



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Jānis Zariņš

ORCID 0000-0003-1168-0921

Kaulu struktūras pārmaiņas pēc divfāzisku vai
trīsfāzisku stronciju saturošu biomateriālu
implantācijas dzīvniekiem
ar eksperimentālu osteoporozi

Promocijas darba kopsavilkums zinātniskā doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph.D.*)” iegūšanai

Nozare – medicīnas bāzes zinātnes, tai skaitā farmācija
Apakšnozare – histoloģija un citoloģija

Rīga, 2020

Promocijas darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūtā, Morfoloģijas katedrā, Latvijā

Promocijas darba vadītāji:

Dr. med., Dr. habil. med. profesore **Māra Pilmane**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. **Elga Sidhoma**, Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Zinātniskā konsultante:

Dr. med. **Ilze Šalma**, Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. sc. ing. asociētā profesore **Kristīne Šalma-Ancāne**,
Rīgas Tehniskās universitātes Rūdolfa Cimdiņa Rīgas Biomateriālu
inovācijas un attīstības centrs, Latvija

Dr. med. profesore **Ingrīda Balnytė**, Veselības zinātņu universitāte, Lietuva

Dr. med. profesors **Andres Arend**, Tartu Universitāte, Igaunija

Promocijas darbs tiks aizstāvēts promocijas padomes “Medicīnas bāzes zinātnes, tai skaitā farmācija” atklātā sēdē 2020. gada 9. decembrī plkst. 15.00 gan Rīgas Stradiņa universitātē, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā, gan attālināti Zoom tiešsaistes platformā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU tīmekļa vietnē:
<https://www.rsu.lv/promocijas-darbi>

Promocijas padomes sekretārs:

Dr. habil. sc. ing. profesors **Vladimirs Kasjanovs**

Saturs

Darbā lietotie saīsinājumi.....	4
Ievads.....	5
1. Materiāli un metodes.....	10
1.1. Pētījuma grupas.....	10
1.2. Eksperimentālās osteoporozes ierosināšana.....	10
1.3. Biomateriālu raksturojums.....	11
1.4. Biomateriālu implantācija.....	12
1.5. Morfoloģiski izmeklējamais materiāls.....	12
1.5.1. Rutīnās histoloģijas metode.....	13
1.5.2. Imūnhistoķīmijas metode un reaģenti.....	13
1.6. Datu apstrādes metodes.....	15
1.6.1. Kaula apjoma noteikšana.....	15
1.6.2. Puskvantitatīvā skaitīšanas metode.....	15
1.6.3. Datu apstrādes statistiskās metodes.....	16
2. Rezultāti.....	17
2.1. Rutīnās morfoloģijas dati.....	17
2.2. Kaula apjoma mērījumi.....	18
2.3. Kontroles un osteoporotisko dzīvnieku kaulā noteikto faktoru imūnhistoķīmiskais raksturojums.....	20
2.3.1. Kaula pamatvielas un mineralizācijas faktori.....	20
2.3.2. Kaula reģenerācijas un šūnu funkcionālās aktivitātes faktori.....	25
2.3.3. Kaula deģenerācijas enzīmi un to nomācēj faktori ...	32
2.3.4. Kaula resorbcijas un lokālās imunitātes faktori.....	37
2.4. Imūnhistoķīmiski noteikto faktoru savstarpējās korelācijas dati.....	42
3. Diskusija.....	43
Secinājumi.....	64
Literatūras saraksts.....	67
Publikācijas par pētījuma tēmu.....	74
Pateicības.....	77

Darbā lietotie saīsinājumi

Abreviatūra	Nosaukums latviešu valodā	Nosaukums angļu valodā
<i>BMP-2/4</i>	kaula morfogēnais proteīns-2/4	bone morphogenetic protein-2/4
<i>CPC</i>	kalcija fosfāta keramika	calcium phosphate ceramic
<i>Col-1α</i>	kolagēns 1 alfa	collagen 1 alpha
<i>ECM</i>	ekstracelulārā matrice	extracellular matrix
<i>HA</i>	hidroksilapatīts	hydroxyapatite
<i>Il-1</i>	interleikīns-1	interleukin-1
<i>Il-6</i>	interleikīns-6	interleukin-6
<i>Il-10</i>	interleikīns-10	interleukin-10
<i>MMPs</i>	matrices metaloproteināzes	matrix metalloproteinases
<i>MMP-2</i>	matrices metaloproteināze-2	matrix metalloproteinase-2
<i>NFκB-105</i>	nukleārais faktors kappa beta-105	nuclear factor kappa beta-105
<i>OC</i>	osteokalcīns	osteocalcin
<i>OPG</i>	osteoproteģerīns	osteoprotegerin
<i>RANK</i>	nukleārā faktora kappa beta receptora aktivators	receptor activator of nuclear factor kappa beta
<i>RANKL</i>	nukleārā faktora kappa beta receptora aktivatora ligands	receptor activator of nuclear factor kappa beta ligand
<i>sham</i>	tukšās kontroles grupa, biomateriāls netika ievietots	empty control group, without biomaterial implantation
<i>Sr</i>	stroncijs	strontium
<i>TCP</i>	trikalcija fosfāts	tricalcium phosphate
<i>TIMP-2</i>	matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitors	tissue inhibitor of metalloproteinase-2

Ievads

Kaulaudu fizikālās un morfoloģiskās īpašības nodrošina osteoblastu un osteoklastu mijiedarbība, ko regulē dažādas bioloģiski aktīvas vielas, kuru izdali savukārt ir iespējams regulēt ar biomateriālu palīdzību (Rucci, 2008). Kalcija fosfāta keramika (*CPC*), visbiežāk hidroksilapatīta (*HA*) un trikalcija fosfāta (*TCP*) kombinācijā, tiek plaši pielietota kā kaulu aizvietojošs materiāls, jo tās ķīmiskā uzbūve ir ļoti līdzīga cilvēka kaulam (Praksam et al., 2017). Divfāziski *CPC* savienojumi spēj nodrošināt jonu apmaiņu un piesaisti, lai nodrošinātu kaula homeostāzi (Cardemil et al., 2013). Līdz ar to ir iespējama kalcija (*Ca*) jonu aizvietošana ar citiem joniem, lai lokāli stimulētu kaulaudu reģenerāciju (Offermanns et al., 2018). Viens no tādiem ir stroncijs (*Sr*), kurš pēc bioloģiskajām īpašībām ir līdzīgs *Ca*, tādēļ spēj ietekmēt kaula metabolismu (Andersen et al., 2013). *Sr* spēj aktivizēt osteoblastoģenēzi ar jaunas kaulvielas veidošanos un vienlaicīgi inhibēt osteoklastoģenēzi un kaulvielas noārdīšanos (Billström et al., 2014). Šīs unikālās īpašības veicina *Sr* jonu izmantošanu jaunu biomateriālu izveidē, taču ļoti svarīgi ir izprast kaulaudu strukturālās pārmaiņas un bioloģiski aktīvu vielu mijiedarbību kaula reģenerācijas laikā.

Viens no svarīgākajiem faktoriem ir osteokalcīns (*OC*), kura sekrēciju nodrošina osteoblasti, un tas regulē kaulvielas mineralizācijas procesu (Rodrigues et al., 2012). Kolagēns 1 alfa (*Col-1α*) veido lielāko daļu no ekstracelulārās matricēs (*ECM*) proteīniem, un tā sintēzi regulē osteoblasti, veidojot režģi apatītu kristālu depozicijai (Ferreira et al., 2012). Osteoproteģerīns (*OPG*) savukārt regulē osteoklastoģenēzi, jo tam, konkurējot ar nukleārā faktora kappā beta receptora aktivatora ligandu (*RANKL*) par piesaisti nukleārā faktora kappā beta receptora aktivatoram (*RANK*), tiek bloķēta osteoklastu diferenciācija un kaula resorbcija (Walsh & Choi, 2014). Nukleārais faktors kappā beta-105 (*NFκB-105*) kaula remodelācijas procesā veicina *RANKL* piesaisti *RANK* receptoram, kā rezultātā tiek aktivizēta osteoklastoģenēze

(Baud'huin et al., 2007). Kaula morfogēnais proteīns-2/4 (*BMP-2/4*) ir multifunkcionāls augšanas faktors, kas regulē osteoblastu diferenciāciju no mezenhimālām cilmes šūnām, aktivizē sārmainās fosfatāzes, kolagēna, OC izdali un veicina jauna kaula veidošanos (Kim et al., 2015). Kaula remodelācijas procesā nozīmīga loma ir matricē metaloproteināzei-2 (*MMP-2*), kas ir cinka atkarīgs proteolītiskais enzīms, un matricē metaloproteināzes-2 audu inhibitora (*TIMP-2*) mijiedarbībai organiskās kaula matricē komponentu, īpaši kolagēna, degradācijas procesā (Baker et al., 2002; Davis & Senger, 2005). Kaula reģenerācijas procesā liela loma ir arī lokālai kaula imunitātei. Zināms, ka interleikīns-1 (*Il-1*) kā iekaisuma citokīns stimulē osteoklastu diferenciāciju, un, palielinot *RANKL* sintēzi, ierosina kaula resorbciju (Compston, 2001). Turpretim interleikīns-10 (*Il-10*) kā pret-iekaisuma citokīns spēj novērst *Il-1*, interleikīns-6 (*Il-6*) vai tumora nekrozes faktora alfa sekrēciju (Schraufstatter et al., 2012). Kā arī *Il-10* kaula remodelācijas procesā spēj nomākt *RANK/RANKL* ierosinātu osteoklastoģenēzi (Liu, Yao & Wise, 2006).

Lai arī iepriekš ir pētīta *Sr* saturošu biomateriālu loma eksperimenta dzīvnieku kaulos, jāteic, ka nav daudz tādu pētījumu, kuri veikti ar osteoporotiskiem trušiem, kur osteoporozes līmenis būtu analogisks postmenopauzālai osteoporozei. Līdz ar to ir nepieciešama padziļināta izpratne par *Sr* saturošas *CPC* biomateriālu ierosinātām kaulaudu morfoloģiskām izmaiņām veselu un osteoporotisku trušu kaulos.

Darba mērķis un uzdevumi

Pētnieciskā darba **mērķis** bija noteikt un salīdzināt kaulu remodelācijas, mineralizācijas, augšanas faktoru, imunitātes un osteoklastoģenēzes marķierus veselu un osteoporotisku trušu kaulā pēc divfāzisku vai trīsfāzisku *Sr* jonu saturošu biomateriālu implantācijas.

Pētījuma mērķa sasniegšanai tika izvirzīti sekojoši **uzdevumi**:

- 1) morfoloģiski izpētīt veselu un osteoporotisku kaulaudu apjoma īpatnības;
- 2) ar imūnhistoķīmisko metodi noteikt sekojošus kaula homeostāzes procesa ietekmējošus marķierus veselā un osteoporotiskā kaulā:
 - osteokalcīns (*OC*) – kaulaudu mineralizācijas rādītājs;
 - kolagēns 1 alfa (*Col-1α*) – lielākais kaula matricē proteīns;
 - osteoproteģerīns (*OPG*) – osteoklastoģenēzes bloķētājs;
 - nukleārais faktors kapa beta-105 (*NFκB-105*) – osteoklastu aktivizētājs, šūnu aktivitātes rādītājs kombinācijā ar citiem faktoriem;
 - kaula morfoģenētiskais proteīns-2/4 (*BMP-2/4*) – kaula augšanas un reģenerācijas rādītājs;
 - matricē metaloproteināze-2 (*MMP-2*) – kaula matricē deģenerējošs enzīms;
 - matricē metaloproteināzes-2 audu inhibitors (*TIMP-2*) - kaula matricē deģenerējošā enzīma nomācējs;
 - interleikīns-1 (*Il-1*) – iekaisuma citokīns, kaula resorbcijas marķieris;
 - interleikīns-10 (*Il-10*) – pretiekaisuma citokīns, imunitātes rādītājs;
- 3) statistiski salīdzināt iegūtos rezultātus un novērtēt to ticamību.

Darba hipotēze

Stroncija jonu saturoši biomateriāli spēj aktīvāk ierosināt kaula reģenerāciju, uzlabojot kaulaudu homeostāzi osteoporozes gadījumā.

Darba novitāte

Šajā pētījumā pirmo reizi ir veikta audu paraugu analīze no 11 dažādiem trušu kaula stāvokļiem viena darba ietvaros un pēc vienas metodoloģijas. Veselu trušu kaulaudi tika salīdzināti ar osteoporotisku trušu kauliem pēc HA_{30}/TCP_{70} , $Sr-HA_{30}/TCP_{70}$, HA_{70}/TCP_{30} un $Sr-HA_{70}/TCP_{30}$ biomateriālu implantācijas vai tukšās kontroles jeb *sham* operācijas, kā arī ar audu paraugiem no neoperētās kājas. Tika izvērtēta virkne kaula metabolismam nozīmīgu audu faktoru kā *OPG*, *OC*, *NFκB-105*, *BMP-2/4*, *Col-1α*, *MMP-2*, *TIMP-2*, *Il-1* un *Il-10*. Analizēto kaula stāvokļu un faktoru kopums ir salīdzinoši lielāks nekā literatūrā pieejamos pētījumos par šo tēmu, un daži faktori analizēti pirmo reizi. Iegūtie dati varētu veicināt turpmāku *Sr* saturošu biomateriālu izmantošanu pētījumos, un iespējamu analizēto marķieru izmantošanu klīniskā praksē osteoporozes diagnostikas, ārstēšanas efektivitātes un prognozes novērtēšanai.

Personīgais ieguldījums

Darba autors ir veicis imūnhistoķīmisko vizualizāciju un novērtēšanu, zinātnisko datu ieguvu, apstrādi un statistisko analīzi. Autors ir sarakstījis šo darbu un ir visu darbā iekļauto mikrofotogrāfiju autors. Kopumā darbā analizēti vairāk kā 950 audu paraugi.

Ētiskie aspekti

Darbam ar trušiem saņemta Latvijas Republikas Pārtikas un veterinārā dienesta Dzīvnieku uzraudzības padomes apstiprināta atļauja Nr. 72 par dzīvnieku izmantošanu eksperimentālos pētījumos, kas izsniegta Valsts pētnieciskā projekta „Daudzfunkcionālie materiāli un kompozīti, fotonika un nanotehnoloģijas (IMIS2)” projekta „Nanomateriāli un nanotehnoloģijas medicīniskajam pielietojumam” realizēšanai.

Promocijas darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu valodā. Tas sastāv no 5 nodaļām: literatūras apskata, materiāla un metodēm, rezultātiem, diskusijas un secinājumiem. Promocijas darba apjoms ir 168 lapaspuses, darbā ir 35 tabulas un 107 attēli (mikrofotogrāfijas). Literatūras saraksts sastāv no 222 avotiem.

1. Materiāli un metodes

1.1. Pētījuma grupas

Pētījums tika veikts ar 46 trušiem (suga: Kalifornijas un Lielais Marders; dzimums: sievietes; vecums: 8 mēneši).

Truši tika sadalīti četrās eksperimentālās grupās (sk. 1.1. tab.):

- **A** grupas truši bija veseli, netika operēti un veidoja kontroles grupu. **B**, **C** un **D** grupas trušiem tika ierosināta osteoporoze.
- **B** un **C** grupas trušiem labā augšstilba kaulā izveidotais defekts tika aizpildīts ar 5% *Sr* jonu bagātinātām *HA/TCP* granulām (masas attiecība 30/70 un 70/30) un granulām bez *Sr* klātbūtnes.
- **D** grupas trušiem kaula defektā biomateriāli netika implantēti, un tie veidoja t.s. tukšo kontroli jeb *sham* grupu.

1.1. tabula

Pētījuma dizains

Grupa	A	B		C		D
Statuss	Veseli	<i>Sr</i> - <i>HA/TCP</i>	<i>HA/TCP</i>	<i>Sr</i> - <i>HA/TCP</i>	<i>HA/TCP</i>	<i>Sham</i>
Fāžu attiecība	-	30/70	30/70	70/30	70/30	-
Dzīvnieku skaits	10	7	7	7	8	7

Apzīmējums: *Sr* – stroncijs, *HA* – hidroksilapatīts, *TCP* – trikalcijs fosfāts.

1.2. Eksperimentālās osteoporozes ierosināšana

Medikamentu izvēle un devas ir balstītas uz iepriekš literatūrā aprakstītās metodoloģijas principiem (Baofeng et al., 2010; Meredith, 2015). Vispārējā anestēzijā (ketamīns 10% 30 mg/kg, ksilazīns 2% 3 mg/kg atropīns 0,1% 0,1 –

0,5 mg/kg tika veikta priekšējās sienas laparatomija un ovariectomija. Pēcoperācijas sāpju un iekaisuma mazināšanai trušiem zemādā tika ievadīts ketoprofēns ar devu 1–3 mg/kg reizi 24 stundās. Pēc brūces sadzīšanas un veselības stāvokļa normalizēšanās, vidēji pēc divām nedēļām, tika uzsākts 6 nedēļu kurss ar intramuskulārām metilprednizolona (1 mg/kg dienā) injekcijām. Trušiem tika atļauta brīva pārvietošanās, barība un ūdens pēc nepieciešamības.

1.3. Biomateriālu raksturojums

Pētījumā tika izmantoti nekomerciālie Rīgas Tehniskās universitātes Rūdolfa Cimdiņa Rīgas Biomateriālu inovācijas un attīstības centra izveidotie biomateriālu implantāti. Divfāziski un trīsfāziski *Sr* saturoši granulveida materiāli tika izgatavoti un to fāžu sastāvs noteikts, izmantojot metodikas, kas aprakstītas literatūrā (Grybauskas et al., 2015; Stipniece et al., 2016). Variējot ar sintēzes parametriem (temperatūra, sintēzes vides beigu pH un reaģentu koncentrācija), tika iegūtas kalcija deficīta hidroksilapatīta nogulsnes, kuras, formējot granulās un saķepinot 1150 °C temperatūrā, tika iegūtas keramiskas granulas ar izmēriem no 0,5 līdz 1 mm. Veicot rentgenstaru difrakcijas analīzi (*PANalytical X'Pert PRO*), nevienā no paraugiem citas kristāliskās fāzes netika identificētas. Analizējot granulu struktūru ar skenējošo elektronu mikroskopu (*FE-SEM, Mira/LMU, Tescan*), tika novērtēta granulu neregulāra forma ar šķautnēm. Aplūkojot paraugus lielākā palielinājumā, tika novērota poraina struktūra ar poru izmēru 200–500 nm un graudiem ar izmēru diapazonā no 400 nm līdz 1 μm. Būtiskas makrostrukturālas un mikrostrukturālas atšķirības starp dažāda sastāva paraugiem netika konstatētas.

1.4. Biomateriālu implantācija

Vispārējā anestēzija tika nodrošināta pēc iepriekš aprakstītās medikamentu shēmas (sk. 1.2. nodaļu). Augšstilba lielā grozītāja (*trochanter major*) rajonā tika atslāņoti mīkstie audi un periosts. Ar trepāna urbi 5 mm diametrā tika izveidots apaļš defekts augšstilbā. Defekts tika aizpildīts ar granulām vai atstāts tukšs atbilstoši pētījuma grupām, kuras minētas 1.1. tabulā.

1.5. Morfoloģiski izmeklējamais materiāls

Eitanāzija tika veikta 12 nedēļas pēc operācijas. Kaula paraugi tika iegūti no operētās un neoperētās kājas augšstilba kaula, lai izvērtētu lokālu un sistēmisku audu reakciju uz implantāciju vai operāciju. Adu paraugu iegūšanas laikā netika konstatētas gūžas locītavas skrimšļa makroskopiskās izmaiņas. Arī kontroles grupā audu paraugi tika iegūti no identiskas anatomiskās zonas.

Iegūtais audu materiāls tika fiksēts *Stefanini* šķīdumā. Adu paraugi tika uzglabāti ledusskapī (4 °C). Fiksējošā šķīdumā audi tika turēti ne mazāk kā 24 stundas. Pēc fiksācijas *Stefanini* šķīdumā kaula paraugi tika dekalcinēti ar “*Decalcifier Rapid*” (kods ITB RS 155800054, *I.T. Baker*, Holande) šķīdumu. Tālāk audi tika atūdeņoti, pielietojot etilspirtus, un attaukoti ksilola šķīdumā. Pēc tam sekoja audu ieguldināšana kasetēs ar parafīnu, veidojot parafīna blokus, no kuriem tika sagatavoti 3–5 µm biezi griezumumi ar mikrotomu (“*Leica*”, *RM2245 Leica Biosystems Richmond Inc., USA*) un uzklāti uz priekšmetstikliem turpmākai apstrādei un krāsošanai pēc hematoksilīna un eozīna metodes, kurai tika izmantoti priekšmetstikli “*Diapath*” (“*Diapath*”, Itālija), bet imūnhistoķīmiskai krāsošanai – “*Histobond*” (“*Marienfeld*”, Vācija) priekšmetstikli.

1.5.1. Rutīnās histoloģijas metode

Kaula materiāla morfoloģiskās ainas iegūšanai tika izmantota rutīnā krāsošanas metode ar hematoksilīnu un eozīnu (Fischer et al., 2008). Pirms krāsošanas audu griezumi tika deparafinizēti ortoksilola šķīdumā, dehidratēti 70° un 96° etilspirtā un skaloti destilētā ūdenī. Tālāk sekoja to krāsošana hematoksilīna šķīdumā (“*Mayers Hematoxylin*”, kods 05M06002, ražotājs “*Bio-Optica*”, Itālija) un eozīna šķīdumā (“*Eosin Y Alcoholic solution*”, kods 05B1003, ražotājs “*Bio-Optica*”, Itālija). Krāsošanai sekoja skalošana destilētā ūdenī, dehidratācija 70° un 96° etilspirtā un dzidrināšana karboksilola un ortoksilola šķīdumā. Pēc tam preparāts tika pārklāts ar polistirolu un pārsegts ar segstikliņu. Pēc šīs metodes šūnu kodoli iekrāsojās bazofīli – zili violetā krāsā, un šūnu citoplazma iekrāsojās acidofīli – rozā krāsā.

1.5.2. Imūnhistoķīmijas metode un reaģenti

Audu paraugu un griezumu sagatavošana uz priekšmetstikliņiem tika veikta pēc iepriekš aprakstītās shēmas (sk. 1.5. nodaļu). Imūnhistoķīmiskā analīze tika veikta, lietojot biotīna-streptavidīna metodi (Hsu, Raine & Fanger, 1981). Audu parafīna griezumi tika krāsoti pēc tālāk norādītā protokola. Sākotnēji tika veikta to deparafinizācija ksilola šķīdumā, skalošana spirtos un destilētā ūdenī. Tālāk tika veikta mazgāšana buferšķīdumā (“*TRIS buffer solution TWEEN20*”, kods T0083, ražotājs “*Diapath*”, Itālija) un vārīšana EDTA buferšķīdumā (kods TU103, ražotājs “*Diapath*”, Itālija). Paraugi tika atdzesēti, skaloti un apstrādāti ar 3% ūdeņraža peroksīdu 10 minūtes. Tad skaloti destilētā ūdenī un mazgāšanas buferšķīdumā. Fona krāsojuma mazināšana tika veikta ar normālu bloķēšanas serumu 20 minūtes (kods 9273-05, ražotājs “*Cell Marque*”, Amerikas Savienotās valstis). Tad sekoja paraugu 60 minūšu ilga apstrāde ar

primārām antivielām mitrā kamerā istabas temperatūrā (pielietotās antivielas skatīt 1. 2. tabulā).

1.2. tabula

Dati par imūnhistoķīmijā pielietotajām antivielām

Faktors	Avots	Kods	Darba atšķaidījums	Ražotājs un valsts
OPG	Trusis	Orb120312	1:100	<i>Biorbyt, ASV</i>
NFκB-105	Trusis	AB7971	1:100	<i>Abcam, Anglija</i>
OC	Trusis	Orb259644	1:100	<i>Biorbyt, ASV</i>
Col-1α	Trusis	Orb106535	1:100	<i>Biorbyt, ASV</i>
BMP-2/4	Kaza	AF355	1:100	<i>R&D systems, Anglija</i>
MMP-2	Trusis	AF902	1:100	<i>Biorbyt, ASV</i>
TIMP-2	Pele	Sc-21735	1:100	<i>Santa Cruz, ASV</i>
Il-1	Trusis	Orb308737	1:100	<i>Biorbyt, ASV</i>
Il-10	Trusis	P22301	1:100	<i>ABBIOTEC, LLC, ASV</i>

Apzīmējums: *OPG* – Osteoproteģerīns, *NFκB-105* – nukleārais faktors kapa beta-105, *OC* – osteokalcīns, *Col-1α* – kolagēns 1 alfa, *BMP-2/4* – kaula morfogēnais proteīns-2/4, *MMP-2* – matricas metaloproteināze-2, *TIMP-2* – matricas metālproteīnāzes-2 audu inhibitoris, *Il-1* – interleikīns-1, *Il-10* – interleikīns-10, ASV – Amerikas Savienotās Valstis.

Pēc tam audu paraugi tika skaloti 10 minūtes mazgāšanas buferšķīdumā un uz 30 minūtēm tika veikta inkubācija, izmantojot LSAB + LINK ar biotīnu saistītu sekundāro antivielu (kods K1015, ražotājs “*DakoCytomation*”, Dānija). Tālāk sekoja 5 minūšu skalošana mazgāšanas buferšķīdumā un paraugu apstrāde 25 minūtes, izmantojot LSAB + KIT ar enzīmu peroksidāzi saistītu streptavidīnu (kods K0690, ražotājs “*DakoCytomation*”, Dānija). Pēc tam atkal tika veikta paraugu skalošana buferšķīdumā un apstrāde ar DAB substrāta hromogēno sistēmu (kods K3468, ražotājs “*DakoCytomation*”, Dānija), panākot pozitīvo struktūru krāsojumu brūnā krāsā. Visbeidzot visi audu paraugi tika skaloti tekošā ūdenī un krāsoti 2 minūtes ar hematoksilīnu (“*Mayers Hematoxylin*”, kods 05M06002, ražotājs “*BioOptica*”, Itālija).

1.6. Datu apstrādes metodes

Kaulu mikropreparātu vizualizācijai tika izmantots gaismas mikroskops (*Leica DM500RB, Leica Biosystems Richmond Inc., ASV*) un fotogrāfijas tika veiktas ar digitālo kameru (*Leica DC 300F, Leica Microsystem AG, Vācija*).

Kaula apjoma noteikšana. Kaula apjoma noteikšanai tika izmantota *Image Pro Plus 7* programma, un mērīšana notika trīs vienādos ($0,975 \text{ mm}^2$) nejauši izvēlētos preparāta redzes laukos. Tika analizēts kaula trabekulārais un starptrabekulārais laukums, un, rēķinot to attiecību, tika iegūts osteoporozes indekss.

Puskvantitatīvā skaitīšanas metode. Imūnhistoķīmiski noteikto faktoru relatīvā daudzuma novērtēšanai tika izmantota puskvantitatīvā skaitīšanas metode (sk. 1.3. tab.) (Pilmane, Luts & Sundlers, 1995).

1.3. tabula

Puskvantitatīvās metodes apzīmējumi un skaidrojumi

Apzīmējums	Skaidrojums	Lietojums statistikā
0	Neviena pozitīva struktūra redzes laukā	0
0/+	Dažas pozitīvas struktūras redzes laukā	0,5
+	Maz pozitīvu struktūru redzes laukā	1
+ / ++	Maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā	1,5
++	Vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā	2
++ / +++	Vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru redzes laukā	2,5
+++	Daudz pozitīvu struktūru redzes laukā	3
+++ / ++++	Daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru redzes laukā	3,5
++++	Ļoti daudz pozitīvu struktūru redzes laukā	4

Datu apstrādes statistiskās metodes. Datu statistiskā apstrāde tika veikta, izmantojot *Statistical Package For Social Sciences IBM* (SPSS) 23. versiju (*IBM Corporations*, Amerikas Savienotās Valstis). Tika pielietots neparametrisko datu apstrādes Manna-Vitnija (*Mann-Whitney*) tests. Divu pazīmju korelācijas analīzei tika izmantots Spīrmena (*Spearman*) rangu korelācijas koeficients (r_s). Korelācijas ciešums tika klasificēts atbilstoši korelācijas koeficienta lielumam: ļoti vāja korelācija, ja $r_s < 0,19$; vāja korelācija, ja $r_s = 0,2-0,39$; vidēja korelācija, ja $r_s = 0,4-0,59$; cieša korelācija, ja $r_s = 0,6-0,79$, un ļoti cieša korelācija, ja $r_s = 0,8-1,0$. Rezultātus uzskatīja par statistiski nozīmīgiem, ja p vērtība bija $< 0,05$.

2. Rezultāti

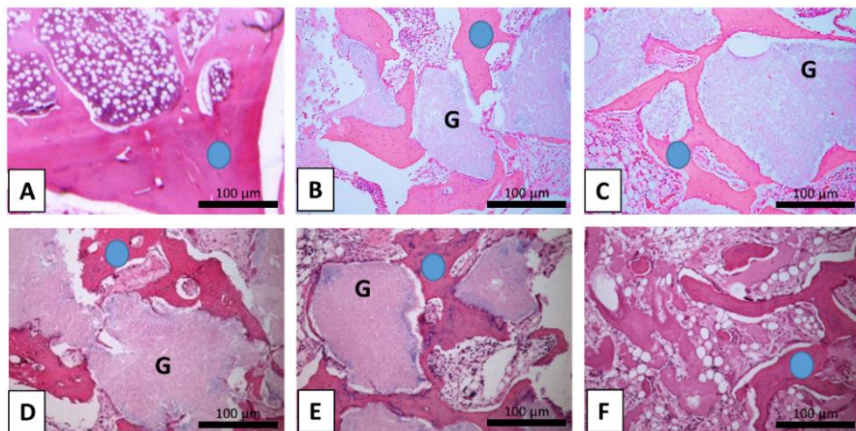
Pētījuma laikā tika konstatēta divu trušu nāve. Abi dzīvnieki nomira pētījuma otrajā fāzē – viens pēc *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* implantācijas, otrs no tukšās kontroles jeb *sham* audu grupas. Patologhistoloģiskās izmeklēšanas laikā netika konstatēts viscerālo orgānu bojājums un netika pierādīta sakarība starp operāciju un nāvi. Tādējādi kopumā tika analizēti audu paraugi no 44 dzīvniekiem.

2.1. Rutīnās morfoloģijas dati

Visos kontroles jeb A grupas audu pārskata griezumos no augšstilba kaula kakliņa rajona tika konstatēta vispārpieņemtai normai raksturīga truša histoloģiskā kaula uzbūve, ko veidoja kompaktā kaulviela ar osteonu kanāliem, kuros atradās asinsvadi, un porainā kaulviela ar izteiktām kaula trabekulām, osteocītiem un sarkanām kaula smadzenēm ar taukšūnām. (sk. 2.1. A att.).

Visiem eksperimenta dzīvniekiem tika konstatēta atšķirīga kaula uzbūve salīdzinājumā ar kontroles grupu. Kompaktās kaulvielas slānis bija plānāks un ar retākiem osteoniem, kuru kanālos novērojām izteiktāku saistaudu proli-ferāciju. Arī trabekulas bija ievērojami plānākas un retākas. Sarkanās kaula smadzenes saturēja ievērojami vairāk taukšūnu. Šādas audu pārmaiņas tika novērotas gan operēto, gan neoperēto kāju audu. Audu paraugos pēc biomateriālu pielietošanas tika konstatētas implantētās granulas, starp kurām atradās jaunizveidotais kauls, perēkļveida saistaudi, gigantšūnas un osteoklasti (sk. 2.1. B, C, D, E att.). Osteoklasti tika konstatēti tuvu implantētām granulām vairumā audu paraugu ar un bez *Sr* jonu klātbūtnes (sk. 2.2. att.). Osteoklastu klātbūtne *sham* grupas audos

netika novērota. Kopumā kaula reģenerācijas zonā tika novērota izteiktāka saistaudu klātbūtne un retākas taukšūnas (sk. 2.1. F att.).

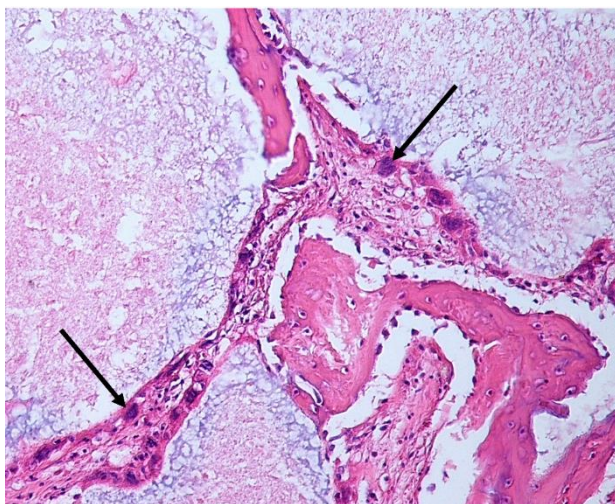


2.1. attēls. **Kaula struktūras vizuāls salīdzinājums starp veselo un operēto trušu kaulaudiem***

* A – kontroles trušu audos izteiktas kaula trabekulas; B – *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* audu paraugs; C – *HA₃₀/TCP₇₀* audu paraugs; D *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* audu paraugs; E – *HA₇₀/TCP₃₀* audu paraugs; F – *sham* audu paraugs. B, C, D, un E – plānas un retas kaula trabekulas, reti osteoni, izteiktāks saistaudu slānis. F – plānas un retas kaula trabekulas ar daudz taukšūnām. G – granulas; zils punkts – kaula trabekula; *H&E* krāsojums, palielinājums $\times 100$; skala 100 μm .

2.2. Kaula apjoma mērījumi

Kaula trabekulārais laukums kontroles grupas dzīvniekiem bija 0,393 mm², kas bija statistiski ticami lielāks nekā trušiem ar osteoporozi gan operētās, gan intaktās kājas kaulā. **Kaula starptrabekulārais laukums** kontroles grupas trušiem bija 0,582 mm², kas bija statistiski ticami mazāks nekā trušiem ar osteoporozi gan operētās, gan intaktās kājas audos (sk. 2.1. tab.). Statistiski ticamas atšķirības starp audu paraugiem pēc biomateriālu implantācijas, *sham* vai intaktās kājas audiem netika konstatētas.



2.2. attēls. Audu paraugs no truša *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* operētās kājas, kurā redzami osteoklasti (bultiņas) periimplantācijas zonā. *H&E*, × 100

2.1. tabula

Kaula trabekulārais un starptrabekulārais laukums osteoporotiskos trušos

Statuss	B		C		D
	<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>	<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>	<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>	<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>	<i>Sham</i>
Operētā kāja	^a 0,23	^e 0,23	0,21	0,22	0,24
	^b 0,74	0,75	0,76	0,75	0,74
Intaktā kāja	0,23	0,20	0,22	0,21	0,21
	0,75	0,84	0,76	0,76	0,79
	^c p = 0,001	p = 0,001	p = 0,001	p < 0,001	p = 0,005
	^d p = 0,001	p = 0,001	p = 0,001	p = 0,001	p < 0,001

Apzīmējums: *Sr* – stroncijs, *HA* – hidroksilapatīts, *TCP* – trikalcija fosfāts.

^a kaula trabekulārais laukums; ^b kaula starptrabekulārais laukums; ^c Statistiski nozīmīgs rezultāts kaula trabekulārā laukumā starp veseliem trušiem un trušiem ar osteoporozi operētā kājā; ^d Statistiski nozīmīgs rezultāts kaula starptrabekulārā laukumā starp veseliem trušiem un trušiem ar osteoporozi operētā kājā; ^e rezultāta mērvienība ir *mm*².

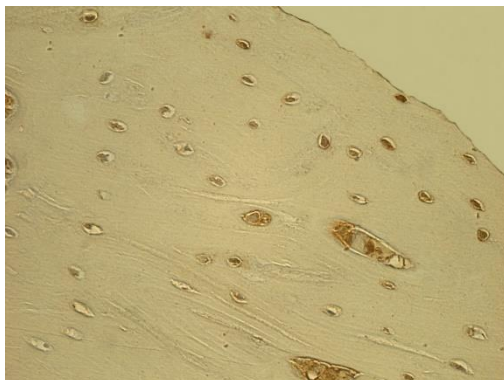
Osteoporozes indekss kontroles trušiem bija 68 %, kas bija statistiski ticami lielāks nekā osteoporotiskiem trušiem operētās kājas audos – *Sr-*

$HA_{30}/TCP_{70} - 32\%$ ($p = 0,005$), $HA_{30}/TCP_{70} - 30\%$ ($p = 0,001$), $Sr-HA_{70}/TCP_{30} - 27\%$ ($p = 0,001$), $HA_{70}/TCP_{30} - 30\%$ ($p = 0,001$) – vai *sham* audos – 33% ($p = 0,005$).

2.3. Kontroles un osteoporotisko dzīvnieku kaulā noteikto faktoru imūnhistoķīmiskais raksturojums

2.3.1. Kaula pamatvielas un mineralizācijas faktori

Kontroles jeb **A grupas** audos kopumā tika konstatēti maz līdz vidēji daudz (+/++) *Col-1 α* pozitīvi osteocīti (sk. 2.3. att.).



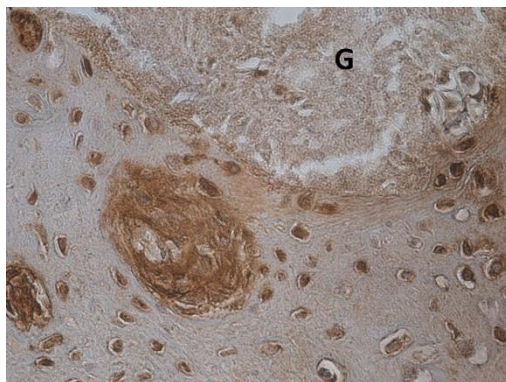
2.3. attēls. Vidēji daudz *Col-1 α* pozitīvi osteocīti kontroles truša augšstilba kaulā. *Col-1 α* IMH, $\times 400$

B grupas *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* operētās kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts daudz (+++) *Col-1 α* pozitīvu kaula šūnu. Neoperētās kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) *Col-1 α* pozitīvu osteocītu. Operētās kājas audos *Col-1 α* pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 7,50$; $p = 0,015$). Salīdzinājumā ar kontroles grupu *Col-1 α*

pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami vairāk** ($U = 0,50$; $p = 0,001$).

B grupas HA₃₀/TCP₇₀ operētās kājas audos vidēji tika konstatēts daudz (+++) *Col-1α* pozitīvu struktūru. **Neoperētās** kājas audos kopumā tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++/+++) *Col-1α* pozitīvu struktūru. **Statistiski ticama atšķirība** starp *Col-1α* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos **netika atrasta** ($U = 18,50$; $p = 0,405$). Salīdzinājumā ar kontroles grupu *Col-1α* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami vairāk** ($U = 0,50$; $p = 0,001$).

C grupas Sr-HA₇₀/TCP₃₀ operētās kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts daudz (+++) *Col-1α* pozitīvu kaula šūnu (sk. 2.4. att.). **Neoperētās** kājas audu paraugi kopumā saturēja maz līdz vidēji daudz (+/++) *Col-1α* pozitīvu šūnu. Operētās kājas audos *Col-1α* pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 4,00$; $p = 0,02$). Salīdzinājumā ar kontroles grupu *Col-1α* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami vairāk** ($U = 0,50$; $p = 0,001$).



2.4. attēls. Daudz *Col-1α* pozitīvu osteocītu truša Sr-HA₇₀/TCP₃₀ operētās kājas kaulā. G – granula. *Col-1α* IMH, $\times 400$

C grupas HA₇₀/TCP₃₀ operētās kājas audos vidēji tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++) Col-1α pozitīvu struktūru. **Neoperētās** kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) Col-1α pozitīvu šūnu. Operētās kājas audos Col-1α pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā (U = 5,00; p = 0,03). Salīdzinājumā ar kontroles grupu Col-1α pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami vairāk** (U = 0,50; p < 0,001).

D grupas sham operētās kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts daudz (+++) Col-1α pozitīvu struktūru. **Neoperētās** kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) Col-1α pozitīvu šūnu. Operētās kājas audos Col-1α pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā (U = 6,00; p = 0,044). Salīdzinājumā ar kontroles grupu Col-1α pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami vairāk** (U = 0,50; p = 0,001).

B, C un D grupu osteoporotisko dzīvnieku operēto kāju audos Col-1α pozitīvo šūnu daudzums **statistiski ticami neatšķirās**.

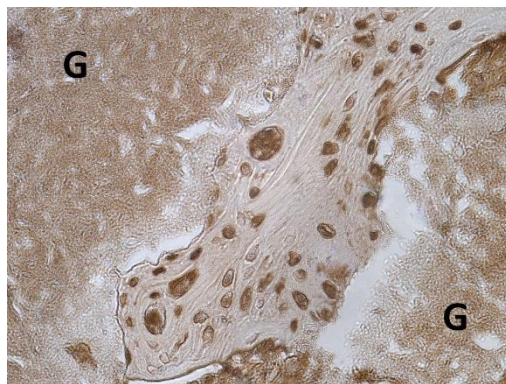
Kontroles jeb **A grupas** audos vidēji tika konstatēts daudz (+++) OC pozitīvu kaula šūnu.

B grupas Sr-HA₃₀/TCP₇₀ operētās kājas audu paraugos kopumā tika konstatēts daudz (+++) OC pozitīvu kaula šūnu. **Neoperētās** kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) OC pozitīvu šūnu. Operētās kājas audos OC pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā (U = 4,50; p = 0,005). **Statistiski ticama atšķirība** OC pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem **netika atrasta** (U = 25,50; p = 0,212).

B grupas HA₃₀/TCP₇₀ operētās kājas audos kopumā tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++) OC pozitīvu struktūru. **Neoperētās** kājas audos

kopumā tika novērotas vidēji daudz (++) OC pozitīvu šūnu. **Statistiski ticama atšķirība** starp kopējo OC pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos **netika atrasta** ($U = 12,00$; $p = 0,097$). **Statistiski ticama atšķirība** OC pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem arī **netika atrasta** ($U = 20,50$; $p = 0,079$).

C grupas *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas audu paraugos tika novērota lielākā OC ekspresija. Vidēji tika konstatēts daudz līdz ļoti daudz (+++/++++) OC pozitīvu kaula šūnu (sk. 2.5. att.). Krietni mazāk OC imūnpozitīvo struktūru tika novērots neoperētās kājas audos, kur kopumā bija maz līdz vidēji daudz (+/++) OC pozitīvu šūnu (sk. 2.6. att.). Operētās kājas audos OC pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 1,00$; $p = 0,006$). Salīdzinājumā ar kontroles grupu OC pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami vairāk** ($U = 10,50$; $p = 0,023$).

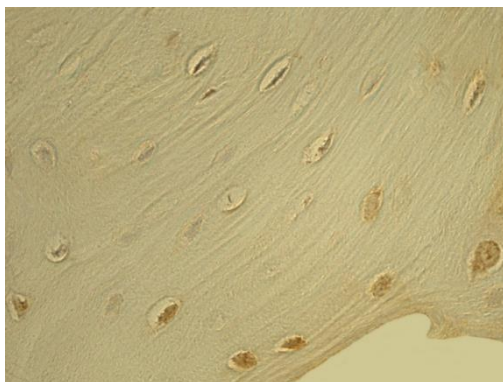


2.5. attēls. Daudz līdz ļoti daudz OC pozitīvu osteocītu truša *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas kaulā. G – granula. OC IMH, $\times 250$

C grupas *HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas audos vidēji tika konstatēts daudz (+++) OC pozitīvu struktūru. Neoperētās kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) OC pozitīvu šūnu. Operētās kājas audos OC pozitīvo struktūru

bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 2,50$; $p = 0,001$). **Statistiski ticama atšķirība** OC pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem **netika atrasta** ($U = 35,50$; $p = 0,613$).

D grupas sham operētās kājas audu paraugos kopumā tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++) OC pozitīvu struktūru. Neoperētās kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) OC pozitīvu šūnu. **Statistiski ticama atšķirība** starp OC pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos **netika atrasta** ($U = 9,00$; $p = 0,105$). Salīdzinājumā ar kontroles grupu OC pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami mazāk** ($U = 15,00$; $p = 0,047$).



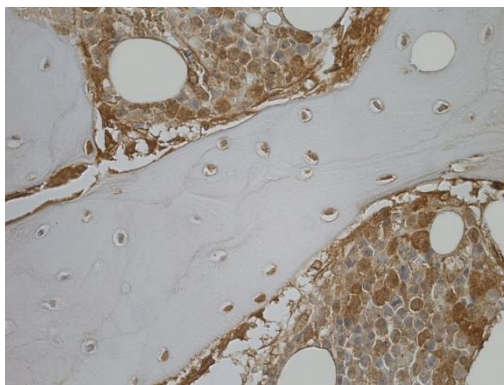
2.6. attēls. **Maz līdz vidēji daudz OC pozitīvu osteocītu truša**
***Sr-HA₇₀/TCP₃₀* neoperētās kājas kaulā. OC IMH, $\times 400$**

OC pozitīvas kaula šūnas audu paraugos pēc ***Sr-HA₇₀/TCP₃₀*** granulu implantācijas tika novērotas **statistiski ticami vairāk** nekā audu paraugos pēc ***Sr-HA₃₀/TCP₇₀*** ($U = 5,50$; $p = 0,022$), ***HA₃₀/TCP₇₀*** ($U = 4,50$; $p = 0,016$) granulu implantācijas un ***sham*** operācijas ($U = 3,00$; $p = 0,014$).

2.3.2. Kaula reģenerācijas un šūnu funkcionālās aktivitātes faktori

Kontroles jeb **A grupas** audos kopumā tika konstatēts maz līdz vidēji daudz (+/++) **BMP-2/4** pozitīvu kaula šūnu (sk. 2.7. att.).

B grupas *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* operētās kājas audu paraugos kopumā tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++) **BMP-2/4** pozitīvu kaula šūnu. Neoperētās kājas audu paraugi kopumā saturēja maz līdz vidēji daudz (+/++) **BMP-2/4** pozitīvu šūnu. Operētās kājas audos **BMP-2/4** pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 7,00$; $p = 0,021$). Salīdzinājumā ar kontroles grupu **BMP-2/4** pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami vairāk** ($U = 6,50$; $p = 0,004$).

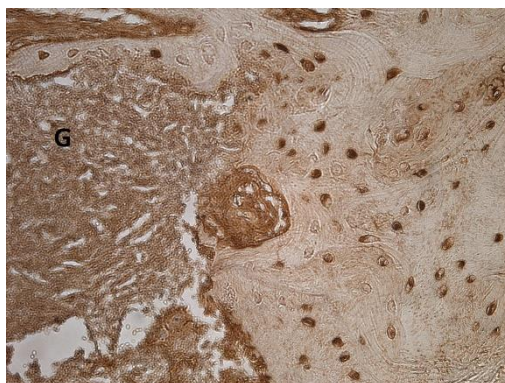


2.7. attēls. Maz līdz vidēji daudz **BMP-2/4** pozitīvu osteocītu kontroles truša augšstilba kaulā. **BMP-2/4 IMH**, $\times 250$

B grupas *HA₃₀/TCP₇₀* operētās kājas audos kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) **BMP-2/4** pozitīvu struktūru. Neoperētās kājas audos kopumā tika novērotas arī vidēji daudz (++) **BMP-2/4** pozitīvu šūnu. **Statistiski ticama atšķirība** starp kopējo **BMP-2/4** pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos **netika atrasta** ($U = 18,00$; $p = 0,295$). Salīdzinājumā ar

kontroles grupu *BMP-2/4* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami vairāk** ($U = 14,50$; $p = 0,031$).

C grupas *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas audu paraugos kopumā tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++/+++) *BMP-2/4* pozitīvu kaula šūnu (sk. 2.8. att.). Neoperētās kājas audos tika konstatētas tikai dažas (0/+) *BMP-2/4* pozitīvas šūnas. Operētās kājas audos *BMP-2/4* pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 3,50$; $p = 0,003$). Salīdzinājumā ar kontroles grupu *BMP-2/4* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami vairāk** ($U = 3,00$; $p = 0,002$).



2.8. attēls. Vidēji daudz līdz daudz *BMP-2/4* pozitīvu osteocītu truša *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas kaulā. G – granula. *BMP-2/4* IMH, $\times 250$

C grupas *HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas audos kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) *BMP-2/4* pozitīvu šūnu. Neoperētās kājas audos vidēji tika konstatētas dažas (0/+) *BMP-2/4* pozitīvas kaula šūnas. Operētās kājas audos *BMP-2/4* pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 1,00$; $p = 0,011$). Salīdzinājumā ar kontroles grupu *BMP-2/4* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami vairāk** ($U = 12,00$; $p = 0,009$).

D grupas *sham* operētās kājas audu paraugos kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) *BMP-2/4* pozitīvu struktūru. **Neoperētās** kājas audu paraugos kopumā atradām maz līdz vidēji daudz (+/++) *BMP-2/4* pozitīvu šūnu. **Statistiski ticama atšķirība** starp *BMP-2/4* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos **netika atrasta** ($U = 8,50$; $p = 0,088$). **Statistiski ticama atšķirība** *BMP-2/4* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem **netika atrasta** ($U = 13,50$; $p = 0,056$).

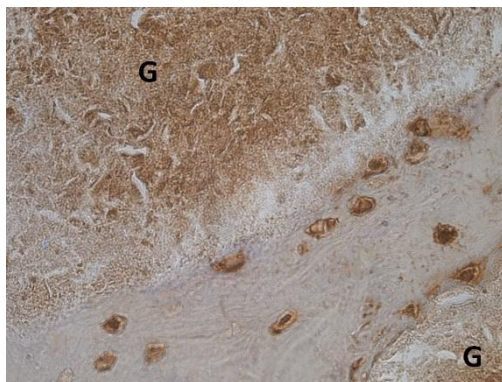
BMP-2/4 pozitīvas kaula šūnas audu paraugos pēc ***Sr-HA₇₀/TCP₃₀*** granulu implantācijas tika novērotas **statistiski ticami vairāk** nekā audu paraugos pēc *HA₃₀/TCP₇₀* granulu implantācijas ($U = 9,00$; $p = 0,035$) un *sham* operācijas ($U = 7,50$; $p = 0,043$).

Kontroles jeb **A grupas** audos kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) ***NFκB-105*** pozitīvu kaula šūnu.

B grupas *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* operētās kājas audu paraugos kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) ***NFκB-105*** pozitīvu kaula šūnu. **Neoperētās** kājas audu paraugi vidēji saturēja maz (+) ***NFκB-105*** pozitīvu šūnu. Operētās kājas audos ***NFκB-105*** pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 0,50$; $p = 0,001$). **Statistiski ticama atšķirība** ***NFκB-105*** pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem **netika atrasta** ($U = 34,00$; $p = 0,895$).

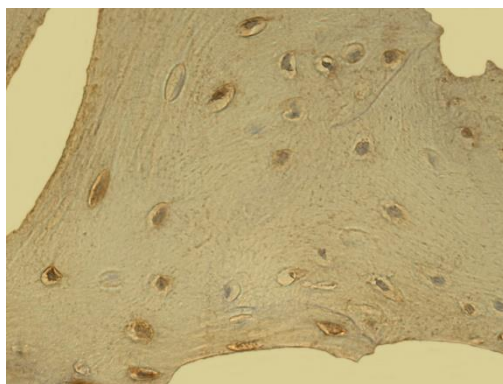
B grupas *HA₃₀/TCP₇₀* operētās kājas audos kopumā tika konstatēts maz līdz vidēji daudz (+/++) ***NFκB-105*** pozitīvu struktūru (sk. 2.9. att.). **Neoperētās** kājas audos vidēji tika novērotas maz (+) ***NFκB-105*** pozitīvu struktūru (sk. 2.10. att.). Operētās kājas audos ***NFκB-105*** pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 9,00$; $p = 0,03$). Salīdzinājumā ar kontroles grupu ***NFκB-105*** pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami mazāk** ($U = 9,50$; $P = 0,007$).

C grupas *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas audu paraugos tika novērota izteiktākā *NFκB-105* ekspresija. Vidēji tika konstatēts daudz (+++) *NFκB-105* pozitīvu kaula šūnu. **Neoperētās** kājas audos kopumā vērojām vidēji daudz (++) *NFκB-105* pozitīvu šūnu. Operētās kājas audos *NFκB-105* pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 3,00$; $p = 0,012$). Salīdzinājumā ar kontroles grupu, *NFκB-105* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami vairāk** ($U = 10,00$; $p = 0,016$).



2.9. attēls. **Maz līdz vidēji daudz *NFκB-105* pozitīvi osteocīti truša *HA₃₀/TCP₇₀* operētās kājas kaulā. G – granula. *NFκB-105* IMH, $\times 400$**

C grupas *HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas audos kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) *NFκB-105* pozitīvu struktūru. **Neoperētās** kājas audos kopumā vērojām maz līdz vidēji daudz (+/++) *NFκB-105* pozitīvu struktūru. Operētās kājas audos *NFκB-105* pozitīvu struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 10,00$; $p = 0,011$). **Statistiski ticama atšķirība *NFκB-105* pozitīvo struktūru skaitā** starp kontroles grupu un operētās kājas audiem **netika atrasta** ($U = 24,60$; $p = 0,10$).



2.10. attēls. **Maz *NFκB-105* pozitīvu osteocītu truša *HA₃₀/TCP₇₀* neoperētās kājas kaulā. *NFκB-105 IMH*, × 400**

D grupas *sham* operētās kājas audu paraugos kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) *NFκB-105* pozitīvu struktūru. Arī **neoperētās** kājas audu paraugos kopumā atradām vidēji daudz (++) *NFκB-105* pozitīvu kaula šūnu. **Statistiski ticama atšķirība** starp *NFκB-105* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos **netika atrasta** ($U = 16,50$; $p = 0,794$). **Statistiski ticama atšķirība** *NFκB-105* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem **netika atrasta** ($U = 18,50$; $p = 0,148$).

NFκB-105* pozitīvu kaula šūnu** audu paraugos pēc ***Sr-HA₃₀/TCP₇₀ granulu implantācijas tika novērotas statistiski ticami vairāk nekā audu paraugos pēc ***HA₃₀/TCP₇₀*** granulu implantācijas ($U = 6,00$; $p = 0,01$).

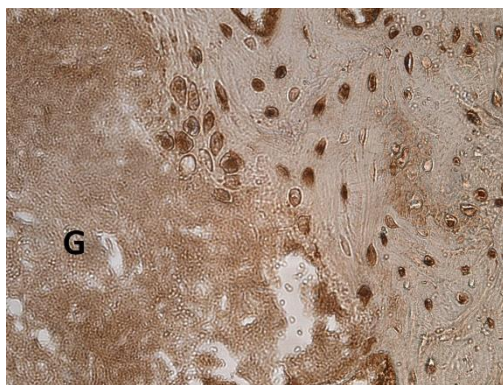
NFκB-105* pozitīvas kaula šūnas** audu paraugos pēc ***Sr-HA₇₀/TCP₃₀ granulu implantācijas tika novērotas statistiski ticami vairāk nekā audu paraugos pēc ***Sr-HA₃₀/TCP₇₀*** ($U = 6,00$; $p = 0,014$), ***HA₃₀/TCP₇₀*** ($U = 1,00$; $p = 0,003$) granulu implantācijas un ***sham* operācijas** ($U = 3,00$; $p = 0,012$).

NFκB-105* pozitīvas kaula šūnas** audu paraugos pēc ***HA₇₀/TCP₃₀ granulu implantācijas tika novērotas statistiski ticami vairāk nekā audu paraugos pēc

HA_{30}/TCP_{70} ($U = 2,50$; $p = 0,002$) granulu implantācijas un *sham* operācijas ($U = 7,50$; $p = 0,018$).

Kontroles jeb **A grupas** audos kopumā tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++) **OPG** pozitīvu kaula šūnu.

B grupas $Sr-HA_{30}/TCP_{70}$ operētās kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts daudz (+++) **OPG** pozitīvu kaula šūnu (sk. 2.11. att.). Neoperētās kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) **OPG** pozitīvu šūnu. Operētās kājas audos **OPG** pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 5,00$; $p = 0,007$). **Statistiski ticama atšķirība** **OPG** pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem **netika atrasta** ($U = 29,50$; $p = 0,561$).

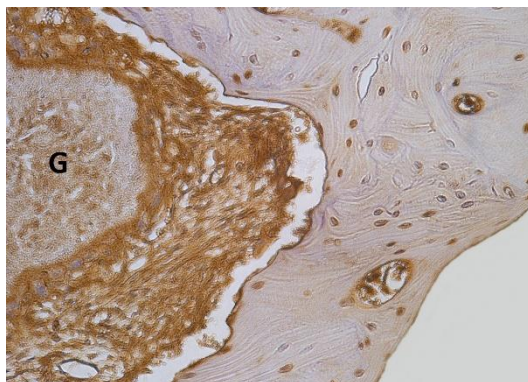


2.11. attēls. Daudz **OPG** pozitīvu osteocītu truša $Sr-HA_{30}/TCP_{70}$ operētās kājas kaulā. G – granula. **OPG IMH**, $\times 250$

B grupas HA_{30}/TCP_{70} operētās kājas audos kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) **OPG** pozitīvu struktūru (sk. 2.12. att.). Arī neoperētās kājas audos kopumā tika novērots vidēji daudz (++) **OPG** pozitīvu šūnu. **Statistiski ticama atšķirība** starp **OPG** pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas

audos **netika atrasta** ($U = 21,00$; $p = 0,60$). Salīdzinājumā ar kontroles grupu *OPG* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami mazāk** ($U = 14,50$; $p = 0,033$).

C grupas *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts daudz (+++) *OPG* pozitīvu kaula šūnu. Neoperētās kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) *OPG* pozitīvu šūnu. Operētās kājas audos *OPG* pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 3,00$; $p = 0,002$). **Statistiski ticama atšķirība** *OPG* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem arī **netika atrasta** ($U = 20,00$; $p = 0,232$).



2.12. attēls. Vidēji daudz *OPG* pozitīvu osteocītu truša *HA₃₀/TCP₇₀* operētās kājas kaulā. G – granula. *OPG IMH*, $\times 250$

C grupas *HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas audos kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) *OPG* pozitīvu šūnu. Neoperētās kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) *OPG* pozitīvu šūnu. Operētās kājas audos *OPG* pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 15,00$; $p = 0,029$). Salīdzinājumā ar kontroles grupu, *OPG* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami mazāk** ($U = 19,00$; $p = 0,049$).

D grupas sham operētās kājas audu paraugos kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) *OPG* pozitīvu šūnu. Neoperētās kājas audu paraugos kopumā arī atradām vidēji daudz (++) *OPG* pozitīvu šūnu. **Statistiski ticama atšķirība** starp kopējo *OPG* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos **netika atrasta** ($U = 15,00$; $p = 0,523$). Salīdzinājumā ar kontroles grupu *OPG* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami mazāk** ($U = 10,00$; $p = 0,018$).

OPG pozitīvas kaula šūnas audu paraugos pēc **Sr-*HA*₃₀/*TCP*₇₀** granulu implantācijas tika novērotas **statistiski ticami vairāk** nekā audu paraugos pēc *HA*₃₀/*TCP*₇₀ ($U = 9,50$; $p = 0,04$), *HA*₇₀/*TCP*₃₀ ($U = 13,00$; $p = 0,048$) granulu implantācijas un *sham* operācijas ($U = 6,00$; $p = 0,023$).

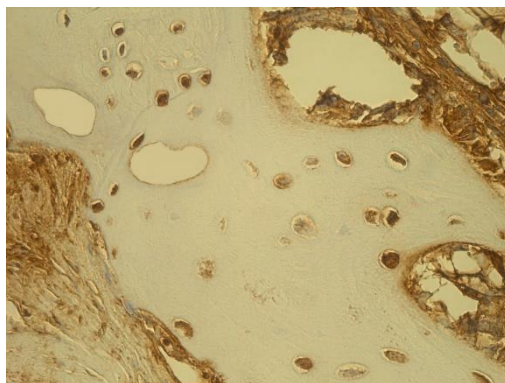
OPG pozitīvas kaula šūnas audu paraugos pēc **Sr-*HA*₇₀/*TCP*₃₀** granulu implantācijas tika novērotas **statistiski ticami vairāk** nekā audu paraugos pēc *HA*₃₀/*TCP*₇₀ ($U = 5,00$; $p = 0,015$), *HA*₇₀/*TCP*₃₀ granulu implantācijas ($U = 8,00$; $p = 0,025$) un *sham* operācijas ($U = 2,00$; $p = 0,007$).

2.3.3. Kaula deģenerācijas enzīmi un to nomācējfaktori

Kontroles jeb **A grupas** audos kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) ***MMP-2*** pozitīvu kaula šūnu.

B grupas Sr-*HA*₃₀/*TCP*₇₀ operētās kājas audu paraugos kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) ***MMP-2*** pozitīvu kaula šūnu (sk. 2.13. att.). Neoperētās kājas audu paraugi kopumā saturēja maz līdz vidēji daudz (+/++) ***MMP-2*** pozitīvu šūnu. **Statistiski ticama atšķirība** starp ***MMP-2*** pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos **netika atrasta** ($U = 15,50$; $p = 0,219$). **Statistiski ticama atšķirība** ***MMP-2*** pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem **netika atrasta** ($U = 27,50$; $p = 0,450$).

B grupas HA₃₀/TCP₇₀ operētās kājas audos kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) *MMP-2* pozitīvu struktūru. **Neoperētās** kājas audos kopumā tika novērots maz līdz vidēji daudz (+/++) *MMP-2* pozitīvu struktūru. Operētās kājas audos *MMP-2* pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 1,50$; $p = 0,002$). **Statistiski ticama atšķirība** *MMP-2* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem **netika atrasta** ($U = 34,00$; $p = 0,917$).



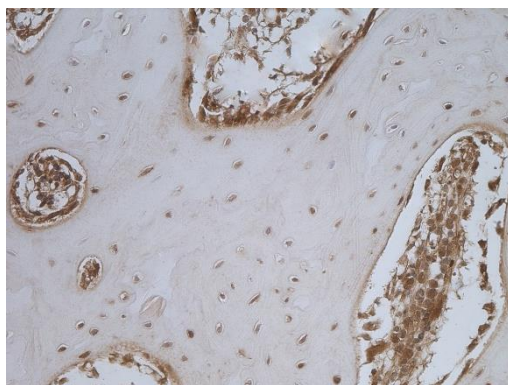
2.13. attēls. Vidēji daudz *MMP-2* pozitīvu osteocītu truša Sr-HA₃₀/TCP₇₀ operētās kājas kaulā. *MMP-2* IMH, $\times 400$

C grupas Sr-HA₇₀/TCP₃₀ operētās kājas audu paraugos kopumā tika atrastas vidēji daudz līdz daudz (++) *MMP-2* pozitīvu šūnu. **Neoperētās** kājas audos kopumā vērojām maz līdz vidēji daudz (+/++) *MMP-2* pozitīvu šūnu. Operētās kājas audos *MMP-2* pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 0,50$; $p = 0,004$). **Statistiski ticama atšķirība** *MMP-2* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem **netika atrasta** ($U = 14,00$; $p = 0,071$).

C grupas HA₇₀/TCP₃₀ operētās kājas audos kopumā tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++) *MMP-2* pozitīvu struktūru. **Neoperētās** kājas audos

kopumā vērojām vidēji daudz (++) *MMP-2* pozitīvu šūnu. Operētās kājas audos *MMP-2* pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 6,00$; $p = 0,004$). **Statistiski ticama atšķirība** *MMP-2* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem **netika atrasta** ($U = 22,50$; $p = 0,108$).

D grupas *sham* operētās kājas audu paraugos kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) *MMP-2* pozitīvu struktūru (sk. 2.14. att.). **Neoperētās** kājas audu paraugos kopumā atradām maz līdz vidēji daudz (+/++) *MMP-2* pozitīvu šūnu. **Statistiski ticama atšķirība** starp *MMP-2* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos **netika atrasta** ($U = 9,00$; $p = 0,145$). **Statistiski ticama atšķirība** *MMP-2* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem **netika atrasta** ($U = 23,50$; $p = 0,470$).



2.14. attēls. **Vidēji daudz *MMP-2* pozitīvu osteocītu *sham* truša operētās kājas kaulā. *MMP-2* IMH, $\times 200$**

MMP-2 pozitīvas kaula šūnas audu paraugos pēc *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* granulu implantācijas tika novērotas **statistiski ticami vairāk** nekā audu paraugos pēc *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* ($U = 6,50$; $p = 0,033$) un *HA₃₀/TCP₇₀* ($U = 7,50$; $p = 0,04$) granulu implantācijas.

MMP-2 pozitīvas kaula šūnas audu paraugos no operētās kājas pēc **HA₇₀/TCP₃₀** granulu implantācijas tika novērotas **statistiski ticami vairāk** nekā audu paraugos pēc **Sr-HA₃₀/TCP₇₀** (U = 10,50; p = 0,035) granulu implantācijas.

Kontroles jeb **A grupas** audos kopumā tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++/+++) **TIMP-2** pozitīvu kaula šūnu.

B grupas Sr-HA₃₀/TCP₇₀ operētās kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts daudz (+++) **TIMP-2** pozitīvu kaula šūnu. Neoperētās kājas audu paraugi vidēji saturēja arī daudz (+++) **TIMP-2** pozitīvu šūnu. **Statistiski ticama atšķirība** starp kopējo **TIMP-2** pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos **netika atrasta** (U = 16,50; p = 0,244). Salīdzinājumā ar kontroles grupu **TIMP-2** pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami vairāk** (U = 6,00; p = 0,002).

B grupas HA₃₀/TCP₇₀ operētās kājas audos vidēji tika konstatēts daudz (+++) **TIMP-2** pozitīvu struktūru. Neoperētās kājas audos kopumā tika novērots vidēji daudz līdz daudz (++/+++) **TIMP-2** pozitīvu šūnu. **Statistiski ticama atšķirība** starp **TIMP-2** pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos **netika atrasta** (U = 11,50; p = 0,062). Salīdzinājumā ar kontroles grupu **TIMP-2** pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami vairāk** (U = 7,00; p = 0,004).

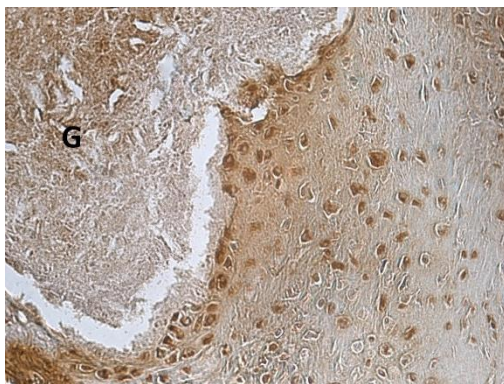
C grupas Sr-HA₇₀/TCP₃₀ operētās kājas audos vidēji tika konstatēts daudz (+++) **TIMP-2** pozitīvu kaula šūnu. Neoperētās kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) **TIMP-2** pozitīvu šūnu. Operētās kājas audos **TIMP-2** pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā (U = 1,50; p = 0,005). Salīdzinājumā ar kontroles grupu **TIMP-2** pozitīvo struktūru operētā kājā bija **statistiski ticami vairāk** (U = 3,00; p = 0,002).

C grupas HA₇₀/TCP₃₀ operētās kājas audos vidēji tika konstatēts daudz (+++) **TIMP-2** pozitīvu struktūru (sk. 2.15. att.). Neoperētās kājas audu paraugi

kopumā saturēja vidēji daudz (++) *TIMP-2* pozitīvu šūnu. Operētās kājas audos *TIMP-2* pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 1,50$; $p = 0,001$). Salīdzinājumā ar kontroles grupu *TIMP-2* pozitīvo struktūru operētā kājā bija **statistiski ticami mazāk** ($U = 9,00$; $p = 0,003$).

D grupas *sham* operētās kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts daudz (+++) *TIMP-2* pozitīvu struktūru (sk. 2.16. att.). Neoperētās kājas audu paraugos vidēji atradām arī daudz (+++) *TIMP-2* pozitīvu šūnu. **Statistiski ticama atšķirība** starp *TIMP-2* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos **netika atrasta** ($U = 15,50$; $p = 0,598$). Salīdzinājumā ar kontroles grupu *TIMP-2* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami vairāk** ($U = 7,00$; $p = 0,01$).

TIMP-2 klātbūtne visu osteoporotisko dzīvnieku operēto kāju audos bija līdzīga, un **statistiski nozīmīga atšķirība netika atrasta**.

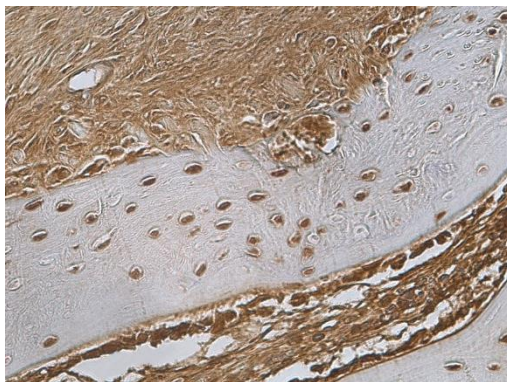


2.15. attēls. Daudz *TIMP-2* pozitīvu osteocītu truša *HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas kaulā. G – granula. *TIMP-2* IMH, $\times 200$

2.3.4. Kaula resorbcijas un lokālās imunitātes faktori

Kontroles jeb **A grupas** audos kopumā tika konstatētas dažas (0/+) ***Il-1*** pozitīvas kaula šūnas.

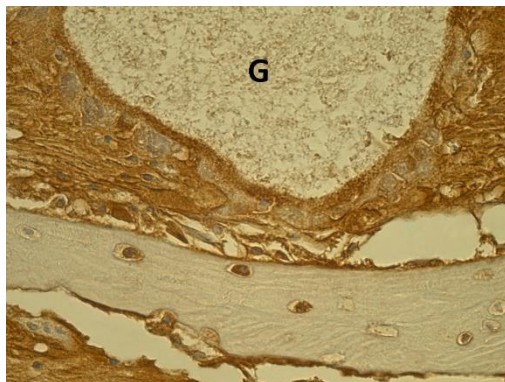
B grupas *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* operētās kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts maz (+) ***Il-1*** pozitīvu kaula šūnu (sk. 2.17. att.). ***Neoperētās*** kājas audu paraugi vidēji saturēja dažas (0/+) ***Il-1*** pozitīvas šūnas. Operētās kājas audos ***Il-1*** pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 7,50$; $p = 0,022$). Salīdzinājumā ar kontroles grupu ***Il-1*** pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami vairāk** ($U = 12,00$, $p = 0,016$).



2.16. attēls. Daudz ***TIMP-2*** pozitīvi osteocīti ***sham*** truša operētās kājas kaulā. ***TIMP-2 IMH***, $\times 250$

B grupas *HA₃₀/TCP₇₀* operētās kājas audos vidēji tika konstatēts maz (+) ***Il-1*** pozitīvu struktūru. ***Neoperētās*** kājas audos vidēji tika novērotas dažas (0/+) ***Il-1*** pozitīvas šūnas. **Statistiski ticama atšķirība** starp kopējo ***Il-1*** pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos **netika atrasta** ($U =$

11,00; $p = 0,071$). Salīdzinājumā ar kontroles grupu *Il-1* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami vairāk** ($U = 14,00$; $p = 0,032$).



2.17. attēls. **Maz *Il-1* pozitīvi osteocīti truša *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* operētās kājas kaulā. G – granula. *Il-1* IMH, $\times 400$**

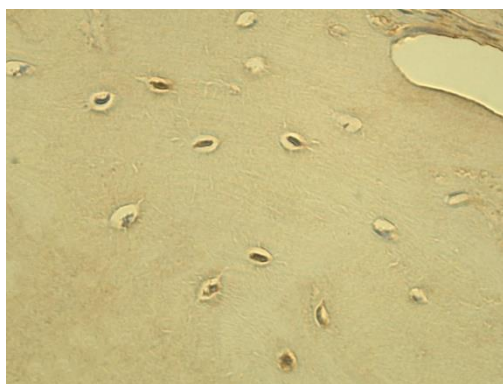
C grupas *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas audu paraugos kopumā tika konstatēts maz līdz vidēji daudz (+/++) *Il-1* pozitīvu kaula šūnu. Neoperētās kājas audos vērojām tikai dažas (0/+) *Il-1* pozitīvas šūnas. Operētās kājas audos *Il-1* pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 4,50$; $p = 0,024$). Salīdzinājumā ar kontroles grupu *Il-1* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami vairāk** ($U = 3,00$; $p = 0,002$).

C grupas *HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas audu paraugos kopumā tika novērots daudz (++) *Il-1* pozitīvu šūnu. Neoperētās kājas audu paraugi vidēji saturēja dažas (0/+) *Il-1* pozitīvas šūnas. Operētās kājas audos *Il-1* pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 1,50$; $p = 0,001$). Salīdzinājumā ar kontroles grupu *Il-1* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk ($U = 0,50$; $p < 0,001$).

D grupas *sham* operētās kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts maz (+) *Il-1* pozitīvu struktūru (sk. 2.18. att.). Neoperētās kājas audu paraugi vidēji

saturēja arī maz (+) *Il-1* pozitīvu šūnu. **Statistiski ticama atšķirība** starp *Il-1* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos **netika atrasta** ($U = 14,00$; $p = 0,498$). Salīdzinājumā ar kontroles grupu *Il-1* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami vairāk** ($U = 14,50$; $p = 0,023$).

Il-1 pozitīvas kaula šūnas audu paraugos pēc *HA₇₀/TCP₃₀* granulu implantācijas tika novērotas **statistiski ticami vairāk** nekā audu paraugos pēc *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* ($U = 8,50$; $p = 0,018$), *HA₃₀/TCP₇₀* ($U = 11,00$; $p = 0,037$) granulu implantācijas un *sham* operācijas ($U = 5,0$; $p = 0,008$).



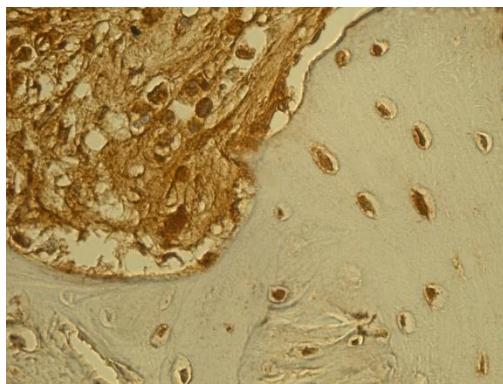
2.18. attēls. Maz *Il-1* pozitīvu osteocītu *sham* truša operētās kājas kaulā. *Il-1* IMH, $\times 400$

Kontroles jeb **A grupas** audos kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) *Il-10* pozitīvu kaula šūnu.

B grupas *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* operētās kājas audu paraugos kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) *Il-10* pozitīvu kaula šūnu (sk. 2.19. att.). Neoperētās kājas audu paraugi kopumā saturēja maz līdz vidēji daudz (+/++) *Il-10* pozitīvu šūnu. **Statistiski ticama atšķirība** starp kopējo *Il-10* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos **netika atrasta** ($U = 16,00$; $p = 0,267$). **Statistiski ticama atšķirība** *Il-10* pozitīvo struktūru

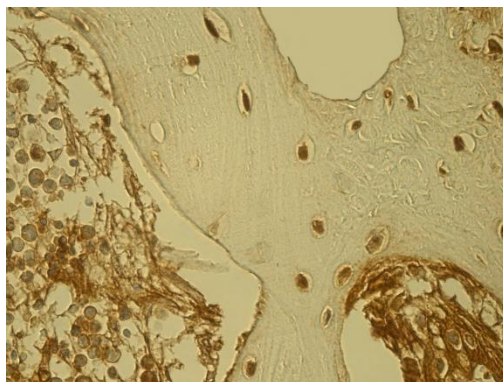
skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem netika atrasta ($U = 26,00$; $p = 0,355$).

B grupas *HA₃₀/TCP₇₀* operētās kājas audos kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) *Il-10* pozitīvu struktūru (sk. 2.20. att.). **Neoperētās** kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) *Il-10* pozitīvu šūnu. **Statistiski ticama atšķirība** starp kopējo *Il-10* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos **netika atrasta** ($U = 12,50$; $p = 0,089$). **Statistiski ticama atšķirība** *Il-10* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem **netika atrasta** ($U = 21,50$; $p = 0,161$).



2.19. attēls. Vidēji daudz *Il-10* pozitīvu osteocītu truša *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* operētās kājas kaulā. *Il-10 IMH*, $\times 400$

C grupas *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas audu paraugos kopumā tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++)/+++ *Il-10* pozitīvu kaula šūnu. **Neoperētās** kājas audu paraugi kopumā saturēja maz līdz vidēji daudz (+/++) *Il-10* pozitīvu šūnu. Operētās kājas audos *Il-10* pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 1,00$; $p = 0,005$). **Statistiski ticama atšķirība** *Il-10* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem **netika atrasta** ($U = 14,50$; $p = 0,076$).



2.20. attēls. Vidēji daudz *IL-10* pozitīvu osteocītu truša *HA₃₀/TCP₇₀* operētās kājas kaulā. *IL-10 IMH, × 400*

C grupas *HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas audos kopumā tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++) *IL-10* pozitīvu struktūru. Neoperētās kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) *IL-10* pozitīvu šūnu. Operētās kājas audos *IL-10* pozitīvo struktūru bija **statistiski nozīmīgi vairāk** nekā neoperētā kājā ($U = 10,00$; $p = 0,016$). Salīdzinājumā ar kontroles grupu *IL-10* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija **statistiski ticami vairāk** ($U = 16,00$; $p = 0,025$).

D grupas *sham* operētās kājas audu paraugos kopumā tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++) *IL-10* pozitīvu struktūru. Neoperētās kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) *IL-10* pozitīvu šūnu. **Statistiski ticama atšķirība** starp kopējo *IL-10* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos **netika atrasta** ($U = 9,50$; $p = 0,157$). **Statistiski ticama atšķirība** *IL-10* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem **netika atrasta** ($U = 14,50$; $p = 0,084$).

IL-10 klātbūtne visu osteoporotisko dzīvnieku operēto kāju audos bija līdzīga, un **statistiski nozīmīga atšķirība netika atrasta**.

2.4. Imūnhistoķīmiski noteikto faktoru savstarpējās korelācijas dati

Statistiski nozīmīgas korelācijas ir norādītas 2.2. tabulā. No analizētajiem parametriem vienīgi audu paraugi pēc *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* granulu implantācijas neuzrādīja statistiski ticamas savstarpējās korelācijas.

2.2. tabula

Imūnhistoķīmiski noteikto faktoru statistiski nozīmīgas pozitīvas korelācijas

Grupas	Faktori	Korelācija	Koeficients	p vērtība
A grupa				
Kontroles	<i>BMP-2/4</i> un <i>Col-1α</i>	ĻCP	$r_s = 0,829$	$p = 0,003$
	<i>OC</i> un <i>BMP 2/4</i>	CP	$r_s = 0,634$	$p = 0,049$
	<i>MMP-2</i> un <i>Il-10</i>	CP	$r_s = 0,650$	$p = 0,042$
	<i>KTL</i> un <i>NFκB-105</i>	CP	$r_s = 0,657$	$p = 0,039$
B grupa				
Sr- HA₃₀/TCP₇₀	<i>NFκB-105</i> un <i>Col-1α</i>	CP	$r_s = 0,734$	$p = 0,046$
	<i>KTL</i> un <i>Col-1α</i>	ĻCP	$r_s = 0,809$	$p = 0,028$
HA₃₀/TCP₇₀	<i>OC</i> un <i>NFκB-105</i>	ĻCP	$r_s = 0,833$	$p = 0,020$
	<i>OC</i> un <i>Il-1</i>	CP	$r_s = 0,772$	$p = 0,042$
	<i>NFκB-105</i> un <i>Il-1</i>	ĻCP	$r_s = 0,814$	$p = 0,026$
	<i>Col-1α</i> un <i>Il-1</i>	ĻCP	$r_s = 0,814$	$p = 0,026$
	<i>NFκB-105</i> un <i>Col-1α</i>	CP	$r_s = 0,767$	$p = 0,044$
C grupa				
Sr- HA₇₀/TCP₃₀	-	-	-	-
HA₇₀/TCP₃₀	<i>OC</i> un <i>MMP-2</i>	CP	$r_s = 0,736$	$p = 0,037$
D grupa				
Sham	<i>NFκB-105</i> un <i>MMP-2</i>	ĻCP	$r_s = 0,939$	$p = 0,005$
	<i>NFκB-105</i> un <i>IL-1</i>	ĻCP	$r_s = 0,833$	$p = 0,039$

Apzīmējums: *Sr* – stroncijs, *HA* – hidroksilapatīts, *TCP* – trikalcijs fosfāts.

KTL – kaula trabekulārais laukums, *CP* – cieša pozitīva korelācija, *ĻCP* – ļoti cieša pozitīva korelācija.

3. Diskusija

Arvien vairāk tiek pētīti dažādi kaulu aizvietojošie materiāli, īpaši tādi, kam pievienotas bioloģiski aktīvas vielas. To ietekmē tiek ierosināta intensīvāka kaula remodelācija un jaunas kaulvielas veidošanās. Pēdējā desmitgadē plaši pētīta *Sr* ietekme uz kaula reģenerāciju, izmantojot to dažādu biomateriālu sastāvā. Tas notiek, ņemot vērā *Sr* spēju stimulēt preosteoblastisko šūnu proliferāciju un jaunas kaulvielas veidošanos, vienlaikus inhibējot osteoklastoģenēzi un kaula resorbciju (Xie et al., 2018). Tomēr nav daudz tādu pētījumu, kur eksperimenta dzīvniekiem ar osteoporozi tiek veikta *Sr* saturošu biomateriālu implantācija. Turklāt bieži vien analizēti audu paraugi tikai no divām vai trīs eksperimenta dzīvnieku grupām.

Savukārt mūsu pētījumā audu paraugi tika analizēti no 11 dažādām grupām – divfāziski kalcija fosfāta (*HA* un *TCP*) keramikas biomateriāli dažādās masas attiecībās ar un bez *Sr* jonu klātbūtnes tika implantēti trušu mātītēm ar osteoporozi un salīdzināti ar veselu trušu audu paraugiem, tukšās kontroles jeb *sham* audu paraugiem, kā arī audu paraugiem no neoperētās kājas kaula. Mūsu pētījumā tika izvērtēti *OPG*, *OC*, *NFκB-105*, *BMP-2/4*, *Col-1α*, *MMP-2*, *TIMP-2*, *Il-1* un *Il-10* imūnpozitīvo šūnu relatīvais daudzums osteoporotisku un veselu trušu augšstilba kaulā. Analizēto faktoru kopums ir salīdzinoši lielāks nekā literatūrā pieejamos pētījumos par šo tēmu, kur pārsvarā analizēti tikai daži faktori, kuri regulē kaula reģenerāciju. Jāatzīmē, ka zinātniskie raksti par *Sr* saturošu biomateriālu implantāciju osteoporotiskiem trušiem atrodami ļoti maz, tāpēc mūsu pētījuma rezultāti tiek salīdzināti ar citu autoru darbiem, kuros izmantoti veseli truši ar *Sr* saturošu biomateriālu implantāciju vai citu sugu osteoporotiski dzīvnieki. 2017. gadā *Neves et al.*, publicēja literatūras apskatu, kurā tika analizēti 27 pētījumi ar dzīvniekiem, kuriem tika implantēti *Sr* saturoši biomateriāli. Apskatā tika iekļauti tikai tie pētījumi, kur bija salīdzinātas vismaz

divas dzīvnieku grupas (Neves et al., 2017). Analizētie pētījumi atšķīrās viens no otra ar dzīvnieku modeli, biomateriāla veidu un analizētiem parametriem, un tikai deviņi pētījumi bija veikti ar trušiem, bet nevienā netika izmantots osteoporozes modelis.

Mūsu pētījumā, analizējot audu paraugus 12 nedēļas pēc operācijas, kaula trabekulārais laukums veseliem trušiem vidēji bija $0,39 \text{ mm}^2$, savukārt osteoporotiskajiem trušiem tas variēja no $0,206 \text{ mm}^2$ līdz $0,242 \text{ mm}^2$, kas bija statistiski ticami mazāk. Iegūtie dati liecina par stabili ierosinātu osteoporozi visiem eksperimenta dzīvniekiem, ko apstiprināja kaula morfoloģiskās uzbūves īpatnības ar plānāku kompakto un poraino kaulvielu nekā veseliem trušiem, kas sakrīt ar citu autoru darbiem (Sadiq, Alfari & Allasadi, 2016). Kaula trabekulārais laukums bija līdzīgs visiem osteoporotiskiem dzīvniekiem pēc biomateriāla implantācijas vai *sham* operācijas un statistiski ticama atšķirība netika novērota.

Vairums autoru savos pētījumos demonstrē lielāku jaunā kaula veidošanās apjomu pēc *Sr* saturošu biomateriālu implantācijas dažādiem dzīvniekiem, salīdzinot ar kontroles grupas audiem bez *Sr* klātbūtnes. Tomēr šāda atradne vērojama veseliem dzīvniekiem bez osteoporozes vai citiem kaula patoloģiskiem stāvokļiem (Tian et al, 2009; Xie et al., 2012; Tarafder et al., 2013; Zhang et al., 2013; Kang et al., 2015). Interesanti, ka *Baier et al.* savā pētījumā ar osteoporotiskām žurkām konstatēja līdzīgu jaunā kaula apjomu 12 nedēļas pēc biomateriālu implantācijas ar vai bez *Sr* jonu klātbūtnes, kas sakrīt ar mūsu pētījuma atradni. Taču, analizējot audu paraugus pēc 24 nedēļām, jaunā kaula veidošanās apjoms bija lielāks tieši *Sr* implantu grupā (Baier et al., 2013). Savukārt *Lin et al.*, pētot *Sr* un titāna saturošu biomateriālu ietekmi uz osteoporotisku trušu apakšējās ekstremitātes kauliem, konstatēja, ka 3 nedēļas pēc operācijas kaula laukums bija statistiski ticami lielāks *Sr* saturošu biomateriālu grupā, bet jau 6 nedēļu laikā kaula laukums bija līdzīgs abās audu

grupās (Lin et al., 2019). To papildina *Ni et al.* pētījumā iegūtie rezultāti, kad veselām kazām tika veikta gūžas locītavas artroplastika, izmantojot *Sr* saturošu *HA* kaula cementu. Operētos dzīvniekus novēroja 9 mēnešus pēc implantācijas, kas ir lielākais novērošanas laiks, analizējot *Sr* saturošu biomateriālu ietekmi uz dzīvnieku kaulaudiem. Darbā tika konstatēts, ka *Sr* klātbūtnē bija ievērojami lielāks jaunā kaula apjoms, labāks kontakts starp implantu un augšstilba kaulu, un lielāka mehāniskā stabilitāte, bet fibrozo audu kapsula netika novērota (Ni et al., 2006). Mūsu iegūtie dati, apvienojot tos ar citu autoru publicētiem rezultātiem, liecina, ka *Sr* ierosinātā jaunās kaulvielas veidošanās pakāpe ir atkarīga no laika perioda pēc implantācijas. Proti, ievērojams jaunā kaula veidošanās apjoms vērojams pirmo nedēļu laikā, tad tas lēnām sāk samazināties, un 6–12 nedēļu laikā nav novērojamas atšķirības, salīdzinot to ar biomateriāliem bez *Sr*. Taču atkārtoti osteoģenēzes efektivitāte osteoporo-tiskiem dzīvniekiem palielinās 24 nedēļu laikā pēc *Sr* saturošu biomateriālu implantācijas. To varētu skaidrot, ka osteoporoze būtiski ietekmē jaunā kaula veidošanās apjomu, kas ir atkarīgs no organisma reakcijas uz biomateriālu, biomateriālu degradācijas un *Sr* jonu izdalīšanās apjomu dažādos laika periodos, izmainot osteoģenēzes potenciālu anabolo procesu virzienā. Osteoporozes gadījumā būtu nepieciešams vēl ilgāks eksperimenta novērošanas laiks un audu paraugu analīze dažādos laika periodos, kas, acīmredzot, cieši sasaistās ar biomateriāla spēju ierosināt kaulaudu reģenerāciju.

Vairumā audu paraugu ap implantētām granulām tika konstatēti liela izmēra osteoklasti. Mūsu atradne sakrīt ar citu autoru darbiem par *Sr* saturošu biomateriālu implantāciju (Cardemil et al., 2013; Kaygil et al., 2015). Arī liela izmēra osteoklastu klātbūtne vērojama *Zhu et al.* darbā, kur tika pētīti ar *Sr* bagātināti hidroksilapatīta biomateriāli. Lielāks to skaits bija vērojams zonā starp granulām un jauno kaulu. Atradne bija pozitīva arī audu paraugos bez *Sr* (Zhu et al., 2016). Lai arī literatūrā ir pretrunīgi dati par osteoklastu nozīmi peri-implanta

zonā, jādoma, ka šī atradne liecina arī par osteoklastu nozīmi vēlīnā biomateriālu noārdīšanās procesā, papildu tā kaula resorbcijas funkcijai.

Kolagēns 1 alfa (*Col-1α*) ir lielākais ekstracelulārās matricē proteīns, kuru izdala osteoblasti, un tā klātbūtne liecina par agrīnām mineralizācijas pazīmēm jaunas kaulvielas veidošanās procesā (Ferreira et al., 2012; Nair et al., 2013). Mūsu pētījuma kontroles grupā tika konstatēts maz līdz vidēji daudz *Col-1α* pozitīvu struktūru, kas bija statistiski ticami mazāk nekā operēto trušu audu paraugos, kur lielākoties tika atrastas daudz *Col-1α* pozitīvu kaula šūnu, bet neoperēto kāju audos – vidēji daudz. Ir pierādījumi, ka osteoporozes gadījumā ir lielāks kaula remodelācijas ātrums, un tas veicina lielāku kolagēna sintēzi, taču ar samazinātu tā kvalitāti, jo izveidotās fibrillas ir mazāka diametra un ar vājākām savstarpējām saitēm (Viguet-Carrin, Garnero & Delmas, 2006). Šādam apgalvojumam varam piekrist tikai daļēji, jo, salīdzinot *Col-1α* pozitīvo struktūru skaitu kontroles grupā un osteoporotisko trušu neoperētās kājas audos, statistiska ticama atšķirība netika iegūta, un pozitīvo šūnu daudzums bija līdzīgs. Tieši pretēji, atklājām, ka neatkarīgi no biomateriāla veida vai *sham* operācijas ievērojami palielinās kolagēna ekspresija. Statistiski nozīmīga atšķirība starp biomateriāliem un *sham* operāciju netika konstatēta. Citu autoru darbos tika novērots, ka *Sr* klātbūtne kalcija polifosfāta biomateriāla sastāvā spēj palielināt *Col-1α* ekspresiju salīdzinājumā ar tīru biomateriālu. Tomēr šī atradne novērota veselu trušu kaulaudos (Tian et al., 2009). Tas liecina, ka operācija pati par sevi ierosina lielāku kolagēna ekspresiju un kaulaudu reģenerācijas pazīmes arī osteoporotiskā kaulā. To apstiprina informācija literatūrā, kurā pierādīts, ka kolagēna klātbūtne spēj palielināt osteoblastu aktivitāti un osteogēnēzi (Nair et al., 2013). Ferreira et al. izteica pat pieņēmumu, ka ar dažādu biomateriālu palīdzību būtu iespējams veikt modifikācijas kolagēna struktūrā tā sintēzes laikā un uzlabot kaula reģenerāciju (Ferreira et al., 2012). Tomēr līdz šim literatūrā nav atrodami raksti par *Sr* tiešu ietekmi uz kolagēna veidošanās procesiem.

Mūsu darbā kontroles grupā tika novērota ļoti stipra pozitīva korelācija starp *Col-1α* un *BMP-2/4*, kas liecina par abu faktoru mijiedarbību jaunas kaulvielas veidošanās procesā. Tas ir tāpēc, ka kaula morfogēnie proteīni spēj ierosināt intracelulāro signālu pārvadi mezenhimālās cilmes šūnās, tādējādi regulējot to diferenciāciju par osteoblastiem ar tai sekojošu jauna kaula matricē veidošanos un kolagēna sintēzi (Jing et al., 2016). Savukārt *HA₃₀/TCP₇₀* audu paraugos konstatējām ļoti stipru pozitīvu korelāciju starp *Col-1α* un *Il-1*. Tiek uzskatīts, ka tieši *Il-1* ir viens no nozīmīgākajiem iekaisuma citokīniem, kurš ierosina osteoklastu diferenciāciju un tai sekojošu kaula resorbciju. Pretēju *Il-1* darbības mehānismu apraksta Lange et al., norādot, ka *Il-1* atkarībā no organisma vajadzībām un stāvokļa, spēj stimulēt osteoblastogēni (Lange et al., 2010). Tas varētu liecināt par to, ka kaula reģenerācijas gadījumā *Il-1* regulē arī osteoblastu aktivitāti, kas savukārt ietekmē kolagēna sintēzi.

Kontroles grupas audos tika konstatēts daudz **osteokalcīnu (OC)** saturošu kaula šūnu, kas bija statistiski ticami vairāk salīdzinājumā tikai ar *sham* grupas audiem. Iegūtie dati liecina, ka veselā truša kaulā ir augsta mineralizācijas procesa noteicošā faktora klātbūtne, kura ekspresiju ietekmē ne tikai operācijas rezultātā ierosinātā kaula reģenerācijas atbilde, jo, pielietojot biomateriālus, OC saturošo šūnu skaits bija līdzīgs vai pat lielāks. Daudz līdz ļoti daudz OC pozitīvu kaula šūnu tika konstatēts pēc *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* granulu implantācijas, kas bija statistiski ticami vairāk nekā kontroles audos vai pēc *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* un *HA₃₀/TCP₇₀*, vai *sham* operācijas. Audu paraugos pēc *Sr-HA₇₀/TCP₃₀*, *HA₇₀/TCP₃₀* un *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* implantācijas konstatējām nozīmīgi vairāk OC pozitīvu struktūru nekā neoperētās kājas audos. *Sham* audu paraugos šāda atradne netika konstatēta, un OC ekspresija abās kājās bija samērā stabila un vienlīdzīga. No tā secināms, ka biomateriālu klātbūtne uzlabo OC ekspresiju osteoporotiskā kaulā. *Sr* unikālo īpašību dēļ tam ir loma arī kaula

mineralizācijas procesos, īpaši tas ir pierādīts skeleta attīstības laikā (Pasqualetti, Panfi & Mariotti, 2012). Mūsu atradne daļēji sakrīt ar citu autoru darbiem, kur osteoporotiskas žurkas augšstilba kaulā lielāka OC ekspresija tika konstatēta pēc Sr saturoša kalcija polifosfāta keramikas implantācijas salīdzinājumā ar tīru biomateriālu (Thormann et al., 2013). Savukārt *Tarafder et al.* veselu trušu augšstilba kaulā pēc Sr saturoša trikalcija fosfāta granulu implantācijas novēroja lielāku OC ekspresiju nekā pēc *sham* operācijas (Tarafder et al., 2013).

Interesantus rezultātus prezentēja *Wornham et al.*, norādot, ka viena paša tīra Sr lietošana izsauc pretējus efektus, respektīvi, nomāc osteoblastu proliferāciju un kaula mineralizācijas procesus. Šie efekti tika novēroti *in vitro* pētījumā, kad Sr sāļi tika pievienoti žurkas kalvārijā kaula osteoblastu un osteoklastu šūnu kultūrām (Wornham et al., 2014). Sr pozitīvie efekti novērojami tad, ja tas ir savienojumā ar Ca saturošu biomateriālu, jo osteoblastoģenēze notiek, Sr iedarbojoties caur Ca jutīgiem receptoriem (Chattopadhyay et al., 2007). Līdz ar to pastāv pieņēmums, ka Sr darbība ir atkarīga no Ca koncentrācijas biomateriālu sastāvā. To savā pētījumā pierādīja *Xie et al.*, kurā gan *in vivo*, gan *in vitro* eksperimentos novēroja nozīmīgāku Sr anabolo efektu un osteoblastu aktivitāti tieši pie lielākām Ca jonu koncentrācijām. Šī atradne tika novērota pētījumā veseliem trušiem, kuriem tika implantēti Sr saturošas CPC biomateriāli (Xie et al., 2018). Vislabāko rezultātu mūsu darbā uzrādīja tieši audu paraugi pēc Sr-HA₇₀/TCP₃₀ implantācijas. Mūsu iegūtos datus pamato tas, ka lielāka HA koncentrācija nodrošina lēnāku biomateriāla šķīdību, lielāku afinitāti un koncentrāciju Ca joniem, kas nepieciešami Sr pozitīvo efektu ierosināšanai arī osteoporotiskā trušu kaulā. Jādomā, ka tas ir iespējams lielās HA koncentrācijas dēļ un ka OC ir liela afinitāte pret HA, tādējādi nodrošinot Ca jonu piesaisti un mineralizāciju (Rodrigues et al., 2012).

Kontroles grupas audos stipra pozitīva korelācija tika novērota starp OC un BMP-2/4. To apstiprina arī citu autoru darbi, kur pēc dažādu Sr saturošu

biomateriālu implantācijas palielinās gan OC, gan BMP-2/4 ekspresija (Andersen et al., 2013; Lin et al., 2013; Jing et al., 2016). Tas izskaidrojams ar to, ka kaula morfogēno proteīnu klātbūtnē notiek jaunas kaulvielas veidošanās, kura savukārt, remodelācijai turpinoties, sāk mineralizācijas procesu. Turpretī audu grupā pēc HA₃₀/TCP₇₀ granulu implantācijas ļoti stipra pozitīva korelācija tika atrasta starp OC un NFκB-105 un stipra pozitīva korelācija starp OC un Il-1. Zināms, ka NFκB-105 ierosina signālu pārvadi, lai notiku osteoklastu diferenciācija, bet Il-1 ierosina osteoklastus uzsākt kaula resorbciju (Paiva & Granjeiro, 2017). Šāda korelācija varētu būt skaidrojama ar nepārtraukto kaula remodelācijas procesu, kad osteoblastu izdalītais OC veicina kaula mineralizāciju, savukārt kaula mineralizācijas process, tā nobeiguma fāzē jau ierosina turpmāko osteoklastu medītoto kaula resorbciju nākošā kaula zonā. Pretrunīgi dati uzrādīti Neve et al. pētījumā, kur autori atklāja, ka Il-1 spēj nomākt OC sintēzi (Neve, Corrado & Cantatore, 2011). Lai arī osteoblasti OC izdala kaula veidošanās procesā, literatūrā ir aprakstīts, ka OC veicina arī osteoklastu prekursoru diferenciāciju un osteoklastu medītoto kaula resorbciju (Patti et al., 2013). To pamato citu autoru darbi, kuros novērota pavājināta osteoklastu darbība un samazināta kaula resorbcijas funkcija zonās, kur nav atrodamā OC klātbūtne (Booth et al., 2013).

Nukleārais faktors kappa beta-105 (NFκB-105) ir nozīmīgs transkripcijas faktors, īpaši osteoporozes gadījumā, jo tas piedalās RANK/RANKL ierosinātās osteoklastoģenēzes regulēšanā un norāda uz kaula šūnu aktivitāti (Abu-Amer, 2013). Mūsu pētījumā kontroles grupā novērojām vidēji daudz NFκB-105 pozitīvu šūnu. To skaits statistiski ticami bija lielāks nekā HA₃₀/TCP₇₀ audos un statistiski ticami mazāks nekā osteoporotisku trušu kaulos pēc Sr-HA₇₀/TCP₃₀ biomateriāla implantācijas, bet, salīdzinot ar pārējo grupu audiem, to skaits bija samērā līdzīgs. Arī neoperēto kāju audos tika konstatēts gan maz, gan vidēji daudz NFκB-105 saturošu kaula šūnu. Iegūtie dati liecina, ka NFκB-

105 ekspresija ir samērā stabila un, iespējams, tikai daļēji atkarīga no kaula patoloģiskā stāvokļa vai biomateriāla. Salīdzinot ar biomateriālu grupām, audu paraugos pēc *sham* operācijas netika novērota statistiski nozīmīga atšķirība starp operēto un neoperēto kāju audiem, kas liecina par to, ka ope-rācijas radītā audu trauma nav noteicoša *NFκB-105* ekspresijas palielināšanā.

Interesantu *NFκB-105* darbības ietekmi novēroja *Tan et al.*, pierādot faktora nozīmi osteoblastoģenēzē. Palielināta tā aktivitāte veicina osteoblastu diferenciācijas nomākšanu un rada samazinātus mineralizācijas rādītājus (*Tan et al.*, 2014). Pretēja *NFκB-105* nozīmi tika aprakstīta *Xiao et al.* pētījumā, kad kaulu veidojošās šūnas tika pakļautas jonizējošam starojumam. Pētījumā novēroja, ka pastiprināti notiek *NFκB-105* fosforilēšana *ser-536* lokācijā tieši osteoblastos, kas savukārt veicināja dažādu citokīnu un augšanas faktoru izdali, nodrošinot šūnu izdzīvošanu (*Xiao et al.*, 2009). Savukārt pētījumos ar šūnu kultūrām novērots, ka *Sr* klātbūtne bloķē *NFκB-105* signālu transdukciju un nomāc osteoklastoģenēzi, vienlaikus palielinot osteoblastoģenēzi (*Yamaguchi & Weitzmann*, 2012). Šādiem apgalvojumiem varam piekrist daļēji un pilnībā uz mūsu pētījuma modeli to attiecināt nevaram, jo, apkopojot iegūtos rezultātus, lielāka *NFκB-105* ekspresija tika konstatēta kopā ar lielāku *OC* pozitīvo šūnu skaitu, kas atbild par mineralizāciju, un lielāku *BMP-2/4* daudzumu, un tas norāda uz inducētu osteoģenēzi. Mūsu pētījumā biomateriāli ar vai bez *Sr* klātbūtnes *HA₇₀/TCP₃₀* sastāvā ierosināja statistiski ticami lielāku *NFκB-105* ekspresiju nekā biomateriāli ar *HA₃₀/TCP₇₀* attiecību. Jādomā, ka osteoporozes gadījumā, kad kaula reģenerācijas spējas ir zemas, implantētajam biomateriālam jābūt ar labu osteokonduktivitāti un lēnāku noārdīšanos, tādējādi nodrošinot ilgstošāku tā bioaktivitāti, ko spētu nodrošināt lielāka *HA* koncentrācija.

Lai arī osteoklastoģenēze un kaula resorbcija ir galvenie mehānismi osteoporozes attīstībai, kaula remodelācijas process var notikt, tikai mijiedar-bojoties vecās kaulvielas noārdīšanas un jaunas kaulvielas veidošanās procesiem

(Tong et al., 2019). To apstiprina iegūtie korelācijas dati kontroles grupas audos, kur stipra pozitīva korelācija tika konstatēta starp kaula trabekulāro laukumu un *NFκB-105*. Papildus tam stipra pozitīva korelācija tika atrasta arī starp *NFκB-105* un *Col-1α* pozitīvo šūnu skaitu audu paraugos pēc *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* un *HA₃₀/TCP₇₀* implantācijas. Tā kā kolagēna klātbūtne norāda uz jaunas kaulvielas un ekstracelulārās matricēs veidošanās sākumu, tas vēlreiz apstiprina *NFκB-105* nozīmi osteoklastoģenēzē un kaula remodelācijas procesos. Literatūrā arī ir aprakstīts, ka kolagēnam piemīt dažādu šūnu, tajā skaitā osteoklastu un osteoblastu, uzvedības īpatnību regulēšana. Kolagēnam, iedarbojoties caur dažādiem sarežģītiem mehānismiem, ir spējas ietekmēt šūnu adhēziju, proliferāciju un diferenciāciju (Montalbano et al., 2018).

NFκB-105 piedalās iekaisuma citokīnu ierosināšanas un producēšanas procesos, īpaši palielinot *Il-1* sekrēciju (Kalaitzidis & Gilmore, 2005). Arī mūsu pētījumā ļoti stipra pozitīva korelācija starp *NFκB-105* un *Il-1* pozitīvo šūnu skaitu tika konstatēta audu paraugos pēc *HA₃₀/TCP₇₀* biomateriālu implantācijas un *sham* operācijas. Diemžēl literatūrā nav datu par *NFκB-105* ekspresijas apjomu pētījumos, kur analizēta *Sr* saturošu biomateriālu ietekme kaula reģenerācijā. Līdz ar to nav iespējams salīdzināt mūsu iegūtos datus ar citiem autoriem, un var teikt, ka mūsu iegūtie dati ir unikāli, jo ir novērotas jaunas, iepriekš neaprakstītas korelācijas un rezultāti.

Osteoproteģerīns (OPG) ir visbiežāk pētītais šūnu funkcionālās aktivitātes rādītājs, jo tas spēj nomākt osteoklastoģenēzi un kaula resorbciju, bloķējot *RANK/RANKL* mehānismu (Tong et al., 2019). Šim faktoram ir ļoti liela nozīme osteoporozes ierosinātās kaula pārmaiņās un tām sekojošā kaula remodelācijā (Jimenez et al., 2019). Mūsu pētījumā vidēji daudz līdz daudz *OPG* pozitīvo struktūru novērojām veselo trušu audos. Lai arī statistiski ticama atšķirība netika konstatēta, audu paraugos pēc *Sr* saturošu biomateriālu implantācijas tika novērotas daudz *OPG* saturošu kaula šūnu. Tas liecina par

iespējamu lielāku *OPG* aktivitāti tieši osteoporozes gadījumā, kur galvenokārt notiek pastiprināta kaula resorbcija, bet *Sr* ietekmē tiek nomākta jaunu osteoklastu veidošanās. Vēl jo vairāk, mēs konstatējam statistiski nozīmīgu atšķirību starp audu paraugiem pēc tīru biomateriālu implantācijas, *sham* operācijas un neoperētās kājas audos, kur bija vērojamas tikai vidēji daudz *OPG* saturošas struktūras. Tas apstiprina, ka *Sr* klātbūtne osteoporotiskos kaulaudos spēj nomākt osteoklastoģenēzi un progresējošu kaula resorbciju, jo vienlaikus ar *OPG* pieaugumu samazinās *RANKL* produkcija, kas nomāc osteoklastu prekursoro šūnu tālāku diferenciāciju (Tan et al., 2014). Osteoblasti sekretē *OPG* dažādos kaula funkcionālos stāvokļos, bet *Sr* klātbūtnē tiek novērota tā pastiprināta izdale, kas netieši norāda arī uz osteoblastu aktivitātes pieaugumu, īpaši osteoporozes laikā (Tong et al., 2019).

Mūsu rezultāti sakrīt ar citu autoru darbiem, piemēram, *Thorman et al.*, kas konstatēja lielāku *OPG* ekspresiju osteoporotisku žurku augšstilba kaulā 6 nedēļas pēc *Sr* saturošas *CPC* biomateriālu implantācijas, salīdzinot ar tīru biomateriālu vai *sham* operāciju. Autori norāda: lai arī *Sr* piemīt osteoklastoģenēzi nomācošas īpašības, tas neietekmē liela izmēra osteoklastu darbību biomateriāla degradācijas procesā (Thormann et al., 2013). Tas apstiprināts arī mūsu darbā, kur, kā jau iepriekš minēts, liela izmēra osteoklasti tika konstatēti arī tīru biomateriālu audu paraugos. Lielāka *OPG* ekspresija tika konstatēta arī citu autoru darbos, salīdzinot *Sr* saturošu biomateriālu ierosināto kaulaudu atbildi ar kontroles grupu audiem bez *Sr* klātbūtnes (Lin et al., 2013; Singh et al., 2014). Nevienā no pētījuma grupām netika novērota nozīmīga korelācija starp *OPG* vai citiem analizētajiem faktoriem, kas liecinātu par tā neatkarīgu lomu, regulējot osteoklastu ierosināto kaula resorbciju gan veselu, gan osteoporotisku trušu kaulaudos. Tas varētu būt saistīts ar otru *OPG* darbības mehānismu, ietekmējot osteoklastu diferenciāciju. Pierādīts, ka *OPG* spēj saistīties ar transmembrānu proteīna receptora un liganda *Fas/FasL* sistēmu, kura atbild par mitohondriju

kaspāzes aktivitāti. *OPG* bloķējot šo receptoru, tiek ierosināta osteoklastu prekursoru apoptoze ar sekojošu kaula resorbcijas nomākumu (Liu et al, 2015). Mēs uzskatām, ka *OPG* ir svarīgākais faktors osteoporozes gadījumā, jo, pateicoties tā spējai nomākt osteo-klastoģenēzi, osteoporozes skartajam kaulam ir iespēja atjaunot kaula funkcionalitāti anabolisko procesu virzienā.

Mūsu pētījuma kontroles grupas audos konstatējām maz līdz vidēji daudz **kaula morfogēnā proteīna-2/4 (*BMP-2/4*)** pozitīvu struktūru, kas bija statistiski ticami mazāk nekā visos audu paraugos pēc biomateriālu implantācijas. Savukārt *BMP-2/4* šūnu skaits pēc *sham* operācijas bija līdzīgs kontroles grupas audiem. Interesanti, ka *HA₃₀/TCP₇₀* un *sham* operācijas operēto audu paraugos netika novērots lielāks *BMP-2/4* šūnu skaits, salīdzinot ar neoperētās kājas audiem. Ņemot vērā arī atradnes attiecību pret veselo trušu audiem, jāatzīmē, ka *sham* audu paraugos novērojām visneizteiktākās izmaiņas *BMP-2/4* pozitīvo kaula šūnu skaitā. Iegūtie dati liecina, ka biomateriālu klātbūtne ierosina lielāku *BMP-2/4* ekspresiju nekā *sham* operācija. Lai arī to neapstiprina kaulu trabekulārā laukuma lielums, šūnu līmenī ir ierosināta labvēlīgāka vide jauna kaula veidošanai, jo *BMP-2/4* ir ļoti spēcīgs osteoinduktīvs faktors. *BMP-2/4* pieder pie transformējošo augšanas faktoru dzimtas un tam ir ļoti liela loma kaulaudu reģenerācijā, jo tas ierosina cilmes šūnu migrāciju, to diferenciāciju par preosteoblastiem un dažādu osteoblasto-ģenēzei svarīgu gēnu un faktoru ekspresiju (Lin et al., 2015; Jang, Kim & Kim, 2012). Literatūrā aprakstīts, ka *Sr* veicina osteoblastu diferenciāciju tieši ar tai sekojošu kaula morfogēno proteīnu līmeņa paaugstināšanos, iedarbojoties caur *Ca* jutīgiem receptoriem (Tao et al., 2018). Visvairāk *BMP-2/4* pozitīvo struktūru tika novērots pēc *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* granulu implantācijas, un to skaits bija statistiski ticami lielāks nekā pēc *HA₃₀/TCP₇₀* vai *sham* operācijas. Pētījumā iegūtie dati daļēji sakrīt ar citu autoru datiem. *Tian et al.* novēroja *BMP-2/4* faktora ekspresijas pieaugumu pēc *Sr* bagātināta kalcija polifosfāta biomateriāla implantācijas salīdzinājumā ar tīru

biomateriālu veselu trušu kaulos (Tian et al., 2009). Savukārt *Thormann et al.* osteoporotisku trušu kaulaudos novēroja tikai nelielu *BMP-2/4* ekspresijas palielinājumu pēc *Sr* saturošu biomateriālu implantācijas (Thormann et al., 2013). Mums likās ļoti būtiski, ka *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* biomateriāls spēj ierosināt lielāku *BMP-2/4* pozitīvo struktūru daudzumu salīdzinājumā ar veselīem kontroles trušiem, tīru biomateriālu vai *sham* operāciju. Tas liecina, ka *Sr* klātbūtne uzlabo *BMP-2/4* funkcionālo nozīmi un osteogēnēzes potenciālu osteoporozes apstākļos. To netieši parāda *Tao et al.* pētījuma rezultāti, kad osteoporotisku žurku kaulos tika novērota ātrāka kaula defekta sadzīšana pēc *Sr* un *BMP-2* saturoša biomateriāla implantācijas (Tao et al., 2018).

Iepriekš aprakstītā *BMP-2/4* faktora ciešā korelācija ar *Col-1 α* un *OC* pozitīvo šūnu skaitu ir saistīta ar šūnu līmenī ierosināto spēju osteoporotiskam kaulam sākt reģenerācijas procesu, kuru būtu vēlams izvērtēt ne ātrāk kā pēc 12 nedēļām. Līdzīgas korelācijas atrodamas citu autoru darbos, kur līdz ar palielinātu *BMP-2/4* ekspresiju palielinās arī *OC* un *Col-1 α* ekspresija (Young et al., 2008; Tian et al., 2009; Baier et al., 2013; Thormann et al., 2013; Barbeck et al., 2015). Jāteic gan, ka autori šādu atradni konstatējuši veselu dzīvnieku audos. Līdz ar to mūsu rezultāts liecina par vispārēju biomateriālu ierosināto spēju aktivizēt osteoblastogēnēzi osteoporotiskā trušu kaulā, kura pēc iegūtiem datiem ir ar lielāku *BMP-2/4* ekspresiju nekā vesela truša kaulā.

Matrices metaloproteināzes (MMPs) kaula reģenerācijas laikā veic *ECM* noārdīšanu. Osteoklasti neproducē kolagenāzes, tāpēc ir nepieciešama nemineralizētās kaula daļas noārdīšana, kas veicina osteoklastu adhēziju ar tai sekojošu kaula resorbciju. Tieši *MMP-2* ir viens no šī procesa īstenojošiem audu faktoriem (Liang et al., 2016). Mūsu pētījumā tika konstatēts līdzīgs *MMP-2* pozitīvo šūnu daudzums kontroles trušiem un osteoporotiskiem trušiem pēc operācijas. Statistiski ticama atšķirība netika novērota arī starp audu paraugiem pēc biomateriālu implantācijas un *sham* operācijas. Vienīgi audu paraugi pēc *Sr*-

HA_{70}/TCP_{30} uzrādīja statistiski ticami vairāk *MMP-2* pozitīvo kaula šūnu nekā pēc $Sr-HA_{30}/TCP_{70}$ un HA_{30}/TCP_{70} granulu implantācijas. Tomēr, salīdzinot ierosināto kaulaudu atbildi starp operēto un neoperēto kāju audu paraugos pēc HA_{30}/TCP_{70} , $Sr-HA_{70}/TCP_{30}$ un HA_{70}/TCP_{30} implantācijas, novērojām statistiski ticami vairāk *MMP-2* pozitīvo šūnu. Varētu teikt, ka *MMP-2* klātbūtne ir kaula kvalitātes rādītājs, jo tā ierosina *ECM* komponentu resorbciju un aizvietošanu ar jaunu kaulvielu.

Literatūrā pieejami pretrunīgi dati par *MMPs* ekspresiju pēc *Sr* saturošu biomateriālu implantācijas. *Xie et al.* pētījumā ar veseliem trušiem konstatēja, ka, salīdzinot ar tīru biomateriālu, *Sr* bagātinātas kalcija polifosfāta granulas spēj palielināt *MMP-2* ekspresiju, tādējādi *Sr* klātbūtne ierosina lielāku *ECM* remodelāciju. Autori to pamato ar pieņēmumu, ka *Sr* veicina osteoblastu pārveidošanos par osteocītiem, kas savukārt sintezē *MMPs* (*Xie et al.*, 2012). Savukārt *Braux et al.* demonstrēja, ka *Sr* saturoša divfāziska *CPC* nepalielina *MMP-2* daudzumu, pretēji tīram biomateriālam, kad tika novērota lielāka *MMP-2* ekspresija (*Braux et al.*, 2011). Mūsu pētījuma dati par osteoporotiskiem trušiem daļēji sakrīt ar citu autoru rezultātiem. Mūsu atradne liecina, ka biomateriāliem ir nozīme *ECM* veidošanā osteoporotiskā kaulā. Un šis process osteoporotiskiem trušiem pēc biomateriālu implantācijas ir līdzīgs kā veseliem trušiem. To apstiprina *MMP-2* pozitīvo šūnu pieaugums, salīdzinot operētās un neoperētās kājas audus. Analizētajos citu autoru darbos atkārtoti tika konstatēti pretrunīgi dati par *MMP-2* funkcionālo nozīmi. Proti, vieni autori uzskata, ka *MMP-2* ir nepieciešama kaula remodelācijai, bet citi savukārt norāda, ka *MMP-2* veidošanās var veicināt palielinātu implanta sekundāru dislokāciju un/vai lūzumu risku pastiprinātās kaula resorbcijas dēļ. Lai novērtētu *MMPs* ietekmi attiecīgā kaulu stāvokļa remodelācijas procesos, visi autori rekomendē salīdzināt *MMPs* un to inhibitoru savstarpējo ekspresijas līmeņu attiecību (*Braux et al.*, 2011; *Liang et al.*, 2016).

Kontroles grupas trušu audos konstatējām stipru pozitīvu korelāciju starp *MMP-2* un *Il-10*, apstiprinot iepriekš aprakstīto par *Il-10* nozīmi kaula remodelācijas procesā, kur tas aktīvi piedalās proteīnāžu sintēzes regulācijā (Jung et al., 2013). Savukārt *HA₇₀/TCP₃₀* audos novērojām stipru pozitīvu korelāciju starp *OC* un *MMP-2* pozitīvo šūnu skaitu. Tas izskaidrojams ar to, ka *MMP-2* deficīta gadījumā jaunā kaula *ECM* ir ar zemu mineralizācijas pakāpi un sliktu mehānisko izturību (Alliston, 2014). Arī *sham* audu paraugos statistiski nozīmīga korelācija tika konstatēta starp *MMP-2* un *NFκB-105*. Iegūtais rezultāts apliecina zināmo, proti, ka *ECM* remodelācija norit, pateicoties tās komponentu resorbcijai, kuru savukārt nodrošina *NFκB-105* ierosinātā osteoklastoģenēze. Papildus ir zināms, ka *Il-1* aktīvi piedalās *MMP-2* sekrēcijas veicināšanā (Laquerriere et al., 2004). Tas netieši pamato mūsu pētījumā atrastās korelācijas starp *MMP-2*, *Il-10* un *NFκB-105* ekspresiju, jo šie faktori ir iesaistīti osteoklastu un iekaisuma citokīnu līmeņu regulācijā, tādējādi apliecinot *MMP-2* nozīmi dažādu bioloģisku vielu izdales un regulēšanas procesos, lai uzturētu normālu kaula homeostāzi.

Matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitors (*TIMP-2*) pieder multifunkcionālo proteīnu dzimtai, kas galvenokārt nomāc *MMP-2* aktivitāti. Pierādīts, ka vislielākā faktora aktivitāte ir tieši skeleta attīstības fāzē, kad pārlietu liela *ECM* noārdīšana var veicināt skeleta anomāliju attīstību (Liang et al., 2016). Mūsu pētījumā statistiski nozīmīgas atšķirības konstatējām *TIMP-2* pozitīvo šūnu skaitā starp kontroles un osteoporotiskiem trušiem. Visiem operētajiem dzīvniekiem konstatējām lielāku *TIMP-2* pozitīvo šūnu skaitu. Interesanti, ka *TIMP-2* ekspresija bija ļoti līdzīga visiem operētajiem trušiem. Vienīgi *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* un *HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas audu paraugos konstatējām nozīmīgi vairāk *TIMP-2* pozitīvu osteocītu salīdzinājumā ar neoperēto kāju. Mūsu rezultāti sakrīt ar faktu, ka kaulaudu reģenerācijā pēc lūzumiem lielākā *TIMP-2* aktivitāte ir konstatēta kaula matrices mineralizācijas fāzē un ka

faktoru izdala nobriedušie osteoblasti, un tas netieši spēj regulēt arī osteoklastu aktivitāti kaula resorbcijas procesos (Paiva & Granjero, 2017). Tas, mūsaprāt, liecina par noritošu kaulaudu reģenerāciju pēc biomateriāla implantācijas vai *sham* operācijas, neskatoties uz kaula osteoporotisko stāvokli. Vēl jo vairāk, tas netieši apstiprina faktu par *TIMP-2* ietekmi osteoklastu darbības regulācijā, jo ir zināms, ka osteoklastu aktivitāte osteoporozes gadījumā ir lielāka. *In vitro* pētījumos konstatēta *TIMP-2* spēja regulēt osteoklastu ierosināto kaula resorbciju (Sobue et al., 2001). To pamato arī *in vivo* pētījumi, kur *MMPs* inhibitoru deficīta gadījumā attīstījies kauls un skrimslis ir ar ļoti izteiktām kaula resorbcijas un degradācijas pazīmēm (Sahebjam, Khokha & Mort, 2007). Mūsu pētījumā netika novērota *Sr* ietekme *TIMP-2* pozitīvo šūnu daudzumā, salīdzinot ar tīru biomateriālu. Savukārt Braux et al. pētījumā tika pierādīts, ka *Sr* saturoša divfāziska *CPC* palielina *TIMP-2* ekspresiju (Braux et al., 2011). Tomēr šāda atradne konstatēta *in vitro* pētījumā, eksperimentējot ar izdalītiem cilvēka osteoblastiem.

Statistiski nozīmīgas pozitīvas korelācijas netika konstatētas starp *TIMP-2* un citiem faktoriem. Taču jāmin faktora saistība ar *MMP-2*. Kopumā mēs novērojām lielāku *TIMP-2* pozitīvo šūnu daudzumu, salīdzinot ar *MMP-2* pozitīvām šūnām visās grupās. Tas varētu liecināt, ka *TIMP-2* ir papildu nozīme kaula šūnu un reģenerācijas procesa regulēšanā. Tādējādi mūsu iegūtie dati par *TIMP-2* ekspresiju ir unikāli, jo iepriekš literatūrā nav atrodami pētījumi par *Sr* saturošu biomateriālu implantāciju *in vivo* un *TIMP-2* daudzumu.

Mūsu pētījumā novērojām statistiski nozīmīgi vairāk **interleikīna 1** (*Il-1*) pozitīvu kaula šūnu operētajos osteoporotiskajos trušos, salīdzinot ar kontroles grupas dzīvniekiem. Kontroles grupā vidēji novērojām dažas *Il-1* pozitīvas kaula šūnas, bet osteoporotiskos operētajos audu paraugos vidēji tika novērots no maz līdz vidēji daudz *Il-1* pozitīvu kaula šūnu. Statistiski ticami vairāk *Il-1* pozitīvo šūnu operētās kājas audos, salīdzinot ar neoperēto kāju, bija

pēc *Sr-HA₃₀/TCP₇₀*, *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* un *HA₇₀/TCP₃₀* biomateriālu implantācijas. Toties *sham* audu paraugos konstatējām ļoti līdzīgu atradni. Visizteiktākais *Il-1* šūnu skaits bija vērojams audu paraugos pēc *HA₇₀/TCP₃₀* granulu implantācijas. Šī atradne saskan ar citu autoru darbiem, kur pierādīts, ka *HA* un *HA/TCP* savienojumi spēj palielināt iekaisuma citokīna *Il-1* sekrēciju ar tai sekojošu kaula resorbcijas pastiprināšanos, kas ilgtermiņā var veicināt osteolīzi un, piemēram, implanta sekundāru dislokāciju (Ninomiya et al., 2001).

Il-1 ir visvairāk pētītais iekaisuma citokīns, kurš regulē organismam nozīmīgas funkcijas. Īpaši liela nozīme tam ir osteoporozes gadījumā, kad *Il-1* aktivē osteoklastu diferenciāciju ar tai sekojošu kaula resorbciju (Lee et al., 2010). Tomēr ir pierādīts, ka *Il-1* ir arī pozitīvi efekti kaula remodelācijas procesā. *Il-1* klātbūtne osteoporotiskā kaulā norāda uz aktīvāku kaula remodelācijas procesu pēc pārciestās operācijas (Raisz, 2005). Tas pilnībā sakrīt ar mūsu pētījuma rezultātiem, kur paaugstināta *Il-1* klātbūtne tika konstatēta visu operēto trušu audos. Interesanti dati ir publicēti pētījumā, kur autori apraksta *Sr* ietekmi uz *Il-1* līmeņa samazināšanos (Fernandez et al., 2013). To varētu skaidrot ar *Sr* spēju palielināt *OPG* ekspresiju, kas savukārt nomāc *RANK/RANKL* signālu pārvadi ar tai sekojošu osteoklastoģenēzes bloķēšanu. Lai arī mūsu pētījumā statistiski nozīmīgi vairāk *Il-1* šūnu bija vērojamas tikai pēc *HA₇₀/TCP₃₀* implantācijas, salīdzinot ar *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* audu paraugiem, *OPG* līmenis bija statistiski ticami lielāks visos audu paraugos pēc *Sr* saturošu granulu implantācijas nekā tīra biomateriāla audu paraugos.

Pretrunu rada fakts, ka kontroles un neoperētās kājas audu paraugos bija ļoti līdzīgs *Il-1* pozitīvo šūnu skaits – kopumā tika konstatētas vien retas šūnas. To varētu izskaidrot ar to, ka 12 nedēļu laikā osteoporozes ierosinātā kaula resorbcija ir sasniegusi plato, kas līdzinās veselo kaulu remodelācijai. Protams, vēlreiz jāpiemin, ka kaula trabekulārais laukums kontroles trušos bija gandrīz divreiz lielāks. Būtu bijis nozīmīgi pētīt remodelācijas procesa faktoru aktivitāti

dažādos laika periodos pēc operācijas. *Vamze et al.* ir pētījusi iekaisuma citokīnu ekspresiju veselu trušu apakšžoklī pēc dažādu *CPC* biomateriālu implantācijas 3, 4,5, 6 un 8 mēnešus pēc operācijas. Iegūtie rezultāti liecina par aktīvāko *Il-1* ekspresiju tieši 3 mēnešos, kamēr 4,5 mēnešos ir pilnīgs šī faktora trūkums, kas lēnām atjaunojas tikai 6 un 8 mēnešus pēc operācijas. Autori to skaidro kā organisma atbildes reakciju gan uz operācijas radīto traumu, gan pašu biomateriālu. Savukārt faktora līmeņa paaugstināšanos skaidro ar slēptā iekaisuma pakāpenisku samazināšanos (*Vamze, Pilmane & Skagers, 2012*).

Ļoti nozīmīga atradne ir tas, ka audos no operētās un neoperētās kājas pēc *Sr* saturošu biomateriālu implantācijas konstatējām līdzīgu *Il-1* pozitīvo šūnu daudzumu, salīdzinot ar citām audu grupām. Tas saskan ar citu autoru darbiem, kad pēc *Sr* saturošu biomateriālu implantācijas netika novērotas apkārt esošo augšstilba muskuļaudu morfoloģijas izmaiņas, kā arī nieru, liesas un aknu audi neuzrādīja specifiskus iekaisuma infiltrātus (*Tie et al., 2016*). Teikto pamato arī fakts, ka, pielietojot *Sr* bagātinātu *CPC* biomateriālu, netika novērota *Sr* koncentrācijas palielināšanās asinīs (*Baier et al., 2013*). Tādējādi var teikt, ka *Sr* lokāla lietošana dažādu biomateriālu sastāvā ir droša un efektīva tehnoloģija, ar kuras palīdzību var novērst *Sr* nelabvēlīgos efektus, lietojot to sistēmiski.

Literatūrā aprakstīts, ka *Il-1* produkcija krietni samazina *Col-1* un *OC* ekspresiju kaulaudos (*Neve, Corrado & Cantatore, 2011*). Taču mēs konstatējām pretējo – audu paraugos pēc *HA₃₀/TCP₇₀* implantācijas starp *OC* un *Il-1* pozitīvo šūnu skaitu tika novērota stipra pozitīva korelācija un starp *Col-1 α* un *Il-1* pozitīvo šūnu skaitu – ļoti stipra pozitīva korelācija. Tas, mūsaprāt, liecina par iekaisuma citokīnu būtisko nozīmi tieši osteoporotiskā kaulā, kad pastiprinātā kaula resorbcija veicina *ECM* nomaiņu un jaunas kaulvielas veidošanos. Šos datus netieši arī pamato *Lange et al.*, novērojums, ka *Il-1* būtiski ietekmē osteoblastoģenēzi kaula lūzumu sadzišanas laikā, stimulējot osteoblastu proliferāciju (*Lange et al., 2010*).

Mūsu pētījumā **interleikīnu-10** (*Il-10*) saturošo pozitīvo šūnu skaits bija ļoti līdzīgs gan kontroles, gan osteoporotisko trušu audos. *Il-10* ir visvairāk pētītais pretiekaisuma citokīns, kura funkcionālā darbība ir ļoti nozīmīga kaulaudu remodelācijas procesos. Tas spēj nomākt kaula resorbciju un iekaisuma citokīnu sintēzi (Zhang et al., 2014). Zināms, ka tieši *Il-10* piedalās *Il-1* sekrēcijas regulēšanā (Schraufstatter et al., 2012). Interesanti, ka, salīdzinot *Il-1* un *Il-10* atradni, varēja novērot izteiktāku *Il-10* ekspresiju, taču tā bija konstanti lielāka attiecībā pret *Il-1* praktiski visos mūsu pētītajos audu paraugos. Līdzīgā *Il-10* ekspresija biomateriālu un *sham* operācijas grupas audos liecina par to, ka biomateriālu klātbūtne neizraisa izteiktāku pret-iekaisuma aktivitāti, un tā ir stabila salīdzinājumā arī ar veselīem trušiem.

Vairākos pētījumos ar dzīvniekiem aprakstīts, ka *Il-10* gēna delēcijas gadījumā tiek novērota skeleta kaulu masas zudums nekontrolētās osteoklastu diferenciācijas un kaula resorbcijas dēļ (Zhang et al., 2014). Ir aprakstīti vairāki *Il-10* molekulārie mehānismi osteoklastoģenēzes nomākšanai. Galvenokārt *Il-10* spēj veicināt *OPG* sintēzi, vienlaikus samazinot *RANKL* un makrofāgu koloniju stimulējošā faktora ekspresiju (Liu et al., 2006). Būtiski arī pieminēt, ka vairāku autoru *in vitro* pētījumos *Sr* klātbūtne dažādu biomateriālu sastāvā samazina M1 iekaisuma makrofāgu veidošanos un tādu iekaisuma citokīnu sintēzi kā tumora nekrozes faktora alfa, *Il-1*, *Il-6*. Vienlaikus tas veicina M2 makrofāgu proliferāciju un *Il-10* ekspresiju, kas savukārt nodrošina vēlamāku kaula homeostāzi labākai biomateriāla osteointegrācijai (Li et al., 2018). Tas norāda uz *Sr* imūnmodulējošo nozīmi kaulaudu homeostāzes procesos, ko pierāda *in vitro* un *in vivo* pētījumu rezultāti, kuros demonstrēts, ka *Sr* saturoši titāna biomateriāli palielina *Il-10* ekspresiju ~ 3,5 reizes (Yuan et al., 2017).

Mūsu pētījumā statistiski ticami vairāk *Il-10* pozitīvu kaula šūnu operētās kājas audos, salīdzinot ar neoperēto kāju, bija pēc *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* un *HA₇₀/TCP₃₀* biomateriālu implantācijas. Vienīgi *HA₇₀/TCP₃₀* audu paraugi uzrādīja statistiski

ticami vairāk *Il-10* pozitīvu šūnu nekā kontroles trušu kaulaudi. Jāuzsver, ka kaulaudu ierosinātā atbilde pēc šo biomateriālu implantācijas uzrādīja vislielāko šūnu skaita pieaugumu salīdzinājumā ar citām pētījuma grupām. Mūsaprāt, to varētu izskaidrot ar *HA* un *TCP* masas attiecībām. Zināms, ka lielāka *HA* koncentrācijai biomateriāla sastāvā nodrošina lēnāku tā šķīdību un resorbciju, kas smagas osteoporozes gadījumā, iespējams, būtu vēlamāka. To pamato fakts, ka lēnāka *Sr* jonu izdalīšanās no implantētajām granulām nodrošina kvalitatīvāku un kvantitatīvāku kaulaudu remodelāciju vēlamā virzienā, jo osteoporozes gadījumā kaula reģenerācija spējas ir zemas un tām ir nepieciešams ilgāks laiks.

Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti vērtējami kā unikāla atradne tīru un *Sr* saturošu *CPC* biomateriālu analīzes jomā. Darbā pirmo reizi tika atspoguļota 11 dažādu audu paraugu analīze pēc viena protokola un izmeklēšanas metodēm. Vienā pētījumā tika analizēti veselu eksperimenta dzīvnieku audu paraugi un salīdzināti ar osteoporotisku trušu audu paraugiem pēc tīru un *Sr* saturošu divfāzisku *CPC* biomateriālu implantācijas dažādās masas attiecībās (*HA*₃₀/*TCP*₇₀ un *HA*₇₀/*TCP*₃₀) no operētās un neoperētās kājas audiem un *sham* operācijas. Darbā tika salīdzināti deviņi kaula homeostāzes nodrošināšanai nozīmīgi audu faktori – *OC*, *Col-1α*, *OPG*, *BMP-2/4*, *NFκB-105*, *MMP-2*, *TIMP-2*, *Il-1* un *Il-10*. Daļa no faktoriem, pēc pašreiz pieejamās literatūras datiem, osteoporotisku trušu kaulaudos pēc *Sr* saturošu biomateriālu lietošanas tika analizēti pirmo reizi. Iegūto rezultātu un savstarpējo faktoru korelāciju aprakstošā vērtība būs noderīga rezultātu salīdzināšanai un sarežģīto darbības mehānismu izpratnei tālākajos pētījumos. Osteoporotisku trušu kaulaudos tika konstatētas nozīmīgas analizēto faktoru atšķirības no kontroles trušu audiem. Lai arī osteoporozes gadījumā ir samazināta kaula remodelācijas spēja, mūsu rezultāti pierāda, ka gan traumai, gan biomateriāliem ir noteicoša loma, lai uzlabotu kaula reģenerācijas rādītājus salīdzinājumā pat ar veselu audu remodelācijas līmeni.

Analizējot audu paraugus kontroles un operētajiem trušiem, kopumā varam teikt, ka neatkarīgi no biomateriāla veida osteoporotisku operētu trušu kaulaudus raksturo palielināta *Col-1 α* , *BMP-2/4*, *TIMP-2* un *Il-1* atradne, salīdzinot ar veseliem trušiem. Vienīgi *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* ierosināja lielāku *OC* un *NF κ B-105* ekspresiju, bet *HA₇₀/TCP₃₀* lielāku *Il-10* atradni, kamēr *OPG* un *MMP-2* daudzums ir praktiski vienāds. Līdzīgi *sham* operācija spēj ierosināt lielāku *Col-1 α* , *TIMP-2* un *Il-1* atradni, salīdzinot ar veseliem trušiem. Tādējādi var apgalvot, ka papildus operācijas traumas ierosinātās atbildes uzlabošanai, veicinot kaula pamatvielas veidošanos, tās regulāciju un iekaisuma modulējošu darbību, biomateriāli spēj uzlabot osteoģenēzes rādītājus. Savukārt *Sr* klātbūtne veicina mineralizācijas rādītājus un paaugstina šūnu funkcionālas aktivitātes rādītājus arī osteoporotiskā kaulā.

Analizējot audu paraugus starp osteoporotisko trušu operēto un neoperēto kāju, ieguvām unikālas norādes, ka *sham* operācijas radītā trauma spēj uzlabot tikai kaula pamatvielas veidošanos. Savukārt *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* un *HA₇₀/TCP₃₀* biomateriālu ierosināto audu atbildi raksturo palielināts *Col-1 α* , *NF κ B-105*, *OC*, *OPG*, *BMP-2/4*, *MMP-2*, *TIMP-2*, *Il-1* un *Il-10* daudzums, kas liecina par ievērojamu biomateriālu spēju stimulēt ekstracelulārās matricas remodelāciju, imūnmodulējošo darbību, osteoblastoģenēzes un mineralizācijas procesus ar tiem sekojošu šūnu aktivitātes palielināšanu, bet kavēt osteo-klastoģenēzi. Jāuzsver arī *HA* un *TCP* masas attiecības nozīme osteoporotiska kaula reģenerācijas procesos.

Analizējot audu paraugus operēto osteoporotisko trušu grupām, varam apgalvot, ka *Sr* klātbūtne ievērojami uzlabo osteoģenēzi un šūnu aktivitāti, bet nomāc osteoklastoģenēzi. *Sr* joni savienojumā ar divfāzisko *CPC*, masas attiecībās *HA₇₀/TCP₃₀*, ievērojami palielina kaulaudu mineralizāciju un ekstracelulārās matricas remodelāciju patstāvīgas osteoporozes gadījumā. Savukārt iekaisuma un pretiekaisuma citokīnu atradne operēto audu grupās

norāda, ka *Sr* saturoši biomateriāli nepalielina iekaisuma procesus audos, un veicina ilgstošu, bet stabilu imūnmodulējošu šūnu aktivitāti.

Iegūtie rezultāti liecina, ka *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* implantētie biomateriāli ierosināja visspilgtāko osteoporotisko audu šūnu atbildi. Mūsu pētījuma rezultāti vērtējami kā novatoriski un dažviet pat unikāli.

Secinājumi

1. Veselo trušu kaulaudus raksturo izteikta kompaktā un porainā kaulviela, kuras apjoms ir statistiski ticami lielāks nekā osteoporotiskiem trušiem. Savukārt līdzīgais kaula trabekulārais laukums visām operēto dzīvnieku grupām liecina par ierosinātās osteoporozes stabilitāti un par to, ka 12 nedēļās pēc biomateriālu implantācijas nav vērojama kaula apjoma palielināšanās.

2. Osteoklastu un gigantšūnu klātbūtne ap biomateriālu granulām kaulā ar un bez *Sr* jonu klātbūtnes liecina par joprojām notiekošu biomateriāla noārdīšanās procesu. *Sr* saturošu biomateriālu grupu audos neesošā iekaisuma reakcija ap implantētajām granulām liecina par drošu *Sr* pielietojamību.

3. Statistiski nozīmīga *Col-1 α* relatīvā daudzuma palielināšanās visu osteoporotisko trušu operēto audu paraugos liecina par biomateriālu un arī par *sham* operācijas traumas ietekmi, veicinot ekstracelulārās matricē proteīnu sintēzi, osteoblastu aktivitātes netiešu pieaugumu un jaunas kaulvielas veidošanos. Līdzīgā *Col-1 α* šūnu klātbūtne kaulos pēc biomateriālu implantācijas un *sham* operācijas liecina par operācijas traumas vienlīdzīgo ietekmi uz kaula ekstracelulārās matricē veidošanās gaitu.

4. *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* biomateriāli ierosina visizteiktāko *OC* pozitīvo šūnu pieaugumu, salīdzinot ar kontroles grupu un pārējām osteoporotisko dzīvnieku grupām, norādot uz *Sr* ietekmi jaunās kaulvielas mineralizācijas procesā.

5. Osteoporotisko trušu kaulaudos pēc visu biomateriālu implantācijas atklātais statistiski nozīmīgais *BMP-2/4* pieaugums, salīdzinot ar kontroles grupu un *sham* operācijas ierosināto faktora ekspresijas līmeni, pamato tiešu biomateriālu nozīmi osteoblastu diferenciācijas un osteoģenēzes procesu intensifikācijā. Dominējošās *BMP-2/4* šūnu skaita statistiski ticamās atšķirības pēc *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* implantācijas pamato *Sr* klātbūtnes nozīmi osteoģenēzes procesu veicināšanā.

6. Lielais *NFκB-105* pozitīvo šūnu skaits kontroles grupas kaulaudos liecina par augstu šūnu aktivitāti, stabilu osteoklastoģenēzi un osteoģenēzi kopumā veselu trušu kaulos, ko pamato arī korelācija starp *NFκB-105* un lielāku kaula apjomu. Savukārt *NFκB-105* pozitīvo šūnu pieaugums osteoporotisko trušu operētās kājas kaulaudos pēc biomateriālu implantācijas liecina par biomateriālu spēju ierosināt aktīvāku kaulaudu remodelāciju. Izteiktākais *NFκB-105* šūnu daudzums pēc *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* granulu implan-tācijas, salīdzinot ar kontroles un citu grupu audiem, pamato *Sr* regulējošu osteoklastoģenēzi un remodelāciju, bet tikai *HA₇₀/TCP₃₀* grupas audos novērotais šūnu pieaugums liecina par lielākas hidroksilapatīta koncentrācijas nozīmi osteoporotiskos kaulaudos.

7. Statistiski nozīmīga *OPG* pozitīvo šūnu relatīvā daudzuma palielināšanās pēc *Sr* saturošu biomateriālu implantācijas pamato *Sr* noteicošo lomu osteoklastoģenēzes un pastiprinātas kaula resorbcijas nomākšanā osteoporotisku trušu kaulaudos, kas līdzinās arī veselu trušu kaulaudos noritošajai osteoģenēzes stimulēšanai.

8. Līdzīgā *MMP-2* atradne kontroles un osteoporotisko trušu kaulaudos liecina par biomateriālu un *sham* operācijas ietekmi ekstracelulārās matricēs noārdīšanas procesa ierosināšanā. Kopumā biomateriālu klātbūtne ierosina lielāku *MMP-2* ekspresiju, liecinot tieši par biomateriālu lokālu ietekmi kaulaudu remodelācijas uzlabošanā. Savukārt lielākais *MMP-2* šūnu pieaugums pēc *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* un *HA₇₀/TCP₃₀* granulu implantācijas pamato stabilāku osteokonduktivitātes ierosināšanu ar izteiktāku kaula šūnu darbības funkcionālo nozīmi ekstracelulārās matricēs remodelācijā.

9. Statistiski nozīmīga *TIMP-2* šūnu relatīvā daudzuma palielināšanās pēc biomateriālu implantācijas un *sham* operācijas vērtējama kā regulējošs kontroles mehānisms *MMP-2* ierosinātai ekstracelulārās matricēs komponentu resorbcijai. Lokāla *TIMP-2* daudzuma palielināšanās pēc *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* un *HA₇₀/TCP₃₀*

granulu implantācijas saistāma ar *MMP-2* daudzumu, norādot uz kaula remodelācijas procesa kontrolētu balansu.

10. Osteoporotisku trušu kaulaudos gan pēc biomateriālu implantācijas, gan *sham* operācijas novērotais *Il-1* šūnu skaita pieaugums vērtējams kā organisma atbilde uz veikto operāciju ar kaula remodelācijas procesa aktivēšanos. Līdzīgais *Il-1* šūnu skaits *Sr* saturošu biomateriālu un *sham* grupas audos pierāda, ka *Sr* lokāla lietošana neierosina pastiprinātu iekaisuma veidošanos implantācijas zonā.

11. Līdzīgais *Il-10* šūnu relatīvais daudzums osteoporotisku trušu kaulos vērtējams kā stabils pretiekaisuma rādītājs gan pēc biomateriālu implantācijas, gan *sham* operācijas.

12. *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* implantētie biomateriāli rada visizteiktākās osteoporotisko audu pārmaiņas, salīdzinot ar citiem biomateriāliem vai *sham* operāciju, ko raksturo *Col-1 α* , *OC*, *BMP-2/4*, *NF κ B-105*, *OPG*, *MMP-2*, *TIMP-2*, *Il-1* un *Il-10* šūnu relatīvā daudzuma palielināšanās. Kopumā šo faktoru izdale norāda uz uzlabotiem kaula mineralizācijas, ekstracelulārās matricē remodelācijas un šūnu aktivitātes procesiem, salīdzinot ar *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* audu paraugiem.

Literatūras saraksts

1. Abu-Amer, Y. 2013. NF- κ B signaling and bone resorption. *Osteoporosis International*. 24 (9), 2377–2386.
2. Alliston T. 2014. Biologic regulation of bone quality. *Current Osteoporosis Reports*. 12 (3), 366–375.
3. Andersen, O. Z., Offermanns, V., Sillassen, M., Almqvist, K. P. et al. 2013. Accelerated bone ingrowth by local delivery of strontium from surface functionalized titanium implants. *Biomaterials*. 34 (24), 5883–5890.
4. Baier, M., Staudt, P., Klein, R., Sommer, U. et al. 2013. Strontium enhances osseointegration of calcium phosphate cement: a histomorphometric pilot study in ovariectomized rats. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 8, 16.
5. Baker, A. H., Edwards, D. R. and Murphy, G. 2002. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science*. 115(Pt 19), 3719–3727.
6. Baofeng, L., Zhi, Y., Bei, C., Guolin, M. et al. 2010. Characterization of a rabbit osteoporosis model induced by ovariectomy and glucocorticoid. *Acta Orthopaedica*. 81, 396–401.
7. Barbeck, M., Dard, M., Kokkinopoulou, M., Markl, J. et al. 2015. Small-sized granules of biphasic bone substitutes support fast implant bed vascularization. *Biomatter*. 5 (1), e1056943.
8. Baud'huin, M., Lamoureux, F., Duplomb, L., Redini, F. et al. 2007. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 64 (18), 2334–2350.
9. Billström, G. H., Blom, A. W., Larsson, S. and Beswick, A. D. 2013. Application of scaffolds for bone regeneration strategies: Current trends and future directions. *Injury*. 44 (1), 28–33.
10. Booth, S. L., Centi, A., Smith, S. R. and Gundberg, C. 2013. The role of osteocalcin in human glucose metabolism: marker or mediator? *Nature Reviews. Endocrinology*, 9 (1), 43–55.
11. Braux, J., Velard, F., Guillaume, C., Bouthors, S. et al. 2011. A new insight into the dissociating effect of strontium on bone resorption and formation. *Acta Biomaterialia*. 7 (6), 2593–2603.
12. Cardemil, C., Elgali, I., Xia, W., Emanuelsson, L. et al. 2013. Strontium-doped calcium phosphate and hydroxyapatite granules promote different inflammatory and bone remodelling responses in normal and ovariectomised rats. *PLoS ONE*. 8, e84932.
13. Chattopadhyay, N., Quinn, S. J., Kifor, O., Ye, C. et al. 2007. The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation. *Biochemical Pharmacology*. 74 (3), 438–447.

14. Compston, J. E. 2001. Sex steroids and bone. *Physiological Reviews*. 81 (1), 419–447.
15. Davis, G. E. and Senger, D. R. 2005. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circulation Research*. 97 (11), 1093–1107.
16. Fernández, J. M., Molinuevo, M. S., Sedlinsky, C., Schurman, L. et al. 2013. Strontium ranelate prevents the deleterious action of advanced glycation endproducts on osteoblastic cells via calcium channel activation. *European Journal of Pharmacology*. 706 (1-3), 41-47.
17. Ferreira, A.M., Gentile, P., Chiono, V. and Ciardelli, G. 2012. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*. 8 (9), 3191–3200.
18. Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J. and Zeller, R. 2008. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protocols*. 2008:pdb.prot4986.
19. Grybauskas, S., Locs, J., Salma, I., Salms, G. et al. 2015. Volumetric analysis of implanted biphasic calcium phosphate/ collagen composite by three-dimensional cone beam computed tomography head model superimposition. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery*. 43, 167–174.
20. Hsu, S. M., Raine, L. and Fanger, H. 1981. The use of antiavidin antibody and avidin-biotinperoxidase complex in immunoperoxidase technics. *American Journal of Clinical Pathology*. 75 (6), 816–821.
21. Jang, W. G., Kim, E. J. and Kim, D. K. 2012. BMP2 protein regulates osteocalcin expression via Runx2-mediated Atf6 gene transcription. *The Journal of Biological Chemistry*. 287, 905–915.
22. Jiménez, M., Abradelo, C., San Román, J. and Rojo, L. 2019. Bibliographic review on the state of the art of strontium and zinc based regenerative therapies. Recent developments and clinical applications. *Journal of Materials Chemistry B*. 7, 1974–1985.
23. Jing, D., Hao, X., Xu, F., Liu, J. et al. 2016. Effects of local delivery of BMP2, zoledronate and their combination on bone microarchitecture, biomechanics and bone turnover in osteoporotic rabbits. *Scientific Reports*. 6, 28537.
24. Jung, Y. K., Kim, G. W., Park, H. R., Lee, E. J. et al. 2013. Role of Interleukin-10 in Endochondral Bone Formation in Mice: Anabolic Effect via the Bone Morphogenetic Protein/Smad Pathway. *Arthritis & Rheumatism*. 65, 3153-3164.
25. Kalaitzidis, D. and Gilmore, T. D. 2005. Transcription factor cross-talk: The estrogen receptor and NF-kappa B. *Trends Endocrinology and Metabolism* 16 (2), 46–52.
26. Kang, P., Xie, X., Tan, Z., Yang, J. et al. 2015. Repairing defect and preventing collapse of femoral head in a steroid-induced osteonecrotic of femoral head animal model using strontium-doped calcium polyphosphate combined BM-MNCs. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 26 (2), 80.

27. Kaygili, O., Keser, S., Kom, M, Eroksuz, J. et al. 2015. Strontium substituted hydroxyapatites: Synthesis and determination of their structural properties, in vitro and in vivo performance. *Materials Science and Engineering: C*. 55, 538–546.
28. Kim, M. S., Noh, W. C., Kim, Y. G., Kim, J. Y. et al. 2015. Effect of rhBMP-2 on mineralization of human periodontal ligament cells under high glucose conditions in vitro. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*. 35(2), 108–114.
29. Lange, J., Sapozhnikova, A., Lu, C., Hu, D. et al. 2010. Action of IL-1 β during fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research*. 28 (6), 778–784.
30. Laquerriere, P., Grandjean-Laquerriere, A., Salima Addadi-Rebbah, S., Jallot, E. et al. 2004. MMP-2, MMP-9 and their inhibitors TIMP-2 and TIMP-1 production by human monocytes in vitro in the presence of different forms of hydroxyapatite particles. *Biomaterials*. 25 (13), 2515–2524.
31. Lee, Y. M., Fujikado, N., Manaka, H., Yasuda, H. et al. 2010. IL-1 plays an important role in the bone metabolism under physiological conditions. *International Immunology*. 22 (10), 805–816.
32. Li, K., Hu, D., Xie, Y., Huang, L. et al. 2018. Sr-doped nanowire modification of Ca–Si-based coatings for improved osteogenic activities and reduced inflammatory reactions. *Nanotechnology*. 29 (8), 084001.
33. Liang, H. P. H., Xu, J., Xue, M. and Jackson, C. J. 2016. Matrix metalloproteinases in bone development and pathology: Current knowledge and potential clinical utility. *Metalloproteinases in Medicine*. 3, 93–102.
34. Lin, G., Zhou, C., Lin, M., Xu, A. et al. 2019. Strontium-incorporated titanium implant surface treated by hydrothermal reactions promotes early bone osseointegration in osteoporotic rabbits. *Clinical Oral Implants Research*. 30: 777–790.
35. Lin, K., Xia, L., Li, H., Jiang, X. et al. 2013. Enhanced osteoporotic bone regeneration by strontium-substituted calcium silicate bioactive ceramics. *Biomaterials*. 34 (38), 10028-10042.
36. Lin, Y., Xiao, W., Liu, X., Bal, B. et al. 2015. Long-term bone regeneration, mineralization and angiogenesis in rat calvarial defects implanted with strong porous bioactive glass (13-93) scaffolds. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 432: 120-129.
37. Liu, D., Yao, S. and Wise, G. E. 2006. Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. *European Journal of Oral Sciences*. 114 (1), 42-49.
38. Liu, W., Xu, C., Zhao, H., Xia, P. et al. 2015. Osteoprotegerin Induces Apoptosis of Osteoclasts and Osteoclast Precursor Cells via the Fas/Fas Ligand Pathway. *PLoS One*. 10(11): e0142519.
39. Meredith, A. 2015. BSAVA Small Animal Formulary, 9th Edition, Part B: Exotic Pets. 9th ed. Edinburgh, United Kingdom: British Small Animal Veterinary Association.

40. Montalbano, G., Fiorilli, S., Caneschi, A. and Vitale-Brovarone, C. 2018. Type I Collagen and Strontium-Containing Mesoporous Glass Particles as Hybrid Material for 3D Printing of Bone-Like Materials. *Materials (Basel, Switzerland)*. 11(5), 700.
41. Nair, A.K., Gautieri, A., Chang, S.W. and Buehler, M.J. 2013. Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone. *Nature Communications*. 4, 1724.
42. Neve, A., Corrado, A. and Cantatore, F. P. 2011. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell and Tissue Research*. 343 (2), 289–302.
43. Neves, N., Linhares, D., Costa, G., Ribeiro, C. C. et al. 2017. In vivo and clinical application of strontium-enriched biomaterials for bone regeneration: a systematic review. *Bone and Joint Research*. 6, 366–375.
44. Ni, G. X., Lu, W.W., Chiu, K. Y., Li, Z. Y. et al. 2006. Strontium-containing hydroxyapatite (Sr-HA) bioactive cement for primary hip replacement: an in vivo study. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B Applied Biomaterials*. 77(2), 409–415.
45. Ninomiya, J. T., Struve, J. A., Stelloh, C. T., Toth, J. M. et al. 2001. Effects of hydroxyapatite particulate debris on the production of cytokines and proteases in human fibroblasts. *Journal of Orthopaedic Research*. 19 (4), 621–628.
46. Offermanns, V., Andersen, O. Z., Riede, G., Sillassen, M. et al. 2018. Effect of strontium surface-functionalized implants on early and late osseointegration: A histological, spectrometric and tomographic evaluation. *Acta Biomaterialia*. 69, 385–394.
47. Paiva, K. B. S. and Granjeiro, J. M. 2017. Matrix Metalloproteinases in Bone Resorption, Remodeling, and Repair. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 148, 203–303.
48. Pasqualetti, S., Banfi, G. and Mariotti, M. 2012. The zebrafish scale as model to study the bone mineralization process. *Journal of Molecular Histology*. 43 (5), 589–595.
49. Patti, A., Gennari, L., Merlotti, D., Dotta, F. et al. 2013. Endocrine Actions of Osteocalcin. *International Journal of Endocrinology*, 2013, 846480.
50. Pilmane, M., Luts, A. and Sundler, F. 1995. Changes in neuroendocrine elements in bronchial mucosa in chronic lung disease in adults. *Thorax*. 50 (5), 551–554.
51. Prakasam, M., Locs, J., Salma-Ancane, K., Loca, D. et al. 2017. Biodegradable Materials and Metallic Implants-A Review. *Journal of Functional Biomaterials*. 8 (4), 44.
52. Raisz, L. G. 2005. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *The Journal of Clinical Investigations*. 115 (12), 3318–3325.
53. Rodrigues, A. M., Caetano-Lopes, J., Vale, A. C., Vidal, B. et al. 2012. Low osteocalcin/collagen type I bone gene expression ratio is associated with hip fragility fractures. *Bone*. 51 (6), 981–989.
54. Rucci N. 2008. Molecular biology of bone remodeling. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*. 5 (1), 49–56.

55. Sadiq, D., Alfari, A. and Alassadi, F. 2016. Histological and anatomical study to induce osteoporosis in female rabbits measurement by dual- energy x-ray absorptiometry and MRI. *Life Science Archives* (LSA). 662-674. 10.21276/lisa.2016.2.5.1.
56. Sahebjam, S., Khokha, R. and Mort, J.S. 2007. Increased collagen and aggrecan degradation with age in the joints of *Timp3^{-/-}* mice. *Arthritis & Rheumatis*. 56, 905–909.
57. Schraufstatter, I. U., Zhao, M., Khaldoyanidi, S. K. and Discipio, R. G. 2012. The chemokine CCL18 causes maturation of cultured monocytes to macrophages in the M2 spectrum. *Immunology*. 135, 287–98.
58. Singh, S. S., Roy, A., Lee, B. E., Ohodnicki, J. et al. 2014. A study of strontium doped calcium phosphate coatings on AZ31. *Materials Science & Engineering C., Materials for Biological Applications*. 40, 357–365.
59. Sobue, T., Hakeda, Y., Kobayashi, Y., Hayakawa, H. et al. 2001. Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 directly stimulate the bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research*. 16, 2205–2214.
60. Stipniece, L., Salma-Ancane, K., Loca, D. and Pastare, S. 2016. Synthesis of strontium substituted hydroxyapatite through different precipitation routes. *Key Engineering Materials*. 674, 3–8.
61. Tan, S., Zhang, B., Zhu, X., Ao, P. et al. 2014. Deregulation of Bone Forming Cells in Bone Diseases and Anabolic Effects of Strontium-Containing Agents and Biomaterials. *BioMed Research International* 2014. 814057.
62. Tao, Z., Zhou, W., Jiang, Y., Wu, X. et al. 2018. Effects of strontium-modified calcium phosphate cement combined with bone morphogenetic protein-2 on osteoporotic bone defects healing in rats. *Journal of Biomaterials Application*. 33 (1), 3–10.
63. Tarafder, S., Davies, N.M., Bandyopadhyay, A. and Bose, S. 2013. 3D printed tricalcium phosphate bone tissue engineering scaffolds: Effect of SrO and MgO doping on in vivo osteogenesis in a rat distal femoral defect model. *Biomater. Sci*. 1 (12), 1250–1259.
64. Thormann, U., Ray, S., Sommer, U., Elkhassawna, T. et al. 2013. Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. *Biomaterials*. 34 (34), 8589–8598.
65. Tian, M., Chen, F., Song, W., Song, Y. et al. 2009. In vivo study of porous strontium-doped calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 20 (7), 1505–1512.
66. Tie, D., Guan, R., Liu, H., Cipriano, A. et al. 2016. An in vivo study on the metabolism and osteogenic activity of bioabsorbable Mg-1Sr alloy. *Acta Biomaterialia*. 29, 455–467.
67. Tong, X., Gu, J., Song, R., Wang, D. et al. 2019. Osteoprotegerin inhibit osteoclast differentiation and bone resorption by enhancing autophagy via

AMPK/mTOR/p70S6K signaling pathway in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*. 120: 1630–1642.

68. Vamze, J., Pilmane, M. and Skagers A. 2012. Cytokine and HBD-2, -3, -4 expression in rabbit bone tissue after hydroxyapatite (Hap), α -tricalcium phosphate (α -TCP) and polymethylmetacrylate (PMMA) implantation. *FMNT issue of IOP conference series: Material Sciences and Engineering*. 38, 012025.

69. Viguet-Carrin, S., Garnero, P. and Delmas, P. D. 2006. The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis International*. 17 (3): 319–336.

70. Walsh, M.C. and Choi, Y. 2014. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Frontiers in Immunology*. 5, 511.

71. Wornham, D. P., Hajjawi, M. O., Orriss, I. R. and Arnett, T. R. 2014. Strontium potently inhibits mineralisation in bone-forming primary rat osteoblast cultures and reduces numbers of osteoclasts in mouse marrow cultures. *Osteoporosis International*. 25 (10), 2477–2484.

72. Xiao, M., Inal, C. E., Parekh, V. I., Li, X. H. et al. 2009. Role of NF-kappaB in hematopoietic niche function of osteoblasts after radiation injury. *Experimental Hematology*. 37 (1), 52–64.

73. Xie, H., Gu Z., Hec, Y, Xuc, J. et al. 2018. Microenvironment construction of strontium-calcium based biomaterials for bone tissue regeneration: the equilibrium effect of calcium to strontium. *Journal of Materials Chemistry B*. 6, 2332-2339.

74. Xie, H., Wang, Q., Ye, Q., Wan, C. et al. 2012. Application of K/Sr co-doped calcium polyphosphate bioceramic as scaffolds for bone substitutes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 23 (4), 1033–1044.

75. Yamaguchi, M. and Weitzmann, M. N. 2012. The intact strontium ranelate complex stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis by antagonizing NF- κ B activation. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 359 (1-2), 399–407.

76. Young, S., Bashoura, A. G., Borden, T., Baggett, L. S. et al. 2008. Development and characterization of a rabbit alveolar bone nonhealing defect model. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. 86 (1), 182–194.

77. Yuan, X., Cao, H., Wang, J., Tang, K. et al. 2017. Immunomodulatory Effects of Calcium and Strontium Co-Doped Titanium Oxides on Osteogenesis. *Frontiers in Immunology*, 8, 1196.

78. Zhang, Q., Chen, B., Yan, F., Guo, J. et al. 2014. Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. *BioMed Research International*. 284836.

79. Zhang, Y., Wei, L., Chang, J., Miron, R. J. et al. 2013. Strontium-incorporated mesoporous bioactive glass scaffolds stimulating in vitro proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells and in vivo regeneration of osteoporotic bone defects. *Journal of Materials Chemistry B*. 1 (41), 5711–5722.

80. Zhu, S., Hu, X., Tao, Y., Ping, Z. et al. 2016. Strontium inhibits titanium particle-induced osteoclast activation and chronic inflammation via suppression of NF- κ B pathway. *Scientific Reports*. 6, 36251.

Publikācijas par pētījuma tēmu

Zinātniskie raksti (5)

1. **Zarins, J.**, Pilmane, M., Sidhoma, E., Salma, I., Locs, J. 2019. The Role of Strontium Enriched Hydroxyapatite and Tricalcium Phosphate Biomaterials in Osteoporotic Bone Regeneration. *Symmetry*. 11 (2), 229.

2. **Zarins, J.**, Pilmane, M., Sidhoma, E., Salma, I., Locs, J. 2018. Immunohistochemical evaluation after Sr enriched biphasic ceramic implantation in rabbits femoral neck: comparison of seven different bone condition. *Journal of Materials Sciencs: Materials in Medicine*. 20, 29 (8), 119.

3. **Zarins, J.**, Pilmane, M., Sidhoma, E., Salma, I., Locs, J. 2017. Local and Systemic Morphofunctional Response of Osteoporotic Rabbits Bone Defect Following Implantation of Strontium Doped Biphasic Ceramic Granules. *Solid State Phenomena*. 267, 124–131.

4. **Zarins, J.**, Pilmane, M., Sidhoma, E., Salma, I., Make, K. 2016. Quantitative Changes of Bone Volume and Immunohistochemical Analysis of Biomarkers in Healthy, Osteoporotic and Osteoporotic Sham Surgery Affected Rabbit Bone Controls. *Key Engineering Materials*. 721, 234–239.

5. **Zarins, J.**, Pilmane, M., Sidhoma, E., Salma, I. 2016. Does Local Application of Strontium Increase Osteogenesis and Biomaterial Osteointegration in Osteoporotic and Other Bone Tissue Conditions: Review of Literature. *Acta Chirurgica Latviensis*. 16 (2), 17–23.

Tēzes un prezentācijas starptautiskās konferencēs (6)

1. **Zarins J.**, Pilmane M., Sidhoma E., Salma I, Locs J. Hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate granules enriched with strontium induce improved bone

regeneration in osteoporotic bone: comparison between 11 different bone conditions. In: *Twenty First Yucomat 2019 and the Eleventh WRTCS 2019 Conference*, Herceg-Novi, Melinkalne, 2019, tēžu grāmata: 75 (Mutiska prezentācija).

2. **Zarins J.**, Pilmane M., Sidhoma E., Salma I, Locs J. Expression Changes of IL-1, IL-10, OPG, MMP2, BMP2/4 and NFkB105 in Experimentally Induced osteoporotic and Healthy Rabbit Bone. In: *The 25th International Baltic Conference of Engineering Materials and Tribology, Baltmattrib*, Rīga, Latvija, 2017, tēžu grāmata: 26. (Mutiska prezentācija).

3. **Zarins J.**, Pilmane M., Sidhoma E., Salma I, Loca D., Locs J. Morphofunctional response of rabbits bone after implantation of strontium doped biphasic ceramic granules. In: *International Baltic conference "Materials Engineering 2017"*, Kauņa, Lietuva, 2017, tēžu grāmata: 19. (Mutiska prezentācija).

4. **Zarins J.**, Pilmane M., Sidhoma E., Salma I, Locs J. Strontium enriched calcium phosphate ceramics improve bone regenerative properties in constant osteoporotic femoral neck bone. In: *Rīga Stradiņš University International Conference on Medical and Health Care Sciences*, Rīga, Latvija, 2019, tēžu grāmata: 564. (Stenda referāts).

5. **Zarins J.**, Pilmane M., Sidhoma E., Salma I, Locs J. Bone Analysis of Strontium Doped Biomaterials in Osteoporotic Rabbits: comparison between Healthy, Osteoporotic and Trauma Affected Bone. In: *World Congress on Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases*, Florence, Itālija, 2017, tēžu grāmata: 128. (Stenda referāts).

6. **Zarins J.**, Pilmane M., Sidhoma E., Salma I, Loca D., Locs J. Reactogenicity of healthy and osteoporotic rabbits bone after implantation of biomaterials with and without strontium (Sr). In: *Baltic Morphology Congress*

IX, Tartu, Igaunija, 2017, tēžu grāmata: 69. (Stenda referāts – apbalvojums “Labākais stenda referāts”).

Tēzes un prezentācijas vietēja mēroga konferencēs Latvijā (3)

1. Pilmane M., Maķe K., Šlama I., Šlams G., Ločs J., **Zariņš J.** Kaulu tilpuma pētījumi veselu un osteoporozes skartu trušu kaulos pēc dažādu biomateriālu implantācijas. In: *Rīgas Stradiņa universitātes 2017. gada Zinātniskā konference*, Rīga, Latvija, 2017, tēžu grāmata: 42. (Stenda referāts).

2. **Zariņš J.**, Pilmane M., Sidhoma E., Šalma I., Ločs J., Loča D. Osteoporotisku trušu kaulvielas morfofunkcionālais raksturojums pēc hidroksiapatīta un trikalcija fosfāta granulu implantācijas ar vai bez stroncija jonu klātbūtnes. In: *Rīgas Stradiņa universitātes 2017. gada Zinātniskā konference*, Rīga, Latvija, 2017, tēžu grāmata: 43. (Mutiska prezentācija).

3. **Zariņš J.**, Pilmane M., Sidhoma E., Šalma I., Ločs J. Osteoporotisku trušu kaula defekta reģenerācijas īpatnības 12 nedēļas pēc stroncija saturošu bifāzisku keramikas granulu implantācijas. In: *Rīgas Stradiņa universitātes 2018. gada Zinātniskā konference*, Rīga, Latvija, 2018, tēžu grāmata: 23. (Stenda referāts).

Pateicības

Vislielākā pateicība manai darba vadītājai *Dr. habil. med.* profesorei **Mārai Pilmanei** par iedrošinājumu uzņemties pētniecību, par ievadīšanu interesantajā zinātnes pasaulē, par neiedomājamāko atbalstu un vērtīgajiem padomiem visa pētniecības procesa gaitā.

Ļoti pateicos otrai darba vadītājai *Dr. med.* **Elgai Sidhomai** par veltīto laiku, palīdzību un padomiem darba tapšanas gaitā.

Liels paldies darba konsultantei *Dr. med.* **Ilzei Šalmai** par padomiem un atbalstu pētniecības laikā.

Pateicos par atbalstu Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas Morfoloģijas laboratorijas laborantei **Natālijai Morozai** par palīdzību preparātu sagatavošanā.

Liels paldies *Dr. sc. ing.* profesoram **Jānim Ločam** un Rīgas Tehniskās universitātes Vispārīgās ķīmijas tehnoloģijas institūtam, Rūdolfa Cimdiņa Rīgas biomateriālu inovāciju un attīstības centram par sadarbību.

Paldies arī visiem mani draugiem, kuri spēja veldzēt darba nogurumu un uzlādēt jaunus spēkus.

Vislielākais paldies sievai **Elīnai** un dēlam **Miķelim** par atbalstu, pacietību un sapratni. Sirsnīgs paldies mani vecākiem **Inārai** un **Arnim**, māasai **Zanei**, krustmātei **Venitai** un vecmammām **Venerandai** un **Lidijai** par neatsveramo atbalstu, ticību un motivāciju.