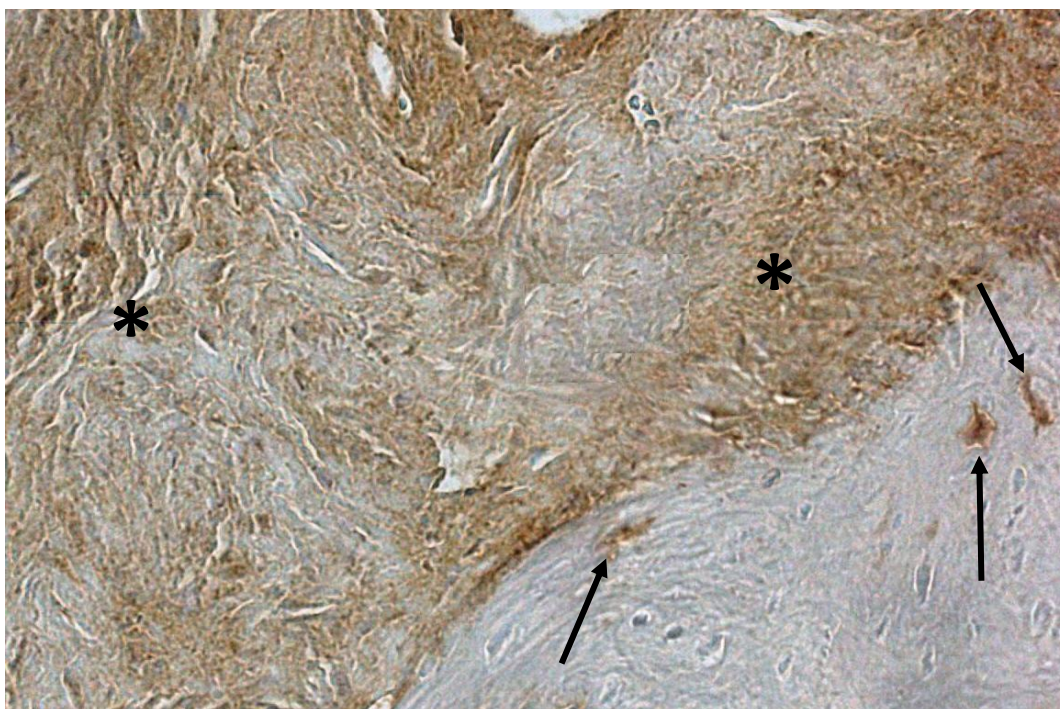
18. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz MMP 9 saturošās šūnas (bultiņas) *septum interradiculare* kaulaudos un daudz pozitīvo šūnu (zvaigznītes) periodontā (3. grupas pacients, MMP9, IMH, X400).



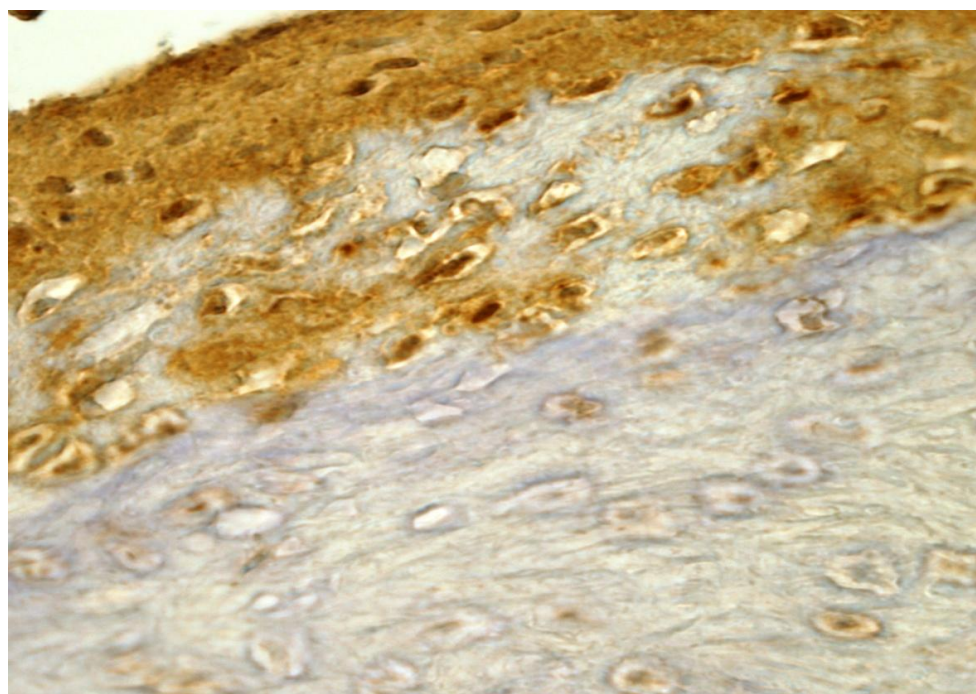
19. mikrofotogrāfija. Maz MMP 9 saturošo šūnu septum interradiculare kaulaudos (3. grupas pacients, MMP9, IMH, X400).



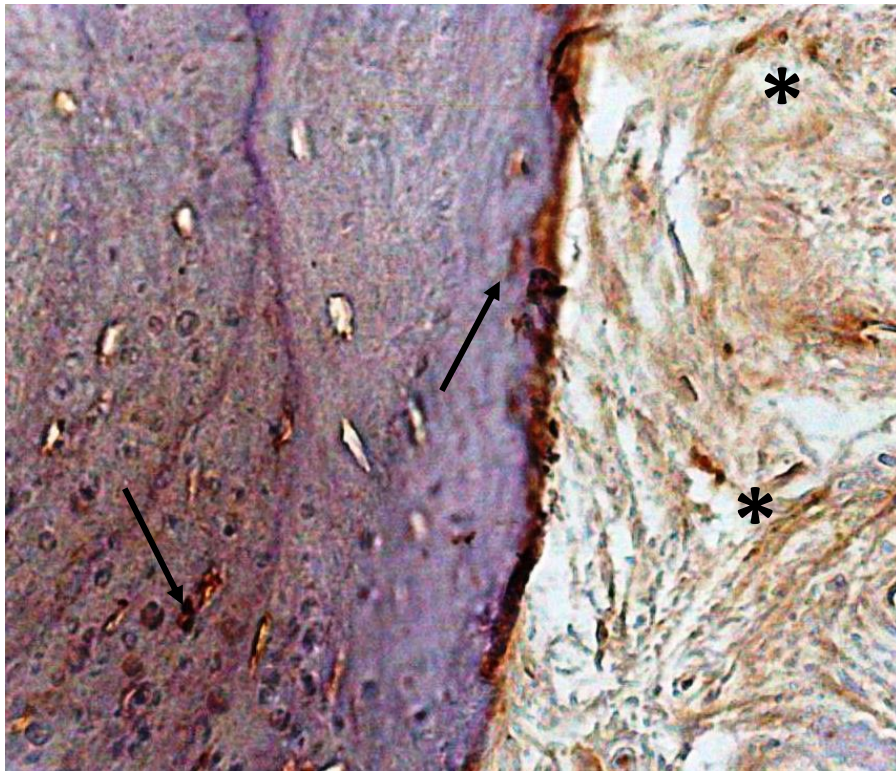
20. mikrofotogrāfija. Daudz NKpB 105 saturošo šūnu septum interradiculare kaulaudos un periodontā (1. grupas pacients, NKpB105, IMH, X400).



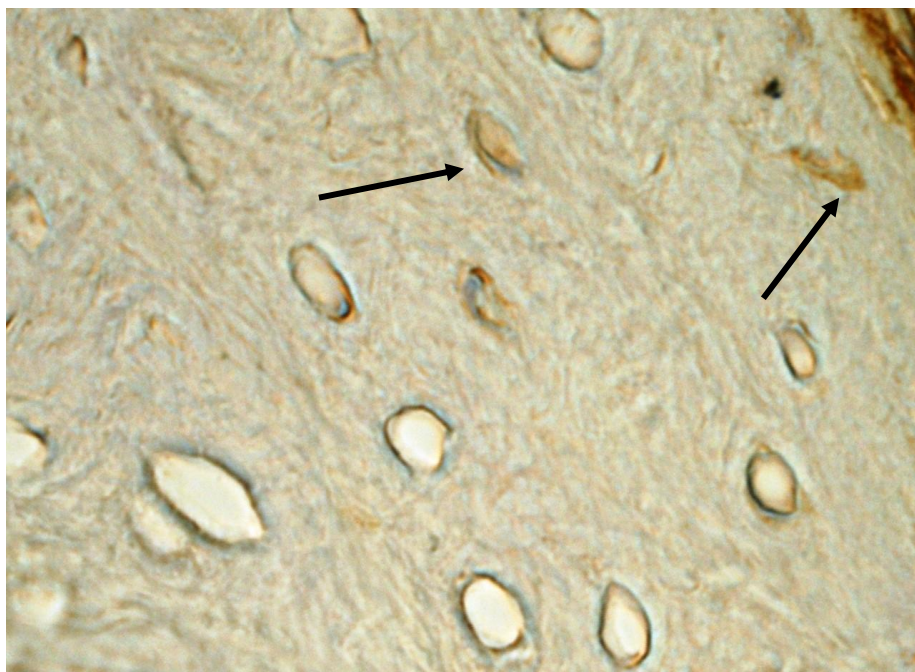
21. mikrofotogrāfija. Maz NKpB 105 saturošo šūnu *septum interradiculare* kaulaudos (bultiņas) un vidēji daudz pozitīvo šūnu (zvaigznītes) periodontā (2. grupas pacients, NKpB105, IMH, X400).



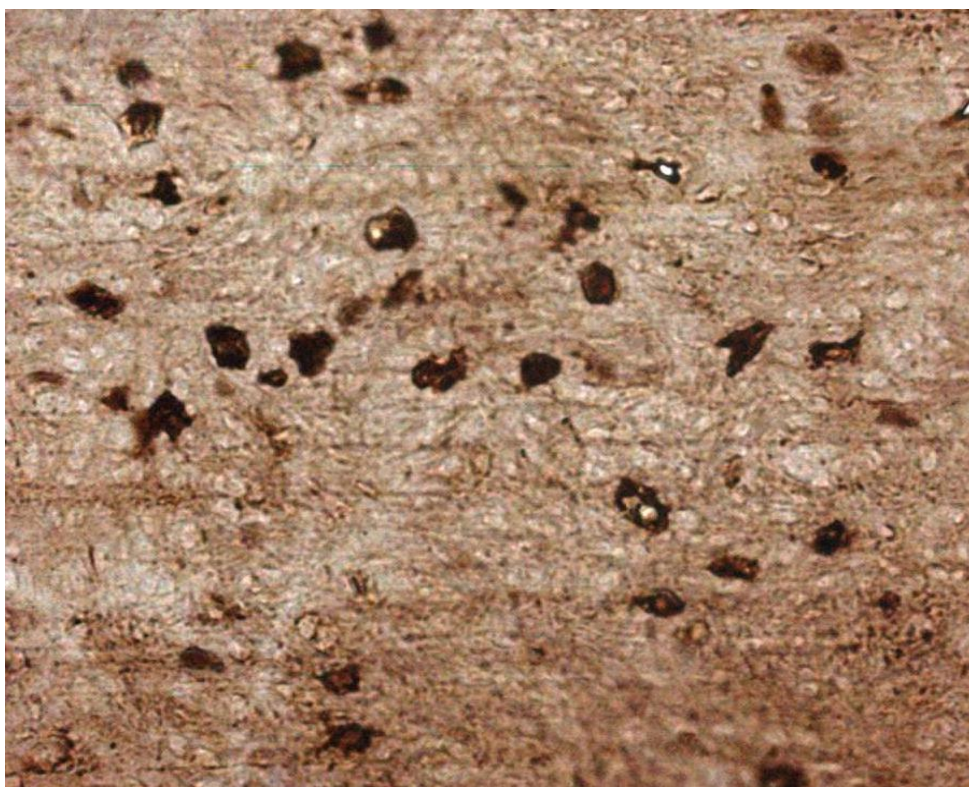
22. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz NKpB 105 saturošo šūnu *septum interradiculare* kaulaudos un daudz pozitīvo šūnu periodontā (2. grupas pacients, NKpB105, IMH, X400).



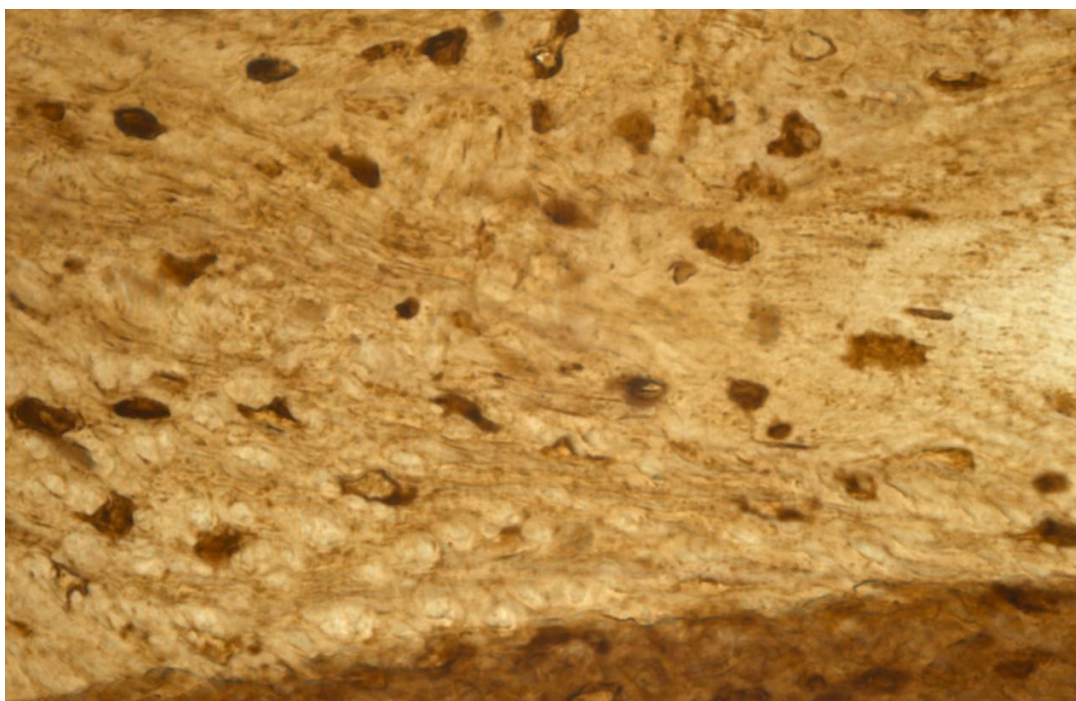
23. mikrofotogrāfija. Maz NKpB 105 saturošo šūnu (bultiņas) *septum interradiculare* kaulaudos un (zvaigznītes) periodontā (3. grupas pacients, NKpB105, IMH, X400).



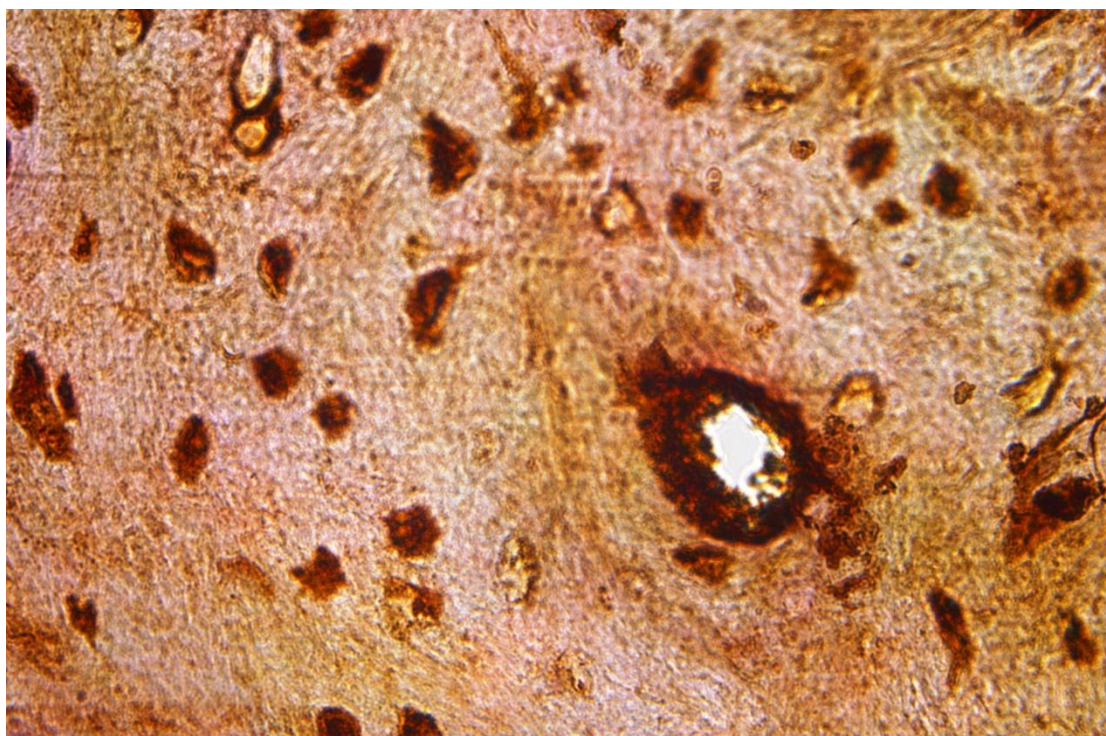
24. mikrofotogrāfija. Maz NKpB 105 saturošo šūnu (bultiņas) *septum interradiculare* kaulaudos (3. grupas pacients, NKpB105, IMH, X400).



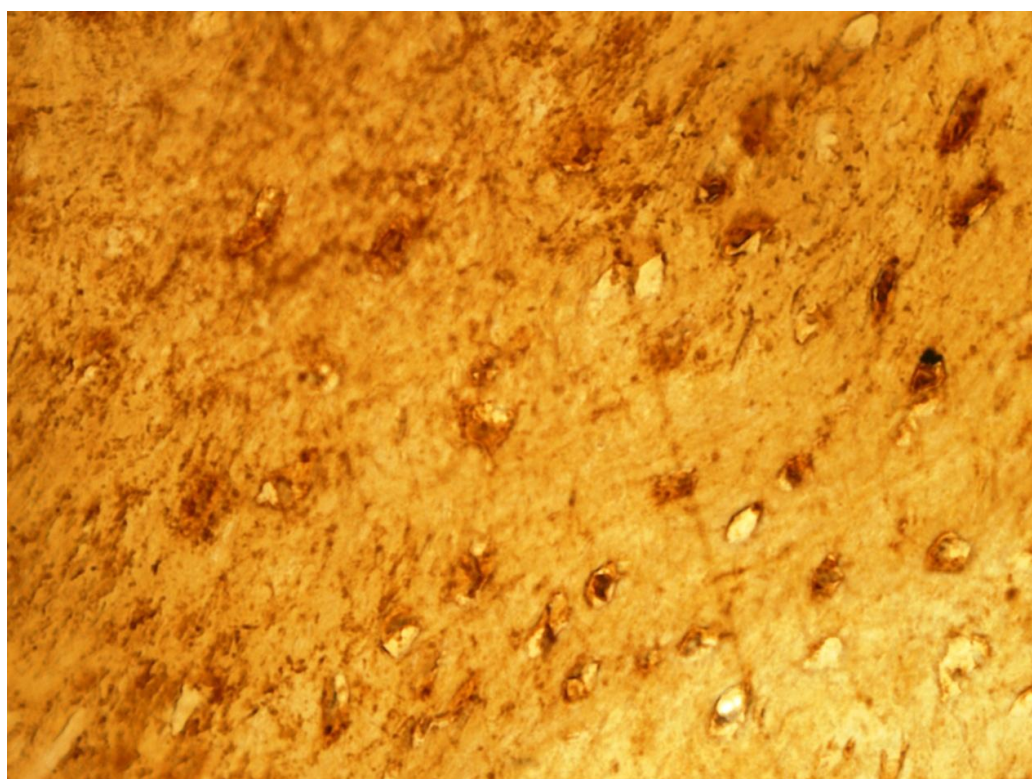
25. mikrofotogrāfija. Ļoti daudz osteokalcīnu saturošo šūnu *septum interradiculare* kaulaudos (1. grupas pacients, osteokalcīns, IMH, X400).



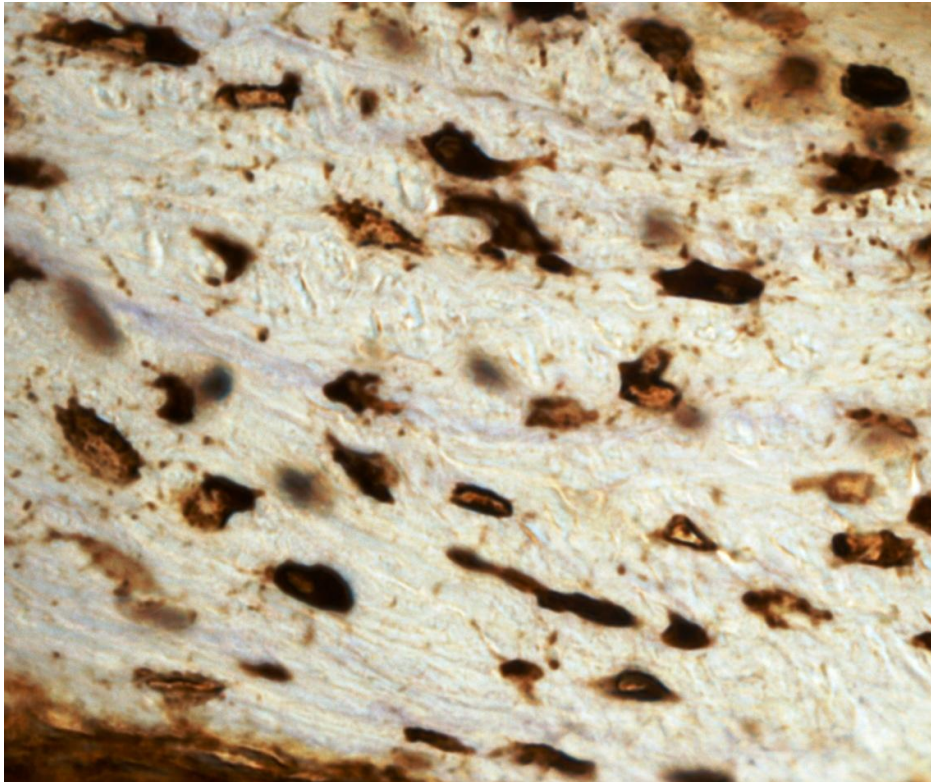
26. mikrofotogrāfija. Daudz osteokalcīnu saturošo šūnu *septum interradiculare* kaulaudos (2. grupas pacients, osteokalcīns, IMH, X400).



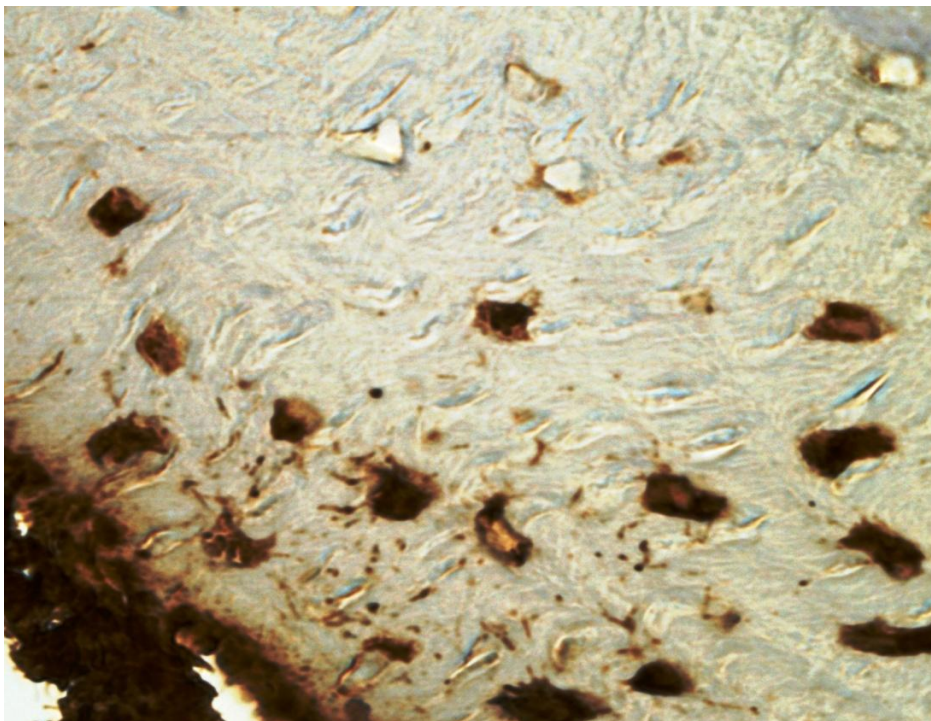
27. mikrofotogrāfija. Daudz osteokalcīnu saturošo šūnu *septum interradiculare* kaulaudos (2. grupas pacients, osteokalcīns, IMH, X400).



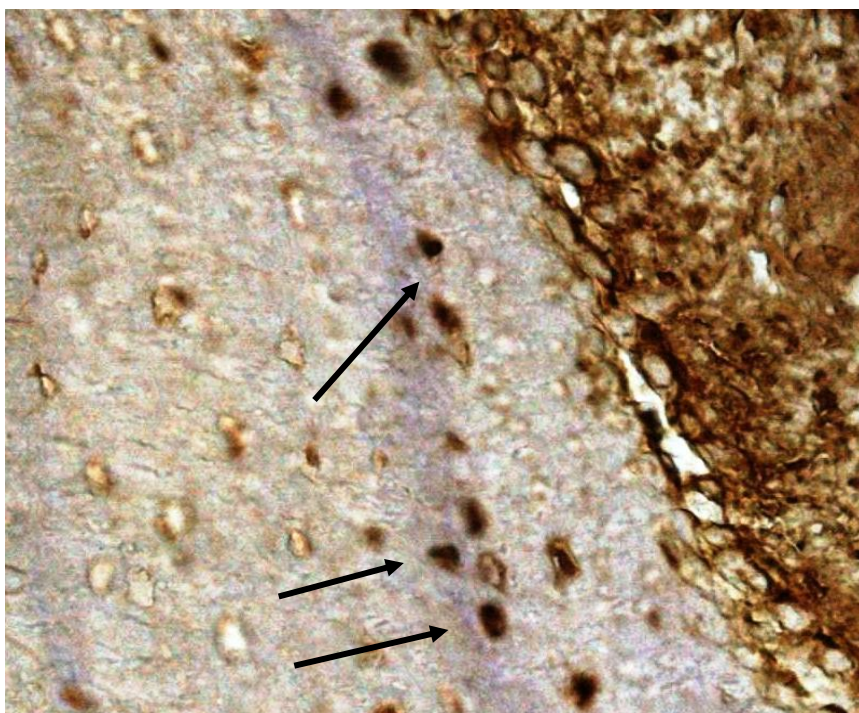
28. mikrofotogrāfija. Daudz osteokalcīnu saturošo šūnu *septum interradiculare* kaulaudos (3. grupas pacients, osteokalcīns, IMH, X400).



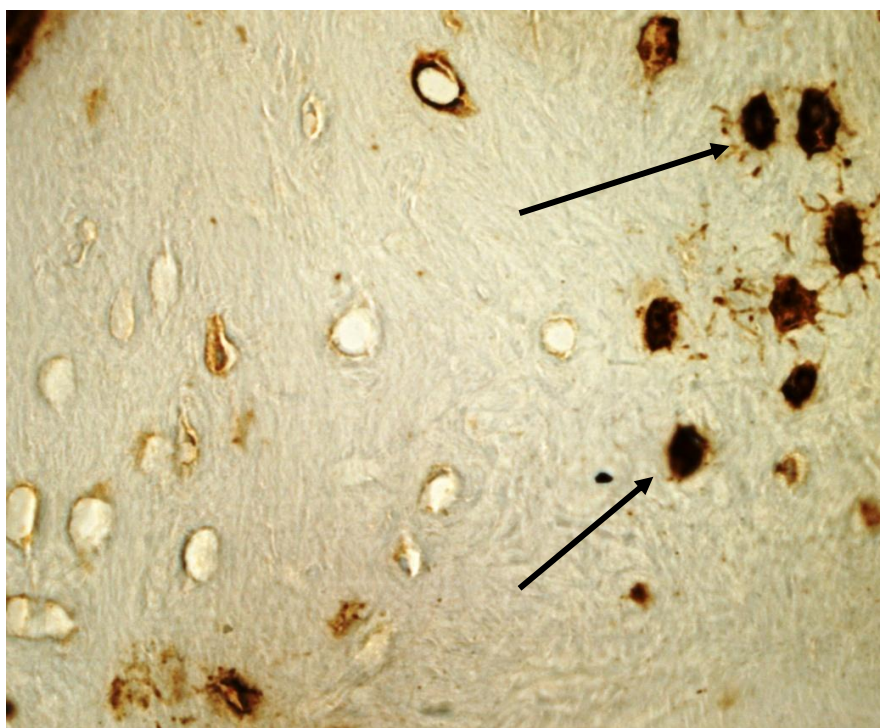
29. mikrofotogrāfija. Daudz TGFβ pozitīvo šūnu *septum interradiculare* kaulaudos (1. grupas pacients, TGFβ, IMH, X400).



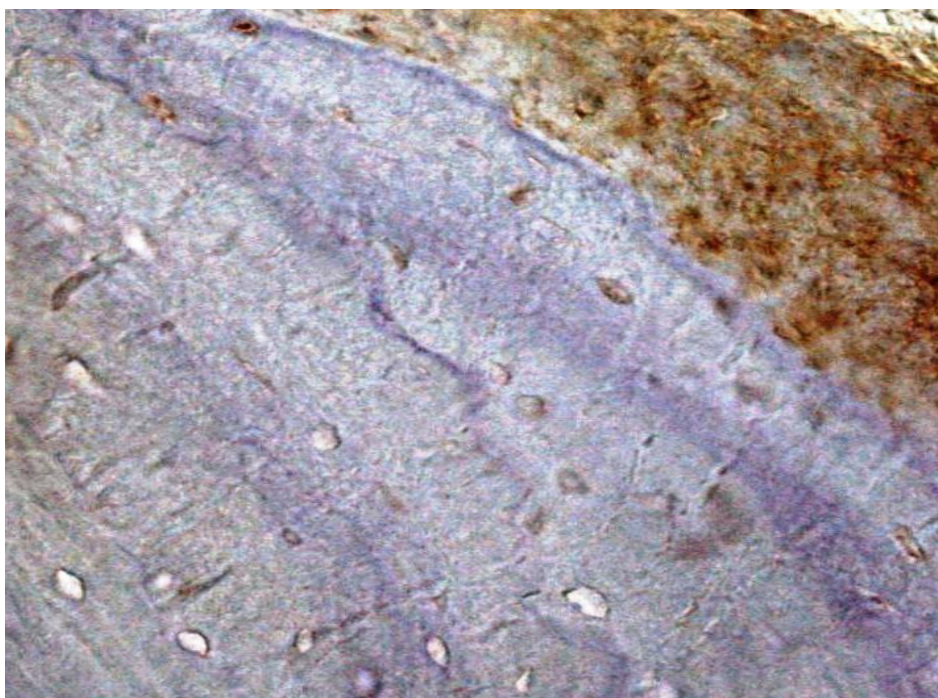
30. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz TGFβ pozitīvo šūnu *septum interradiculare* kaulaudos un periodontā (1. grupas pacients, TGFβ, IMH, X400).



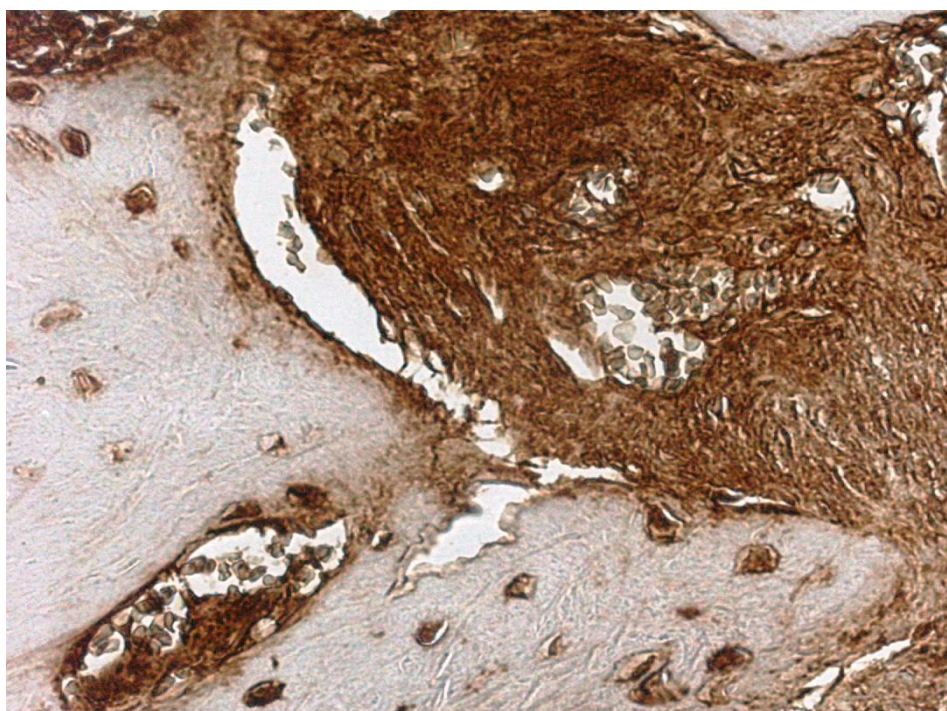
31. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz TGFβ saturošu šūnu *septum interradiculare* kaulaudos (bultiņas) un daudz pozitīvo struktūru periodontā (2. grupas pacients, TGFβ, IMH, X400).



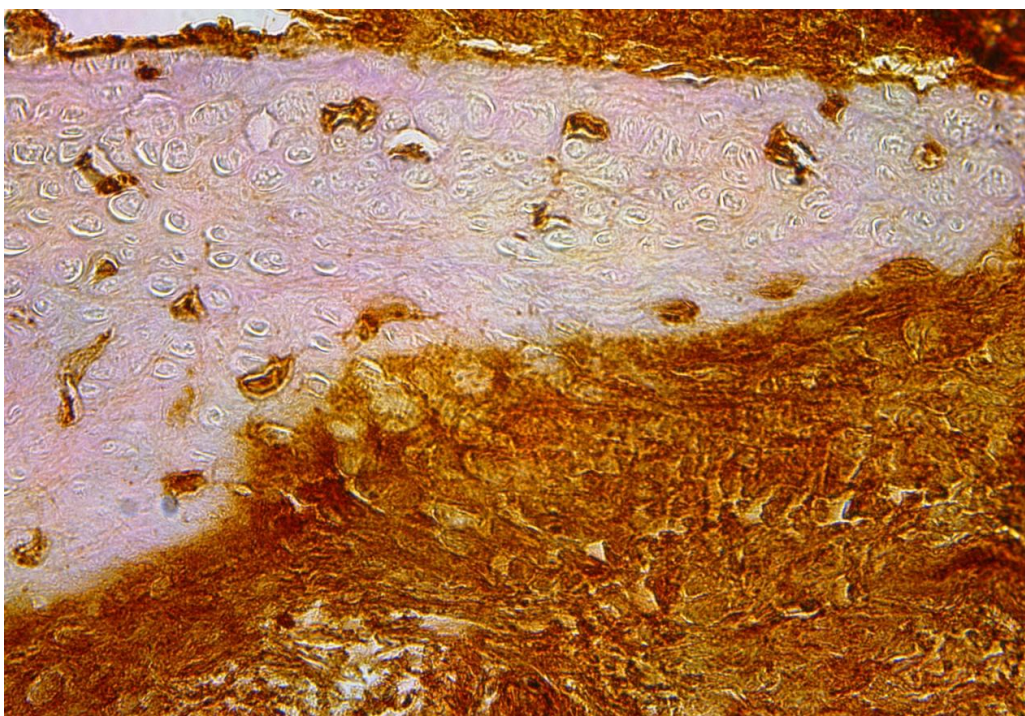
32. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz TGFβ saturošu šūnu *septum interradiculare* kaulaudos (bultiņas) (2. grupas pacients, TGFβ, IMH, X400).



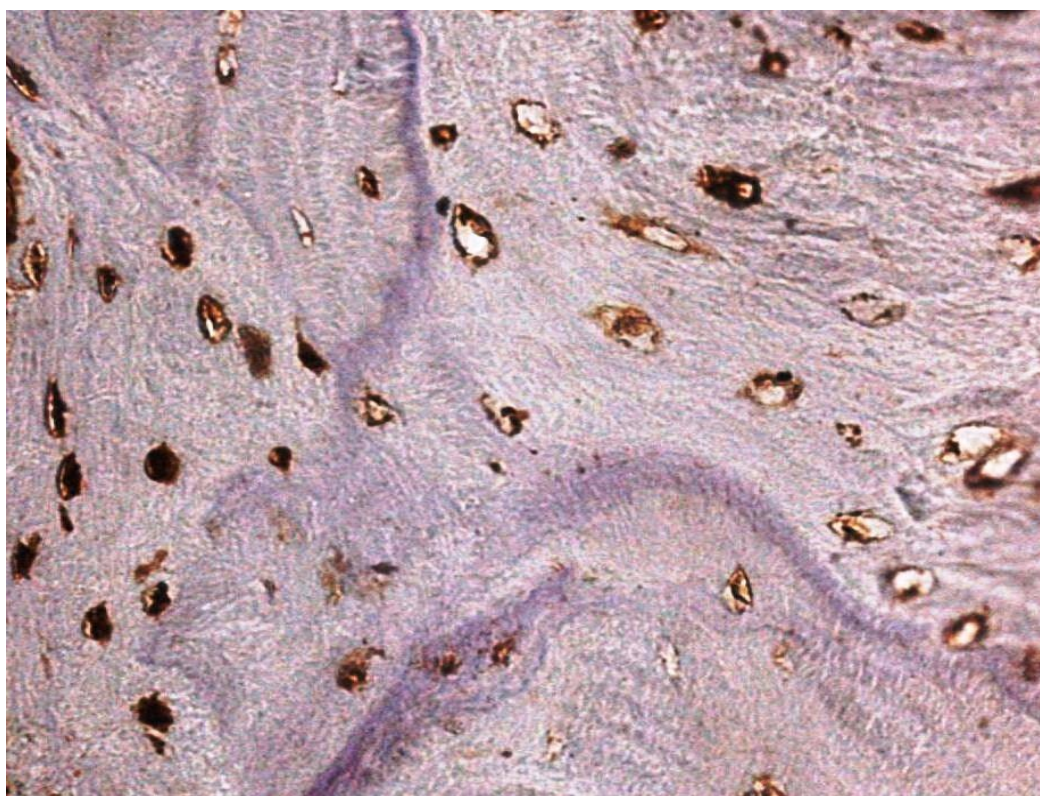
33. mikrofotogrāfija. Maz TGFβ pozitīvo struktūru *septum interradiculare* kaulaudos un vidēji daudz periodontā (3. grupas pacients, TGFβ, IMH, X400).



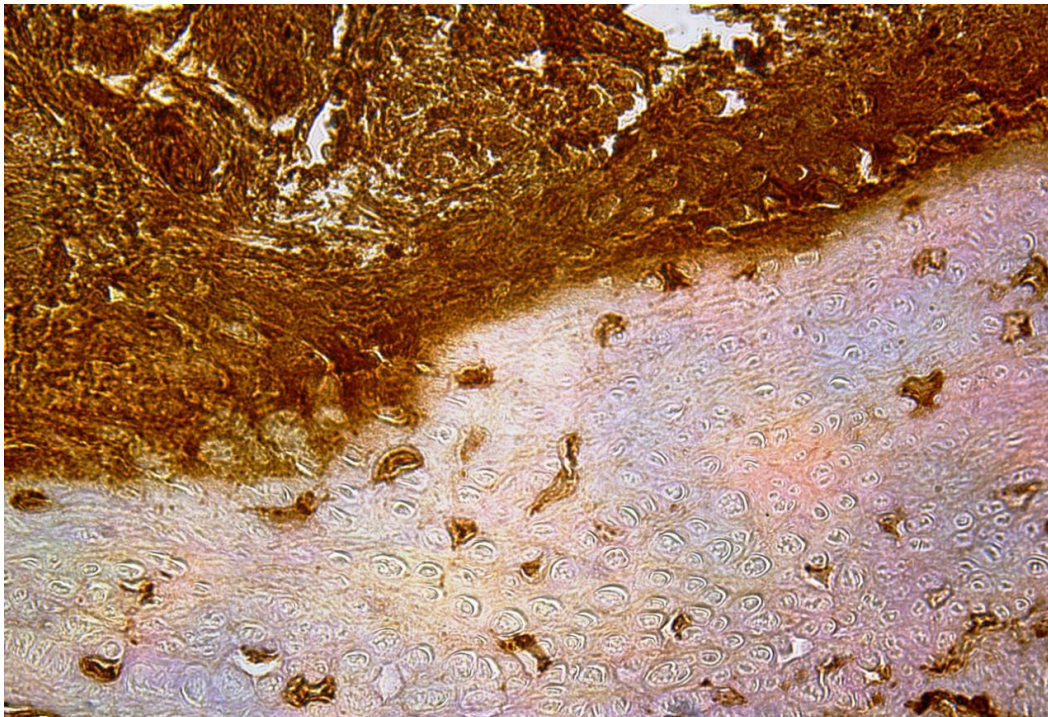
34. mikrofotogrāfija. Ļoti daudz FGFR1 saturošu šūnu *septum interradiculare* kaulaudos un faktora pozitīvu šķiedru periodontā (1. grupas pacients, FGFR1, IMH, X400).



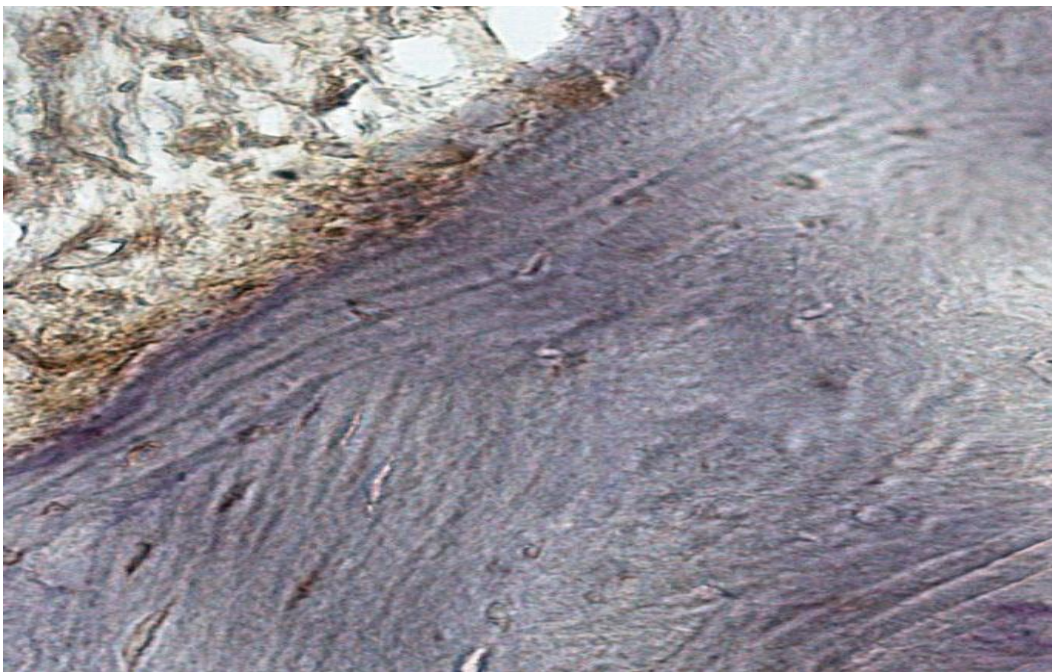
35. mikrofotogrāfija. Ļoti daudz FGFR1 saturošu struktūru septum interradiculare un periodontā (1. grupas pacients, FGFR1, IMH, X400).



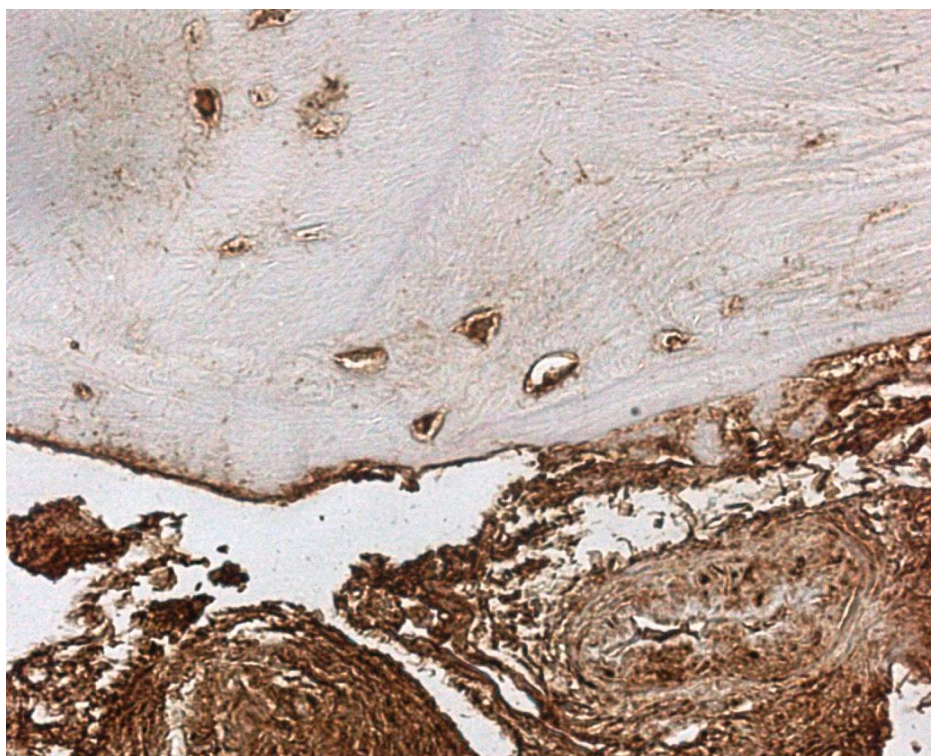
36. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz līdz daudz FGFR1 saturošu šūnu septum interradiculare kaulaudos (2. grupas pacients, FGFR1, IMH, X400).



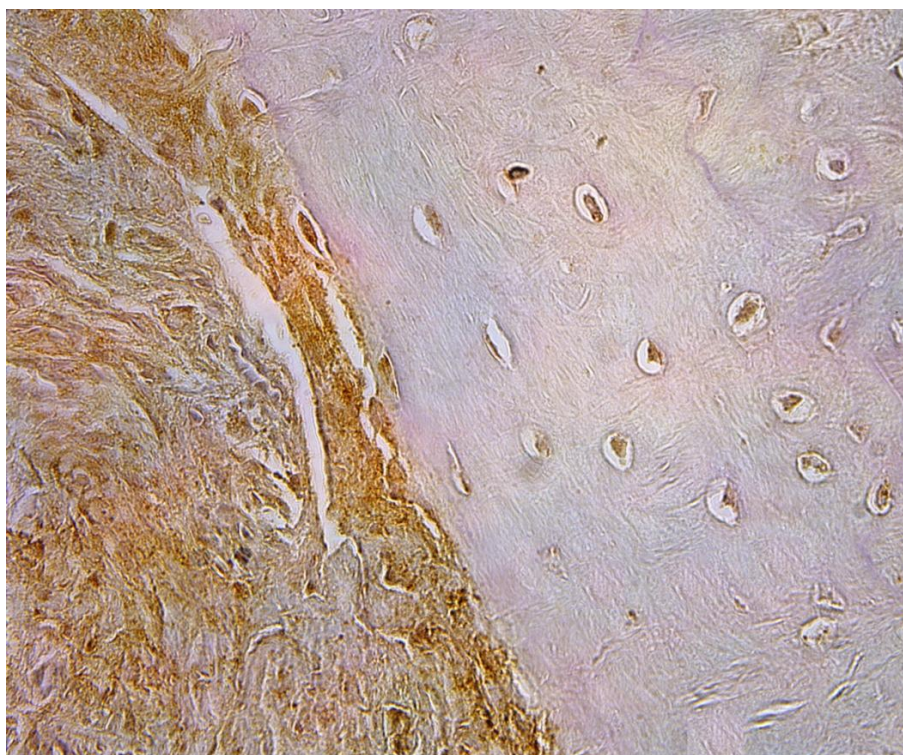
37. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz FGFR1 saturošu šūnu *septum interradiculare* kaulaudos un ļoti daudz pozitīvo struktūru periodontā (2. grupas pacients, FGFR1, IMH, X400).



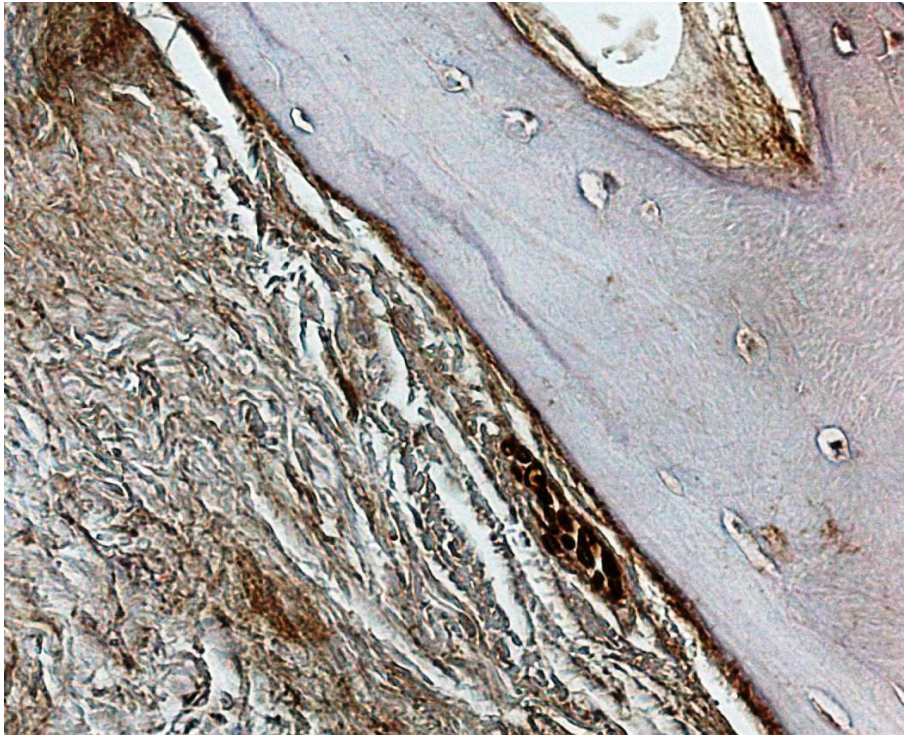
38. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz vāji iekrāsotu FGFR1 pozitīvo struktūru *septum interradiculare* kaulaudos un periodontā (3. grupas pacients, FGFR1, IMH, X400).



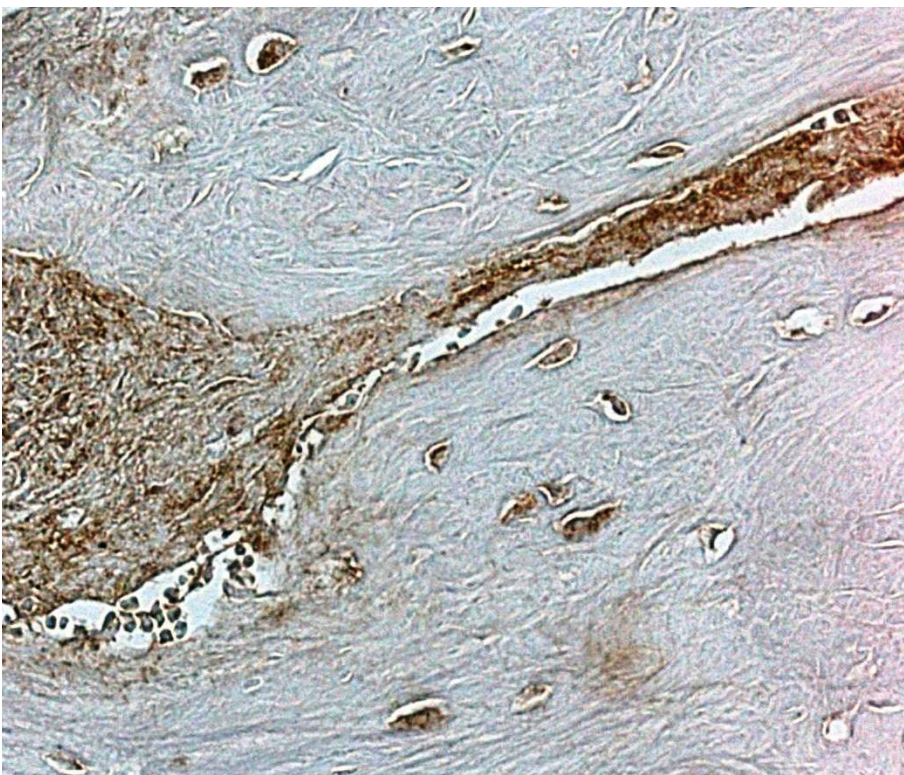
39. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz *septum interradiculare* kaulaudu un periodonta šūnas satur bFGF (1. grupas pacients, bFGF, IMH, X400).



40. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz bFGF saturošu šūnu *septum interradiculare* kaulaudos un daudz pozitīvu periodontā (1. grupas pacients, bFGF, IMH, X400).



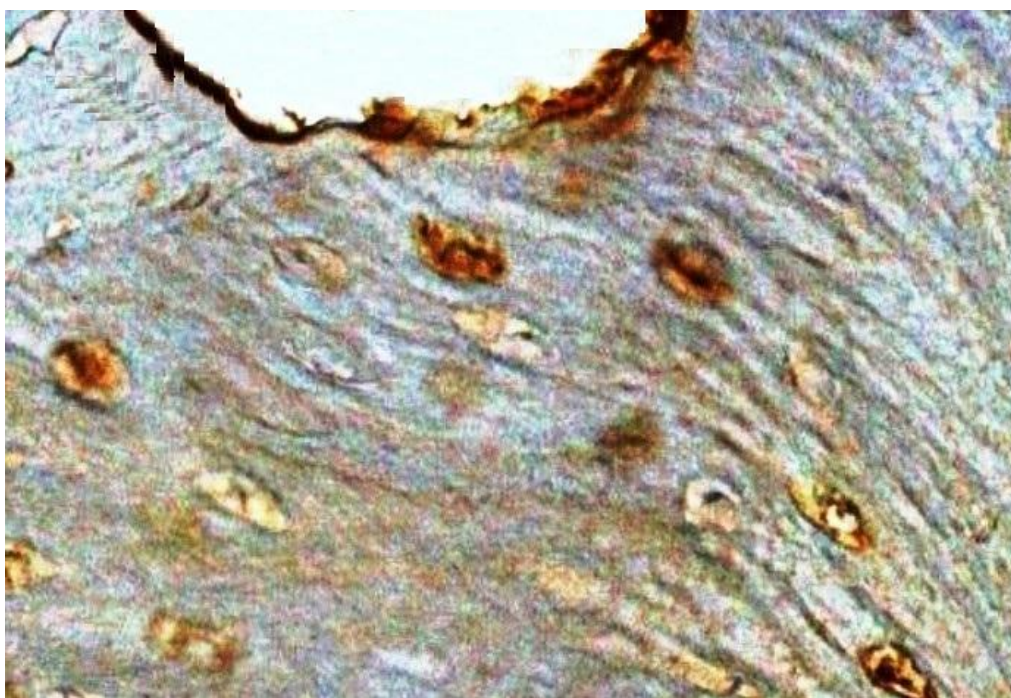
41. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz bFGF pozitīvu šūnu septum interradiculare kaulaudos (2. grupas pacients, bFGF, IMH, X400).



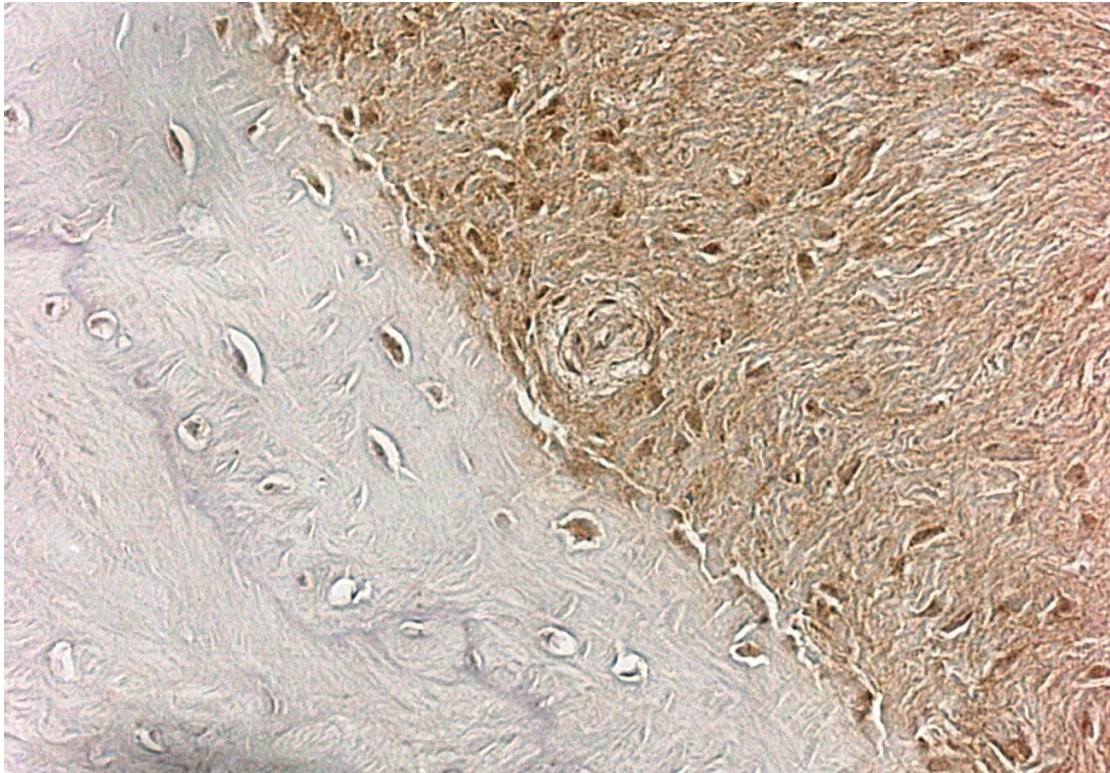
42. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz bFGF saturošu šūnu septum interradiculare kaulaudos un periodontā (3. grupas pacients, bFGF, IMH, X400).



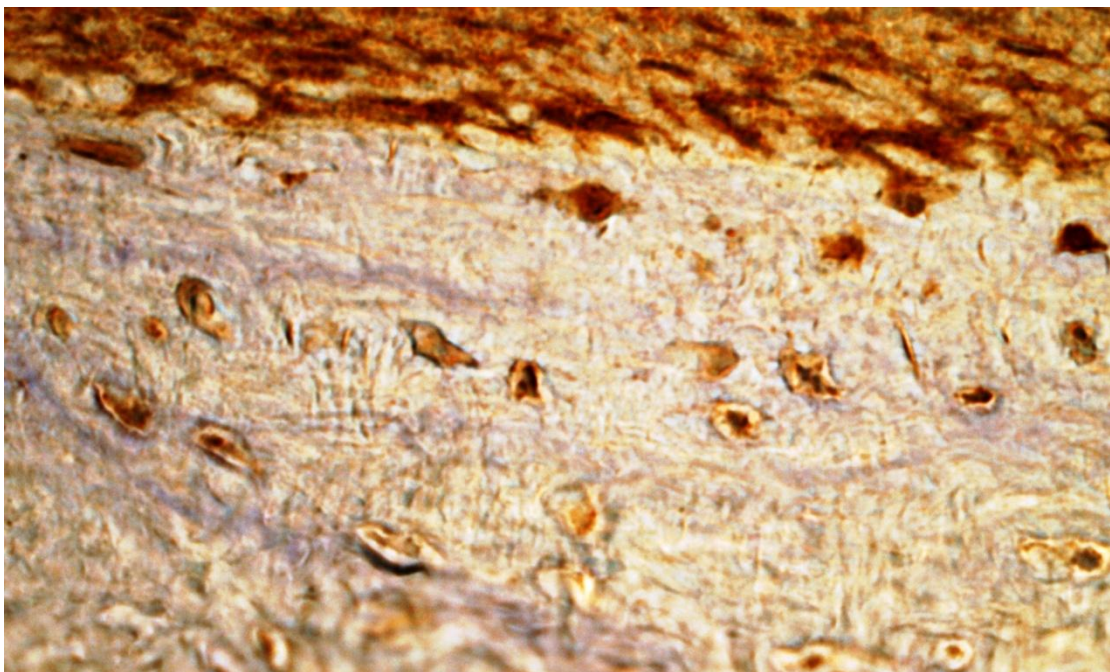
43. mikrofotogrāfija. Maz bFGF saturošu šūnu *septum interradiculare* kaulaudos (3. grupas pacients, bFGF, IMH, X400).



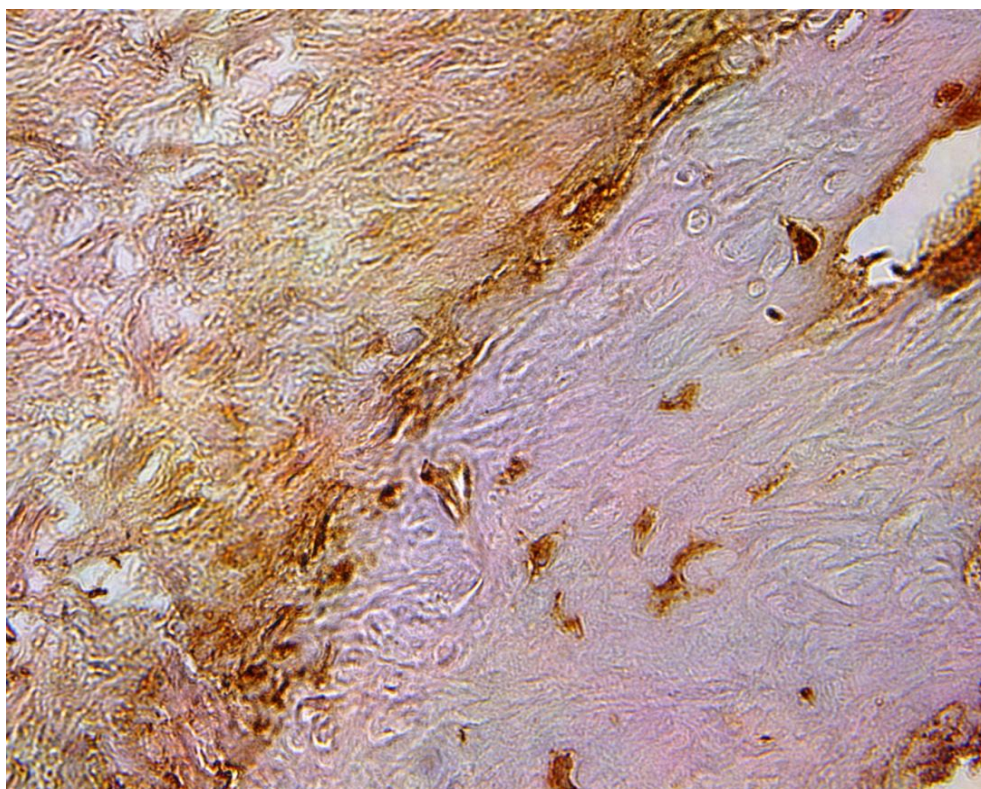
44. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz IL 6 saturošu šūnu *septum interradiculare* kaulaudos (1. grupas pacients, IL6, IMH, X400).



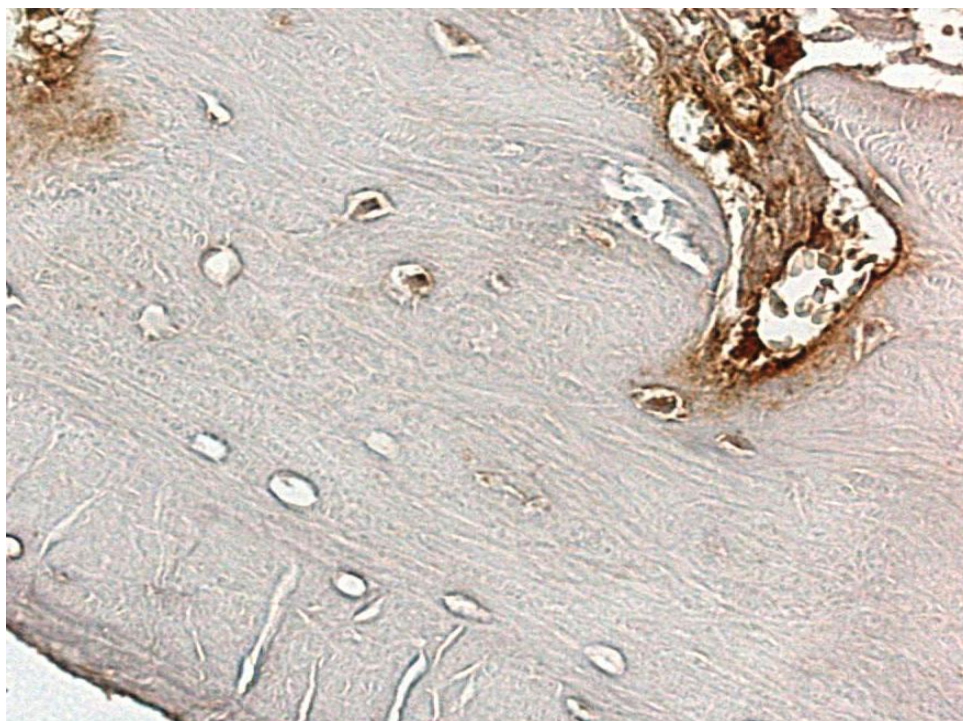
45. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz IL 6 saturošu šūnu periodontā un maz pozitīvo struktūru *septum interradiculare* (1. grupas pacients, IL6, IMH, X400).



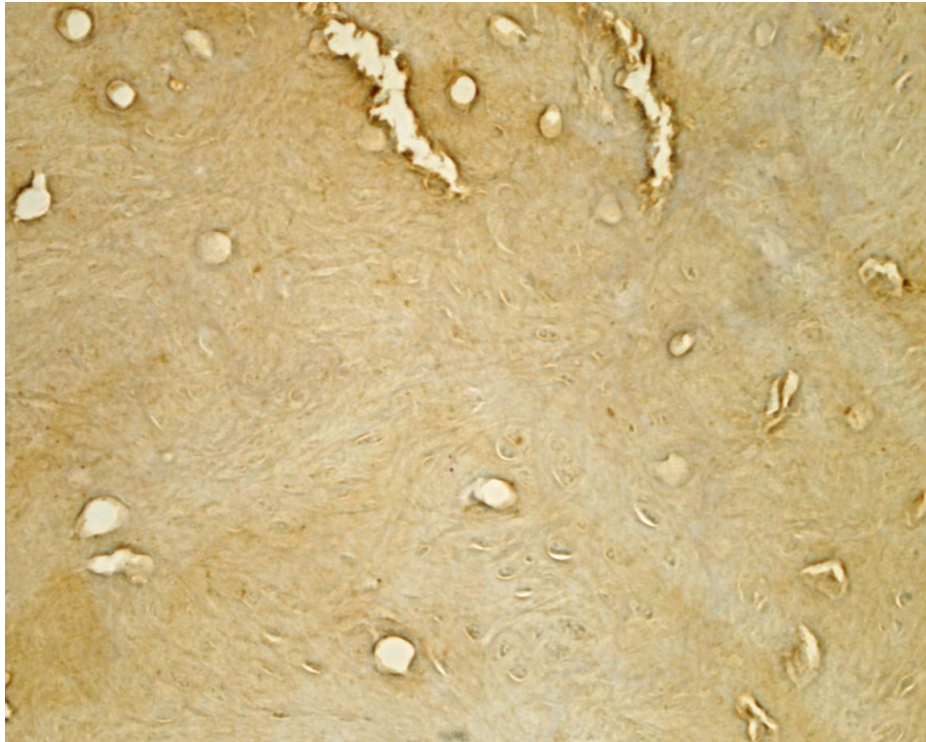
46. mikrofotogrāfija. Daudz IL 6 saturošu šūnu *septum interradiculare* kaulaudos un periodontā (2. grupas pacients, IL6, IMH, X400).



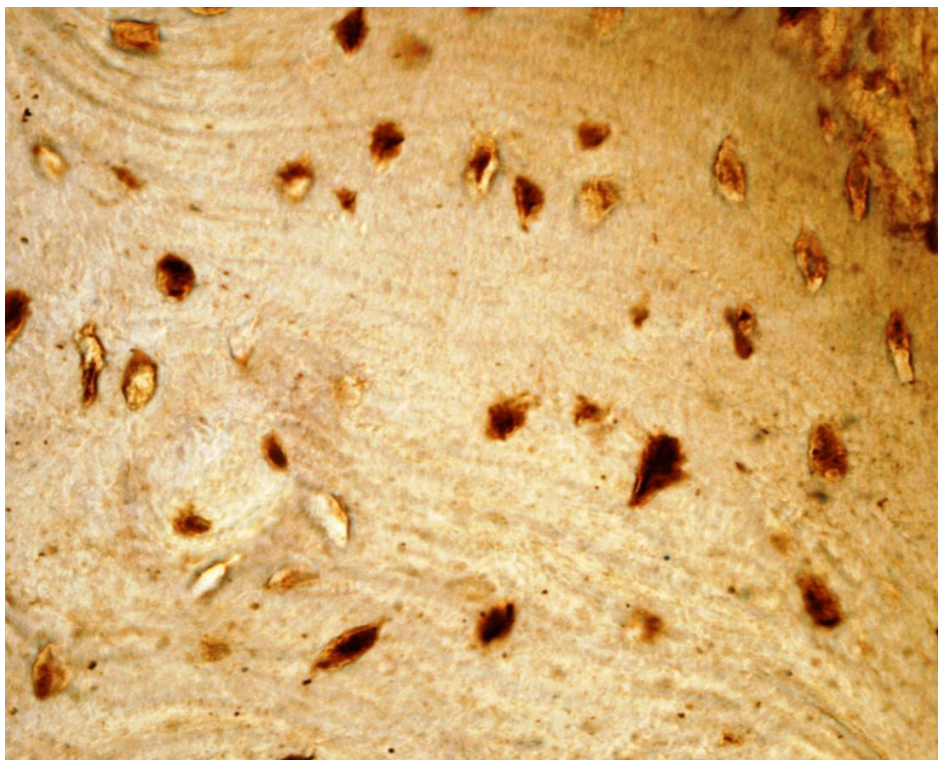
47. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz IL 6 saturošu šūnu *septum interradiculare* kaulaudos (2. grupas pacients, IL6, IMH, X400).



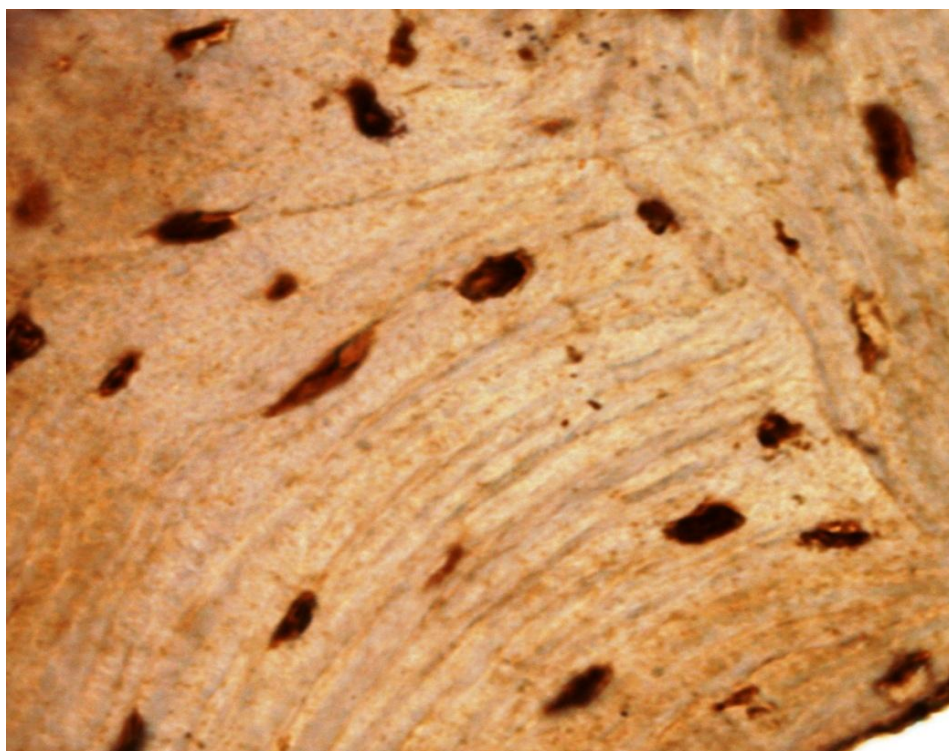
48. mikrofotogrāfija. Maz IL 6 pozitīvo šūnu *septum interradiculare* kaulaudos (3. grupas pacients, IL6, IMH, X400).



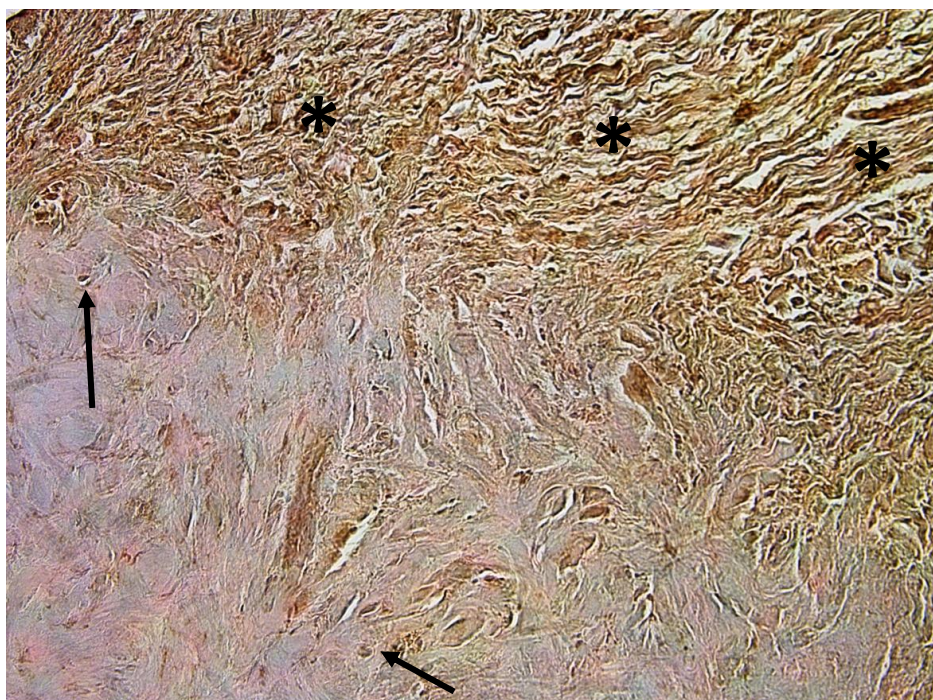
49. mikrofotogrāfija. Ļoti maz IL6 pozitīvo šūnu *septum interradiculare* kaulaudos (3. grupas pacients, IL6, IMH, X400).



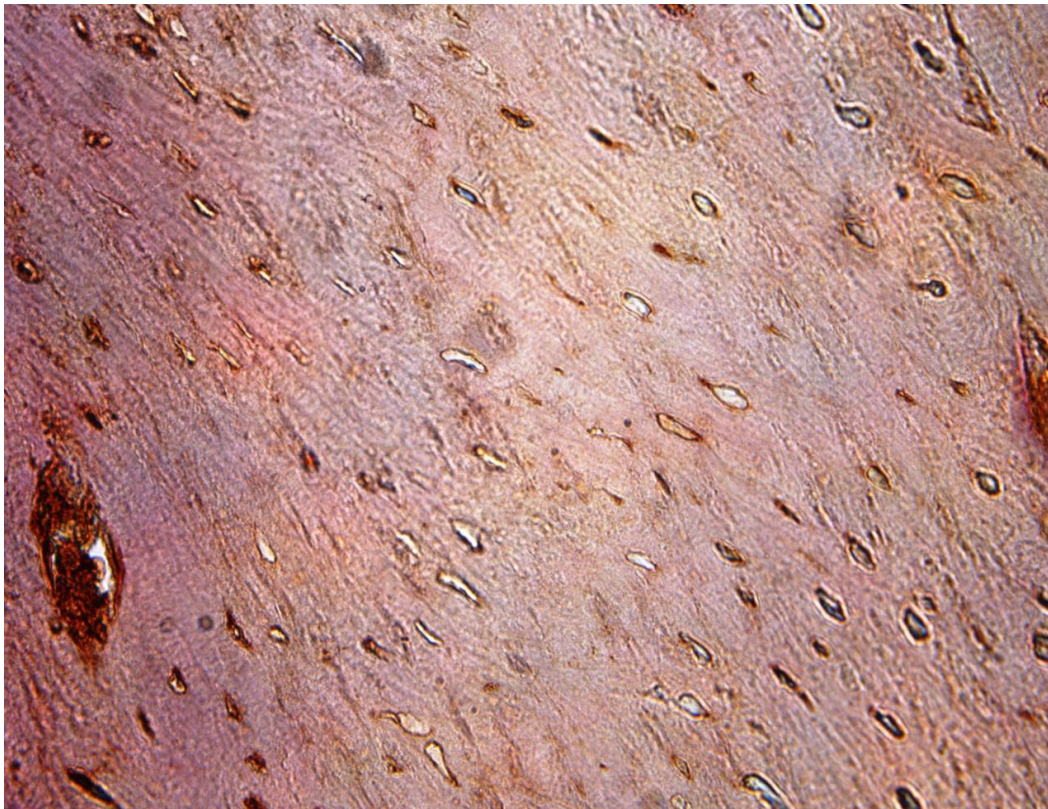
50. mikrofotogrāfija. Redzami vidēji daudz līdz daudz apoptotiski osteocīti *septum interradiculare* kaulaudos (1. grupas pacients, TUNEL, X 200).



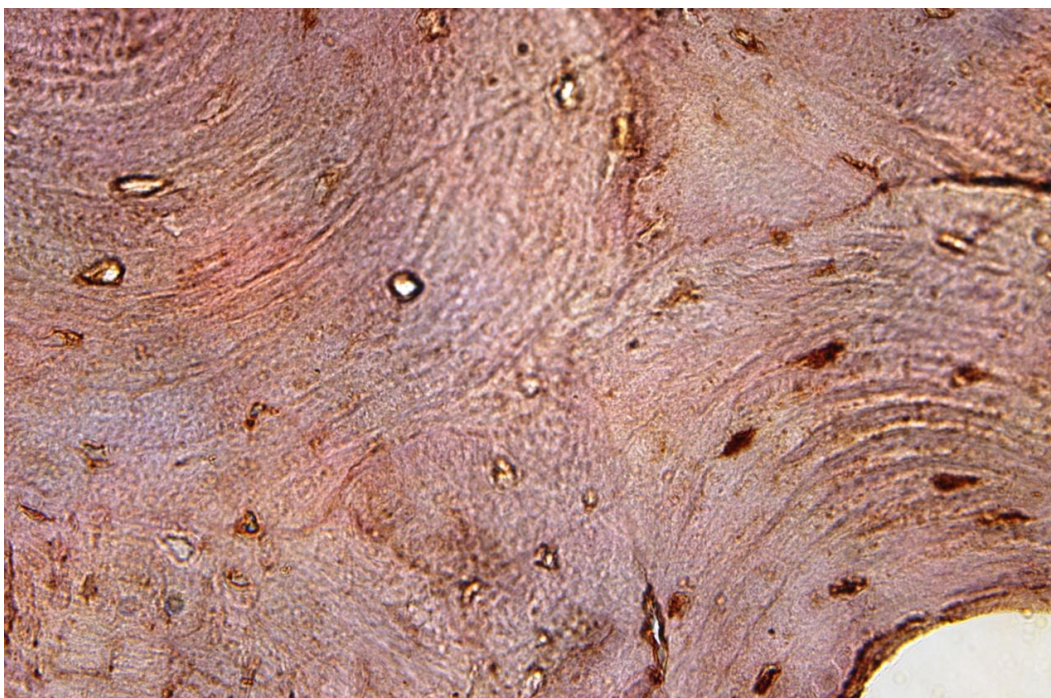
51. mikrofotogrāfija. Daudz apoptotiskās šūnas *septum interradiculare* kaulaudos (2. grupas pacients, TUNEL, X 400).



52. mikrofotogrāfija. Ļoti maz apoptotiskās šūnas (bultiņas) *septum interradiculare* kaulaudos un vidēji daudz pozitīvās struktūras (zvaigznītes) periodonta audos (2. grupas pacients, TUNEL, X 400).



53. mikrofotogrāfija. Redzami vidēji daudz apoptotiski osteocīti septum interradiculare kaulaudos (3. grupas pacients, TUNEL, X 400).



54. mikrofotogrāfija. Redzami vidēji daudz apoptotiski osteocīti septum interradiculare kaulaudos (3. grupas pacients, TUNEL, X 400).

PIELIKUMI – II

Veidlapa Nr E-9 (2)

RSU ĒTIKAS KOMITEJAS LĒMUMS

Rīga, Dzirciema iela 16, LV-1007
Tel.67409137

Komitejas sastāvs	Kvalifikācija	Nodarbošanās
1. Asoc. prof. Olafs Brūvers	Dr.miss.	teologs
2. Professore Vija Sīle	Dr.phil.	filozofs
3. Docente Santa Purviņa	Dr.med.	farmakologs
4. Asoc. prof. Voldemārs Arnis	Dr.biol.	rehabilitologs
5. Asoc. prof. Viesturs Līguts	Dr.med.	toksikologs
6. Professore Regīna Kleina	Dr.med.	patanatoms
7. Asoc. prof. Egils Korņevs	Dr.habil.med.	stomatologs
8. Asoc. prof. Guntars Pupelis	Dr.med.	ķirurgs

Pieteikuma iesniedzējs: prof. I.Urtāne
RSU Stomatoloģijas institūts, RSU Anatomijas un antropoloģijas institūts

Pētījuma nosaukums: Signālmolekulu ekspresijas kvantitatīvais novērtējums alveolārā kaulā dažādās vecuma grupās.

Iesniegšanas datums: 12.02.2010.

Pētījuma protokols:

- (X) Pētījuma veids: pētījums tiks veikts izmantojot alveolārā kaula materiālu no zobu ekstrakcijas vietām (septa interradicularis), kas iegūts ķirurģiskās zobu ekstrakcijas rezultātā, pacientiem, kam indicēta zobu ekstrakcija ortodontiskās ārstēšanas nolūkos.
(X) Pētījuma populācija: RSU Stomatoloģijas institūta ortodontijas pacienti vecumā no 12 līdz 23 gadiem
(X) Informācija par pētījumu:
(X) Piekrišana dalībai pētījumā:

Citi dokumenti:

1. Projekta vadītājas CV
2. Projektā iesaistīto pētnieku CV

Lēmums: piekrist biomedicīniskajam pētījumam

Komitejas priekšsēdētājs Olafs Brūvers

Paraksts



Ētikas komitejas sēdes datums: 11.03.2010.

Tituls: Dr.miss., asoc.prof.



Piekrišanas veidlapa pacientiem piedalīties pētījumā „Signālmolekulu ekspresijas kvantitatīvais novērtējums alveolārā kaulā dažādās vecuma grupās”

Es _____ (vārds, uzvārds) piekrītu, ka zobu ekstrakcijas jeb izņemšanas laikā tiks paņemti 1-2 mm² lieli audu gabaliņi no zobu izņemšanas vietām zinātniskajam pētījumam. Pētījums man tika pilnībā izskaidrots. Man tika dota izdevība uzdot jautājumus par jebkuru no visiem pētījuma aspektiem. Es apzinos, ka mana piedalīšanās ir brīvprātīga un ka atteikšanās piedalīties pētījumā neietekmēs turpmāko ārstēšanu.

Ar šo es, apakšā parakstījušāis/-sies, dodu piekrišanu manai līdzdalībai augstāk minētajā pētījumā. Viena šīs piekrišanas kopija paliek manā lietošanā. Man ir zināms, ka, ja mna ir kādi jautājumi saistībā ar šo pētījumu, es varu griezties pie ārsta – ortodonta Māra Gržibovska, piezvanot pa tālruni 67450167

Pētījumā iesaistītā persona _____

Paraksts / datums _____

Pētnieks

Dr. M. Gržibovskis