

Jānis Zariņš

ORCID 0000-0003-1168-0921

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

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

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

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

Rīga, 2020

Anotācija

Kaulaudu reģenerāciju nodrošina osteocītu, osteoblastu un osteoklastu savstarpēja mijiedarbība, kas tiek regulēta, izdalot dažādus augšanas, remodelācijas un transkripcijas faktorus, iekaisuma un pretiekaisuma citokīnus. Muskuloskeletālo slimību, tostarp osteoporozes, vai smagu traumu gadījumā tiek izjaukts fizioloģiskais kaula metabolisms, un ķirurģiska kaula patoloģiju ārstēšana var radīt palielinātu lūzumu nesaaugšanas un metāla konstrukciju migrācijas risku. Lai novērstu šīs komplikācijas, implantanti tiek bagātināti ar dažādu metālu joniem, tādējādi veidojot fizioloģiski aktīvu biomateriālu, kurš uzlabo kaula reģenerācijas īpašības. Viens no tādiem ir stroncijs (*Sr*), kura ķīmiskās īpašības ir līdzīgas kaulos sastopamajam kalcijam (*Ca*). Tādējādi ir iespējama *Sr* jonu apmaiņa kaula remodelācijas laikā, un tas rosina *Sr* jonu pievienošanu, veidojot jaunus biomateriālus. *Sr* vienlaicīgi spēj stimulēt jaunas kaulvielas veidošanos un kavēt osteoklastu aktivitāti kaula noārdīšanās procesā. Lai izprastu *Sr* radītās izmaiņas reģenerācijas procesā, nepieciešams izvērtēt kaulvielas homeostāzei nozīmīgu faktoru funkcionalitāti dažādos kaula stāvokļos.

Pētījuma mērķis bija noteikt un salīdzināt kaulu remodelācijas, mineralizācijas, augšanas faktoru, imunitātes un osteoklastoģenēzes marķierus veselu un osteoporotisku trušu kaulā pēc divfāzisku vai trīsfāzisku stronciju saturošu biomateriālu implantācijas.

Pētījumā tika iekļautas 46 trušu mātītes, no kurām 10 veidoja veselo jeb kontroles trušu grupu, bet 36 tika ierosināta osteoporoze ar ovarektomijas un glikokortikosteroīdu palīdzību. Osteoporozes skartiem trušiem labās kājas augšstilba kaulā tika izveidots kaula defekts, kurš tika aizpildīts ar hidroksilapatītu (*HA*) 30% un trikalcijs fosfāta (*TCP*) 70 %, 5 % *Sr* bagātinātām *HA*₃₀/*TCP*₇₀, *HA*₇₀/*TCP*₃₀, *Sr-HA*₇₀/*TCP*₃₀ granulām vai atstāts neaizpildīts, veidojot tukšas kontroles grupu jeb tā saucamo *sham* operāciju. Audu paraugi tika iegūti 12 nedēļas pēc implantācijas, un tika analizēti arī audu paraugi no neoperētās kājas. Morfoloģiski tika izpētītas veselu un osteoporotisku kaulaudu apjoma īpatnības. Ar imūnhistoķīmijas metodi tika novērtēts osteoproteģerīna (*OPG*), nukleārā faktora kappa beta-105 (*NFκB-105*), osteokalcīna (*OC*), kaula morfoģenētiskā proteīna-2/4 (*BMP-2/4*), matricas metaloproteināzes-2 (*MMP-2*), matricas metaloproteināzes-2 audu inhibitora (*TIMP-2*), kolagēna-1-alfa (*Col-1α*), interleikīna-1 (*IL-1*) un interleikīna-10 (*IL-10*) imūnreaktīvo struktūru relatīvais daudzums.

Kontroles grupas trušu kaula uzbūvi veidoja kompaktā kaulviela ar osteonu kanāliem, kuros atradās asinsvadi, un porainā kaulviela ar izteiktām kaula trabekulām, osteocītiem un sarkanajām kaula smadzenēm ar taukšūnām. Savukārt osteoporotisku trušu kaulaudos kompaktās kaulvielas slānis bija plānāks un ar retākiem osteoniem, kuru kanālos novērojām izteiktāku saistaudu proliferāciju. Arī trabekulas bija ievērojami plānākas un retākas. Sarkanās

kaula smadzenes saturēja ievērojami vairāk taukšūnu. Šādas audu pārmaiņas tika novērotas visu osteoporotisko dzīvnieku audu paraugos. Kaula trabekulārais laukums veseliem trušiem vidēji bija $0,39 \text{ mm}^2$, savukārt osteoporotiskiem trušiem tas variēja no $0,21 \text{ mm}^2$ līdz $0,24 \text{ mm}^2$, kas bija statistiski ticami mazāk.

Osteoporotisku operētu trušu kaulaudos neatkarīgi no biomateriāla veida tika konstatēta palielināta *Col-1 α* , *BMP-2/4*, *TIMP-2* un *Il-1* atradne, salīdzinot ar veseliem trušiem. Vienīgi *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* spēj ierosināt lielāku *OC* un *NF κ B-105* ekspresiju, bet *HA₇₀/TCP₃₀* lielāku *Il-10* ekspresiju, kamēr *OPG* un *MMP-2* daudzums ir praktiski vienāds. Līdzīgi *sham* operācija spēj ierosināt lielāku *Col-1 α* , *TIMP-2* un *Il-1* ekspresiju, salīdzinot ar veseliem trušiem. Analizējot osteoporotisko trušu operētās un neoperētās kājas audu paraugus, ieguvām unikālas norādes, ka *sham* operācijas radītā trauma spēj palielināt tikai *Col-1 α* . Savukārt *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* un *HA₇₀/TCP₃₀* biomateriāli ierosināja palielinātu *Col-1 α* , *NF κ B-105*, *OC*, *OPG*, *BMP-2/4*, *MMP-2*, *TIMP-2*, *Il-1*, *Il-10* pozitīvo šūnu daudzumu. Analizējot audu paraugus operēto osteoporotisko trušu grupās, tika konstatēts, ka *Sr* klātbūtne ievērojami uzlabo osteoģenēzes, šūnu aktivitātes, kaulaudu mineralizācijas un remodelācijas rādītājus, bet nomāc osteoklastoģenēzi osteoporozes gadījumā. Savukārt *Il-1* un *Il-10* atradne osteoporotisko trušu audos pēc biomateriālu implantācijas vai *sham* operācijas bija līdzīga.

Osteoporotisku trušu kaulaudus raksturo samazināts kaula trabekulārais laukums un analizēto faktoru atšķirības, salīdzinot ar kontroles trušu audiem. Lai arī osteoporozes gadījumā ir samazinātas kaula remodelācijas spējas, mūsu rezultāti pierāda, ka gan audu traumai, gan biomateriāliem ir noteicošā loma kaula reģenerācijas rādītāju uzlabošanā salīdzinājumā pat ar veselu audu remodelācijas līmeni. Biomateriāli stimulē ekstracelulārās matricas remodelāciju, imūnmodulējošo darbību, osteoblastoģenēzes un mineralizācijas procesus ar šūnu aktivitātes palielināšanos, bet kavē osteoklastoģenēzi. *Sr* saturoši biomateriāli nepalielina iekaisuma procesus audos, bet tieši pretēji, saglabā stabilu imūnmodulējošo šūnu aktivitāti, līdzīgi kā audi traumas gadījumā. *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* implantētie biomateriāli ierosina visspilgtāko osteoporotisku trušu kaulaudu reģenerācijas potenciālu.

Atslēgvārdi: stroncijs, osteoporoze, truši, hidroksilapatīts, trikalcija fosfāts

Annotation:

Changes in bone structure following implantation of biphasic and triphasic strontium enriched biomaterials in animals with experimental osteoporosis

Bone regeneration is provided by complicated interaction between osteocytes, osteoblasts and osteoclasts, which is regulated by different morphogens, remodeling and transcription factors, inflammatory and anti-inflammatory cytokines. When bone physiological metabolisms is disrupted by a musculoskeletal disease such as osteoporosis or severe skeletal trauma, surgical treatment of the bone pathologies can lead to increased rate of the bone fracture, nonunion and metal implant dislocation. To overcome those complications, implants are enriched with different metal ions by creating physiologically active biomaterials to improve bone regeneration. One of them is strontium (Sr), which chemical properties are similar to calcium ions found in bone tissue. Incorporation of Sr during bone remodeling, has led to its local application in variety of biomaterials used in tissue engineering. Sr simultaneously can increase new bone formation and decrease osteoclast activity during bone resorption. However, to better understand Sr induced changes during bone remodeling, it is important to analyze interaction of biologically active factors within different bone condition.

The aim of the study was to determine and describe bone remodeling, mineralization, growth, immunological and osteoclastogenesis related factors in healthy and osteoporotic rabbits bone after implantation of biphasic and triphasic Sr enriched biomaterials.

Forty-six female rabbits were included in the study, where 10 of them composed a control group, but osteoporosis was induced in 36 by ovariectomy and glucocorticosteroids. Osteoporosis affected rabbits were further divided into groups, and bone defect in femur bone of right leg were filled with hydroxyapatite (HA) 30% and tricalcium phosphate (TCP) 70%, 5 % Sr enriched HA₃₀/TCP₇₀, HA₇₀/TCP₃₀, Sr-HA₇₀/TCP₃₀ granules or left empty in *sham* group. Tissue samples were obtained 12 weeks after implantation, where bone samples were taken either from left non-operated leg. Histomorphometry was used to analyze peculiarities of bone area between healthy and osteoporotic rabbits. Immunohistochemistry was used to evaluate osteoprotegerin (OPG), nuclear factor kappa beta-105 (NFkB-105), osteocalcin (OC), bone morphogenetic protein-2/4 (BMP-2/4), collagen-1-alpha (Col-1α), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 (TIMP-2), interleukin-1 (IL-1) and interleukin-10 (IL-10) containing structures between healthy and osteoporotic rabbits.

Bone structure of control group was formed by compact bone and osteon channels filled with blood vessels and cancellous bone with distinct bone trabeculae, osteocytes and red bone

marrow filled with adipose tissue. Unlike, osteoporotic bone structure showed notably thinner compact bone, less osteon channels, where high amount of connective tissue was found. Also bone trabeculae were notably thinner and less frequent. And red bone marrow consisted more adipose tissue. Such bone structural changes were found between all osteoporotic animals. Trabecular bone area in healthy rabbits was 0.393 mm², while in osteoporotic rabbits it varied from 0.206 mm² to 0.242 mm², which was significantly less.

Osteoporotic operated rabbit bone samples, regardless of used biomaterials, showed increased expression of *Col-1 α* , *BMP-2/4*, *TIMP-2* and *Il-1* compared to healthy animals. Only *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* bone samples were able to increase expression of *OC* and *NFkB-105*, and *HA₇₀/TCP₃₀* bone samples higher expression of *Il-10*, while number of *OPG* and *MMP-2* positive bone cells were almost equal. Similarly, *sham* bone samples showed higher expression of *Col-1 α* , *TIMP-2* and *Il-1* compared to healthy rabbits. Nevertheless, operated *sham* bone samples increased only expression of *Col-1 α* compared to non-operated leg. Whereas *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* and *HA₇₀/TCP₃₀* biomaterials induced higher expression of *Col-1 α* , *NFkB-105*, *OC*, *OPG*, *BMP-2/4*, *MMP-2*, *TIMP-2*, *Il-1*, *Il-10* compared to non-operated leg. Moreover, Sr enriched biomaterials compared to other study groups showed higher expression of osteogenesis, cellular activity, mineralization and remodeling related factors, while increasing osteoclastogenesis inhibitor factor *OPG* in osteoporotic bone condition. Distribution of *Il-1* and *Il-10* among osteoporotic bone samples was equal.

Osteoporotic bone structure is characterized by miscellaneous expression of analyzed factors. Despite decreased bone remodeling capacity under osteoporotic conditions, our results reveals that tissue trauma and implanted biomaterials improve bone regenerative properties compared to healthy bone. Biomaterials induce stimulation of bone matrix remodeling, immunomodulatory response, osteoblastogenesis, mineralization and bone cell activity, while suppress osteoclastogenesis. Sr enriched biomaterials do not increase inflammatory adverse reaction and maintain similar level to trauma induced pro- and anti-inflammatory response. *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* biomaterials induce most noticeable osteoporotic bone tissue response.

Keywords: strontium, osteoporosis, rabbit, hydroxyapatite, tricalcium phosphate

SATURS

Anotācija	2
Annotation:	4
Darbā lietotie saīsinājumi	8
Ievads	9
Darba aktualitāte	9
Darba mērķis	10
Darba uzdevumi	10
Darba hipotēze	11
Darba novitāte	11
Sadarbības partneri	12
Materiāli tehniskais nodrošinājums	12
Personīgais ieguldījums	12
Ētiskie aspekti	12
Promocijas darba struktūra un apjoms	12
1. Literatūras apskats	13
1.1. Kaula funkcionālā morfoloģija	13
1.2. Kaula reģenerācijas īpatnības	14
1.3. Osteoporozes loma kaula funkcionālās morfoloģijas un remodelācijas procesos	15
1.4. Kaula defektu aizvietošanas iespējas	16
1.4.1. Biomateriālu pielietošanas aktualitāte	16
1.4.2. Kalcija fosfāta keramika	17
1.4.3. Hidroksilapatīts	18
1.4.4. Trikalcija fosfāts	19
1.4.5. Divfāziska kalcija fosfāta keramika	19
1.5. Stroncija raksturojums	20
1.5.1. Stroncijs un kaulaudi	21
1.5.2. Stroncija darbības mehānisms	22
1.5.3. Stronciju saturošu biomateriālu ietekme kaulaudu reģenerācijā	23
1.5.4. Bioloģiski aktīvu vielu ekspresijas izmaiņas	23
1.5.5. Neoangiogēnēzes procesa ierosināšana	24
1.5.6. Stroncija ierosinātas lokālas un sistēmiskas šūnu atbildes reakcijas	24
1.5.7. Kaula apjoma izmaiņas stroncija ietekmē	25
1.6. Kaula pamatvielas un mineralizācijas faktori	26
1.6.1. Kolagēns 1 alfa	26
1.6.2. Osteokalcīns	27
1.7. Kaula deģenerācijas enzīmi un to nomācēji	27
1.7.1. Matrices metaloproteināze-2	27
1.7.2. Matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitors	28
1.8. Kaula reģenerācijas un šūnu funkcionālās aktivitātes rādītāji	28
1.8.1. Osteoproteģerīns	28
1.8.2. Nukleārais faktors kapa beta-105	29
1.8.3. Kaula morfogēnais proteīns-2/4	29
1.9. Kaula resorbcijas un lokālās imunitātes rādītāji	30
1.9.1. Interleikīns-1	30
1.9.2. Interleikīns-10	31
2. Materiāli un metodes	32

2.1.	Pētījuma grupas	32
2.2.	Eksperimentālās osteoporozes ierosināšana	33
2.3.	Biomateriālu raksturojums	33
2.4.	Biomateriālu implantācija	34
2.5.	Morfoloģiski izmeklējamais materiāls	35
2.5.1.	Rutinās histoloģijas metode	36
2.5.2.	Imūnhistoķīmijas metode un reaģenti	36
2.6.	Datu apstrādes metodes	38
2.6.1.	Kaula apjoma noteikšana	38
2.6.2.	Puskvantitatīvā skaitīšanas metode	38
2.6.3.	Datu apstrādes statistiskās metodes	39
3.	Rezultāti	40
3.1.	Rutinās morfoloģijas dati	40
3.1.1.	Kontroles grupas kaula struktūras raksturojums	40
3.1.2.	Osteoporotisko dzīvnieku kaula struktūras raksturojums	40
3.2.	Kaula apjoma mērījumi	41
3.3.	Kontroles un osteoporotisko dzīvnieku kaulā noteikto faktoru imūnhistoķīmiskais raksturojums	43
3.3.1.	Kaula pamatvielas un mineralizācijas faktori	43
3.3.2.	Kaula reģenerācijas un šūnu funkcionālās aktivitātes faktori	51
3.3.3.	Kaula deģenerācijas enzīmi un to nomācēj faktori	63
3.4.	Imūnhistoķīmiski noteikto faktoru savstarpējās korelācijas dati	79
4.	Diskusija	81
	Secinājumi	97
	Izmantotās literatūras saraksts	99
	Publikācijas par pētījuma tēmu	112
	Pateicības	114
	Pielikumi	115
	Ētikas komisijas atļauja	168

Darbā lietotie saīsinājumi

Abreviatūra	Nosaukums latviešu valodā	Nosaukums angļu valodā
<i>bFGF</i>	bāziskais fibroblastu augšanas faktors	basic fibroblast growth factor
<i>BMP</i>	kaula morfogēnais proteīns	bone morphogenetic protein
<i>BMP-2/4</i>	kaula morfogēnais proteīns 2/4	bone morphogenetic protein 2/4
<i>Ca</i>	kalcijs	calcium
<i>Col-1α</i>	kolagēns 1 alfa	collagen 1 alpha
<i>CPC</i>	kalcija fosfāta keramika	calcium phosphate ceramic
<i>ECM</i>	ekstracelulārā matrice	extracellular matrix
<i>HA</i>	hidroksilapatīts	hydroxyapatite
<i>Il-1</i>	interleikīns-1	interleukin-1
<i>Il-10</i>	interleikīns-10	interleukin-10
<i>Il-6</i>	interleikīns-6	interleukin-6
<i>MMP-2</i>	matrices metaloproteināze-2	matrix metalloproteinase-2
<i>MMPs</i>	matrices metaloproteināzes	matrix metalloproteinases
<i>NFκB</i>	nukleārais faktors kapa beta	nuclear factor kappa beta
<i>NFκB-105</i>	nukleārais faktors kapa beta-105	nuclear factor kappa beta-105
<i>OC</i>	osteokalcīns	osteocalcin
<i>OPG</i>	osteoproteģerīns	osteoprotegerin
<i>P</i>	fosfors	phosphorus
<i>RANK</i>	nukleārā faktora kapa beta receptora aktivators	receptor activator of nuclear factor kappa beta
<i>RANKL</i>	nukleārā faktora kapa 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>TGF-β</i>	transformējošais augšanas faktors beta	transforming growth factor beta
<i>TIMP-2</i>	matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitors	tissue inhibitor of metalloproteinase-2
<i>TNF-α</i>	tumoru nekrozes faktors alfa	tumour necrosis factor alpha
<i>VEGF</i>	vaskulārais endotēlija augšanas faktors	vascular endothelial growth factor

Ievads

Darba aktualitāte

Kaulaudu fizikālās un morfoloģiskās īpašības nodrošina osteoblastu un osteoklastu mijiedarbība, ko ietekmē sarežģīta savstarpēja komunikācija starp imūno un skeleta sistēmu, kuru regulē dažādas bioloģiski aktīvas vielas (Rucci, 2008). Slimības vai traumas gadījumā kaula fizioloģiskais metabolisms ir izjaukts, un var konstatēt novirzes no normālas kaula reģenerācijas. Svarīgi tas ir pacientiem, kuriem nepieciešama ķirurģiska ārstēšana un kaula rekonstrukcija, jo zemo kaula reģenerācijas spēju dēļ, īpaši osteoporozes gadījumā, var rasties komplikācijas, kas veicina invaliditāti un palielina ārstēšanas izmaksas (Luo et al., 2015). Līdz ar to joprojām ir aktuāli meklējumi pēc ideālu biomateriālu izveides.

Kalcija fosfāta keramika (*CPC*), visbiežāk hidroksilapatīta (*HA*) un trikalcija fosfāta (*TCP*) kombinācijā, tiek plaši lietota kā kaulu aizvietojošs materiāls, jo tās ķīmiskā uzbūve ir ļoti līdzīga cilvēka kaula minerālu sastāvam (Prakasam et al., 2017). *CPC* savienojumi spēj nodrošināt jonu apmaiņu, atbrīvošanu un piesaisti, lai nodrošinātu kaula homeostāzi (Cardemil et al., 2013). Līdz ar to ir iespējama *Ca* jonu aizvietošana ar citiem joniem, lai lokāli stimulētu kaulaudu reģenerāciju un biomateriāla integrāciju (Offermanns et al., 2018). Viens no tādiem ir stroncijs (*Sr*), kurš pēc bioloģiskajām īpašībām ir līdzīgs *Ca*, tādēļ spēj uzkrāties kaulaudos un ietekmēt kaula metabolismu (Andersen et al., 2015). *Sr* spēj aktivizēt osteoblastoģenēzi ar jaunas kaulvielas veidošanos un vienlaicīgi inhibēt osteoklastoģenēzi un kaulvielas noārdīšanos (Billström, 2014). Šīs unikālās īpašības veicina *Sr* jonu izmantošanu jaunu biomateriālu izveidē, taču ļoti svarīgi ir saprast kaulaudu strukturālās pārmaiņas un dažādu augšanas faktoru, šūnu aktivitātes indikatoru, remodelācijas faktoru, iekaisuma un pretiekaisuma citokīnu mijiedarbību kaula reģenerācijas laikā.

Viens no tiem ir osteokalcīns (*OC*), kura sekrēciju nodrošina osteoblasti, un tas regulē kaulvielas mineralizācijas procesu, veicinot *Ca* kristālu depoziāciju (Rodrigues 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*) regulē imūno sistēmu, citokīnu un augšanas faktoru ekspresiju un nomāc šūnu apoptozi (Bonizzi & Karin, 2004). Remodelācijas procesā *NFκB-105* veicina *RANKL* piesaisti *RANK* receptoram, kā rezultātā tiek aktivizēta osteoklastu diferenciācija un funkcija (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 M.S. et al., 2015). Kaula remodelācijas procesā nozīmīga loma ir matricas metaloproteināzes-2 (*MMP-2*), kas ir cinka atkarīgs proteolītiskais enzīms, un matricas metālproteināzes-2 audu specifisko inhibitoru (*TIMP-2*) mijiedarbībai organiskās kaula matricas komponentu, īpaši kolagēna, degradācijas procesā (Baker, Edwards & Murphy, 2002; Davis & Senger, 2005). *MMP-2* deficīta apstākļos izveidojusies kaulviela ir mazāk mineralizēta un ar samazinātu kaula mehānisko izturību (Alliston, 2014).

Kaula reģenerācijas procesā liela loma ir lokālai kaula imunitātei. Zināms, ka interleikīns-1 (*Il-1*) kā iekaisuma citokīns stimulē osteoklastogēnēzi, palielinot *RANKL* sintēzi, ierosina kaula resorbciju, kā arī *Il-1* spēj nomākt osteoklastu apoptozi (Compston, 2001). Turpretim interleikīns-10 (*Il-10*) kā pretiekaisuma citokīns spēj novērst tādu iekaisuma citokīnu kā *Il-1*, interleikīns-6 (*Il-6*) vai tumora nekrozes faktora alfa (*TNF-α*) sekrēciju (Schraufstatter et al., 2012). Svarīga *Il-10* nozīme ir kaulu remodelācijas procesā, kur spēj nomākt *RANK/RANKL* ierosinātu osteoklastu diferenciāciju un kaula resorbciju, netieši stimulējot *OPG* ekspresiju (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, kuriem osteoporozes līmenis būtu analogisks postmenopauzālai osteoporozei. Līdz ar to ir nepieciešama padziļināta izpratne par *Sr* saturošas kalcija fosfāta keramikas biomateriālu ierosinātām kaulaudu morfoloģiskām izmaiņām veselu un osteoporotisku trušu kaulos.

Darba mērķis

Noteikt un salīdzināt kaulu remodelācijas, mineralizācijas, augšanas faktoru, imunitātes un osteoklastogēnēzes marķierus veselu un osteoporotisku trušu kaulā ar eksperimentāli ierosinātu osteoporozi pēc divfāzisku vai trīsfāzisku stroncija jonu saturošu biomateriālu implantācijas.

Darba uzdevumi

1. Morfoloģiski izpētīt veselu un osteoporotisku kaulaudu apjoma īpatnības.
2. Ar imūnhistokīmisko metodi noteikt šādus kaula homeostāzes procesu ietekmējošus marķierus veselā un osteoporotiskā kaulā:

- osteokalcīns (*OC*) – kaulaudu mineralizācijas rādītājs;
- osteoproteģerīns (*OPG*) – osteoklastoģenēzes bloķētājs;
- nukleārais faktors kappa beta-105 (*NFκB-105*) – osteoklastu aktivizētājs, iekaisuma marķieris, šūnu aktivitātes rādītājs kombinācijā ar citiem faktoriem;
- kaula morfoģenētiskais proteīns-2/4 (*BMP-2/4*) – kaula augšanas un reģenerācijas rādītājs;
- matricas metālproteināzes-2 (*MMP-2*) – kaula matrici deģenerējošs enzīms;
- matricas metālproteināzes-2 audu inhibitors (*TIMP-2*) – kaula matrici deģenerējošā enzīma nomācējs;
- interleikīns-1 (*IL-1*) – kaula resorbcijas marķieris un iekaisuma citokīns;
- interleikīns-10 (*IL-10*) – lokālās imunitātes rādītājs un pretiekaisuma citokīns;

3. Statistiski salīdzināt iegūtos rezultātus starp grupām 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 *HA₃₀/TCP₇₀*, *Sr-HA₃₀/TCP₇₀*, *HA₇₀/TCP₃₀* un *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* 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.

Sadarbības partneri

Rutinās histoloģijas krāsošanas metode un imūnhistoķīmiskie izmeklējumi veikti Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūta Morfoloģijas laboratorijā. Pētījumam tika izmantoti nekomerciālie Rīgas Tehniskās universitātes Rūdolfa Cimdīņa Rīgas Biomateriālu inovācijas un attīstības centra izveidotie biomateriālu implantāti.

Materiāli tehniskais nodrošinājums

Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūta Morfoloģijas laboratorija un Morfoloģijas katedra nodrošināja visus nepieciešamos materiālus sekmīgai audu materiāla paņemšanai, fiksēšanai, imūnhistoķīmiskajai apstrādei, analīzei un mikrofotogrāfiju uzņemšanai. Rīgas Tehniskās universitātes Rūdolfa Cimdīņa Rīgas Biomateriālu inovācijas un attīstības centrs nodrošināja implantētos biomateriālus.

Personīgais ieguldījums

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

Ētiskie aspekti

Darbam ar trušiem ir 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 apskats”, “Materiāls un metodes”, “Rezultāti”, “Diskusija” un “Secinājumi”. Promocijas darba apjoms ir 168 lapaspuses, darbā ir 35 tabulas un 107 attēli (to skaitā mikrofotogrāfijas). Literatūras saraksts sastāv no 222 avotiem.

1. Literatūras apskats

1.1. Kaula funkcionālā morfoloģija

Kaulaudi sastāv no šūnām un starpšūnu matrices, kuru veido organiskie un neorganiskie kaula komponenti. Organisko kaula daļu veido kolagēns un citi nekolagēnie proteīni – proteoglikāni un glikozaminoglikāni, kuri ir nepieciešami kaula augšanai un reģenerācijai. Neorganiskā kaula daļa nodrošina kaulu stiprumu, un to galvenokārt veido *Ca* fosfāta sāļi hidroksilapatīta (*HA*) formā (Alliston, 2014).

Kaulā izšķir trīs šūnu tipus – osteoblastus, osteocītus un osteoklastus. Osteoblasti ir kaulu veidojošās šūnas, kuras atrodas vietās, kur notiek kaula matrices formēšanās nemineralizēta kaula jeb osteoīda veidā. Osteoblasti sekretē *Ca* saistošus proteīnus – osteopontīnu, osteokalcīnu (*OC*), osteonektīnu, I tipa kolagēnu un kaula morfogēnos proteīnus (*BMP*). Osteoblasti piedalās kaula matrices mineralizācijas procesa regulēšanā, jo izdala sārmaino fosfatāzi, kas veicina osteoīda kalcifikāciju (Neve, Corrado & Contatore, 2011). Osteocīti ir nobriedušās kaula šūnas, kas izolēti atrodas starpšūnu matricē, taču, pateicoties citoplazmatiskajiem izaugumiem, kuri atrodas kaula kanāliņu sistēmā, iespējama to savstarpēja komunikācija, asins gāzu apmaiņas un metabolītu evakuācija. Osteocītu galvenā funkcija ir saglabāt kaula matrici un nodrošināt mehanotransdukcijas signālu pārvadi, kas veicina gēnu ekspresiju, jauna kaula veidošanos un ierosina šūnu apoptozi. Osteocīti sekretē arī matrices metālproteināzes (*MMP*), kuras regulē kaula remodelācijas procesus (Sapir-Koren & Livshits, 2014). Savukārt osteoklasti ir kaulu noārdošās šūnas, kuras atrodas ciešā kontaktā ar kaula virsmu jeb t.s. kaula resorbcijas lakūnās. Osteoklasti ir lielas, daudzkodolainas šūnas, kuras veidojas, saplūstot hemopoētiskām mononukleārām šūnām. Osteoklastu prekursoro šūnu diferenciācija notiek makrofāgu koloniju stimulējošā faktora, tumora nekrozes faktora alfa (*TNF-α*) un dažādu interleikīnu ietekmē. Tās laikā tiek sekretēts tāds nozīmīgs transkripcijas faktors, kā nukleārais faktors kappa beta (*NFκB*), kurš ierosina sekojošu receptoru virsmas molekulu *NFκB* receptora aktivatora (*RANK*) ekspresiju, kas, savienojoties ar *NFκB* receptora aktivatora liganda (*RANKL*) signālmolekulu, ierosina osteoklastu diferenciāciju un aktivitāti. Nobrieduši osteoklasti satur resorbcijas enzīmus – katepsīnu K un *MMPs*, kas izdalās kaula noārdīšanās laikā. Resorbcijai beidzoties, osteocīts aiziet bojā ierosinātā apoptozes mehānisma rezultātā (Rucci, 2008).

Izšķir spongiozo un kompakto kaula daļu. Abas kaulvielas ir atrodamas visos kaulos, tikai to proporcija ir dažāda. Kaula spongiozo daļu veido kaula trabekulas, kas, savstarpēji savienojoties lamellām, veido tīklu, kurš pildīts ar kaula smadzenēm. Lamellās ir osteocītus

saturošās lakūnas un savstarpējie šūnu kanāli. Kompakto kaulu veido osteonu sistēma, kuras sastāvā ir koncentriskas lamellas ap osteona kanālu jeb Haversa kanālu, kurā ir nervi un asinsvadi. Osteona kanālā atveras kanāliņi, kuros atrodas osteocītu izaugumi. Folkmaņa kanāli ir novietoti perpendikulāri kaula asij, kas savieno Haversa kanālus ar periostu un endostu. Šāda arhitektūra nodrošina nepārtrauktu barības vielu pievadi, metabolītu aizvadīšanu un kaula inervāciju. Kaula ārējo slāni veido kaula periosts jeb šķiedrains saistaudu slānis, kurā ir daudz asinsvadu un osteoprogenitoro mazdiferenciēto šūnu. Savukārt kaula iekšējo slāni veido endosts, kas arī satur mazdiferencētas šūnas. Dažādu stimulu ietekmē osteoprogenitorās šūnas diferencējas par osteoblastiem (Kim J. N. et al., 2015).

1.2. Kaula reģenerācijas īpatnības

Kaula reģenerācija ir sarežģīts process ar vairākām cita citai sekojošām fāzēm (Schmidt-Bleek et al., 2016). Blīvā kaulviela, kaula smadzenes, periosts, apkārtējie muskuļaudi, nervi un asinsvadi, kaula šūnas, asinsrades šūnas, iekaisuma šūnas un aktivizētie signālu pārvades ceļi ierosina kaula reģenerāciju traumas rezultātā (Wu et al., 2015). Lūzuma zonā veidojas hematoma, kurā icaug proliferējoši fibroblasti un kapilāri, veidojot granulācijas audus, kuri kļūst blīvāki un pārveidojas par skrimšļaudiem, un spēj saturēt kopā kaula fragmentus. Tālāk notiek osteoblastu migrācija un spongiozās kaulvielas veidošanās, kura nomaina esošos skrimšļaudus, līdz notiek pilnīga kaula sadzīšana. Spongiozais kauls veidojas no kaula ārpusēs, līdz pilnībā tiek pārklāta visa skrimšļainā zona, kurai seko kaula nomaiņa centrālā virzienā. Tālāk jaunizveidotajā kaulā notiek remodelācijas process, kura laikā kauls iegūst savu mehānisko stabilitāti un spongiozais kauls tiek nomainīts pret kompakto kaulvielu, mijiedarbojoties osteoblastu un osteoklastu funkcijai (Bahney et al., 2019).

Remodelācija veicina vecā kaula noārdīšanos un nomaiņu pret jaunu kaulu. Pieaugušam cilvēkam ik gadu nomainās ~ 25% trabekulārā un ~ 3% kortikālā kaula (Wang & Yeung, 2017). Kaula remodelācija ir nepārtraukts process visas dzīves laikā, kas variē un ir atkarīgs no metabolo procesu ietekmes un no mehāniskā spēka, ko nodrošina pārvietošanās un fiziskās aktivitātes (Bala, Farlay & Boivin, 2013). Remodelācija sākas ar aktivizācijas fāzi, kad izdalītie faktori – insulīna augšanas faktors I, *TNF- α* , parathormons un *Il-6* – aktivizē kaula šūnas, kuras veicina *RANK/RANKL* veidošanos un osteoklastu aktivizāciju. Tai seko resorbcijas fāze, kurā osteocīti skābina vidi, izdala lizosomālos enzīmus un notiek kaula resorbcija. Kaulam rezorbējoties, veidojas *Ca* joni, šķīstošs neorganisks fosfāts un ūdens. Nākamajā – reversajā – fāzē aktivizējas makrofāgiem līdzīgas šūnas, kuras veic noārdītā kaula blakusproduktu aizvadīšanu. Un tad sākas veidošanās fāze, kurā izdalās bāziskais fibroblastu augšanas faktors

(*bFGF*) un transformējošais augšanas faktors beta (*TGF-β*), kas veicina osteoblastu augšanu un jauna kaula veidošanos (Rucci, 2008). Tālāk mineralizācijas fāzē jaunā kaulviela kalcificējas, nobriest un sasniedz kaula minerālā blīvuma maksimumu (Bala, Farlay & Boivin, 2013).

1.3. Osteoporozes loma kaula funkcionālās morfoloģijas un remodelācijas procesos

Osteoporoze ir biežākā kaula slimība, kurai raksturīga progresējoša kaula masas un blīvuma samazināšanās un izmainīta kaula arhitektūra. Tas notiek, kad veidojas disbalanss starp kaula rezorbciju un jauna kaula veidošanos, radot kaula masas samazināšanos un palielinot lūzumu risku. Mūsdienās, palielinoties kopējam sabiedrības vecumam un kļūstot aktīvākam dzīvesveidam, palielinās osteoporotisku lūzumu incidence – Eiropas Savienībā ik gadu tā sasniedz ap 3,5 miljoniem gadījumu (Hernlund et al., 2013).

Veseliem cilvēkiem osteoklastu veidošanos veicina parathormons, makrofāgu koloniju stimulējošais faktors, *Il-1*, *TNF-α* un *Il-6*. Savukārt sievišķie hormoni estrogēni, īpaši estradiols, nomāc citokīnu sintēzi un samazina osteoklastu aktivitāti. Postmenopauzes vecuma sievietēm hormonālā deficīta dēļ palielinās iepriekš minēto citokīnu sintēze un osteoklastu ierosināta kaula resorbcija. Osteopēnija izraisa kaula kvalitātes izmaiņas un mehāniskās izturības samazināšanos, kas vecāka gadagājuma pacientiem nelielu traumu gadījumos izraisa kaula lūzumus ar kaula masas zudumu (Winkler et al., 2018).

Biežākie ir augšstilba kaula, apakšdelma kaula un skriemeļu lūzumi, no kuriem tieši augšstilba kaula kakliņa lūzumiem ir vissliktākais sadzīšanas potenciāls. Tas ir tāpēc, ka, neskatoties uz adekvātu ķirurģisko fiksācijas metodi, līdz pat 22% pacientu veidojas kaula avaskulāra nekroze un metāla implanta dislokācija (Xu et al., 2017). Kaut arī ieaug jauni asinsvadi, traumas rezultātā izraisītas lokālas išēmijas ietekmē spontānā angiogēnēze notiek ilgāk un lēnāk nekā kaula dzīšana. Tādējādi rodas lielāka hipoksija un lūzuma nesaaugšanas risks (Novosel, Kleinhans & Kluger, 2011). Osteoporotiski lūzumi veicina invaliditāti, nepieciešamību pēc ķirurģiskas ārstēšanas, tie paildzina pacienta imobilizācijas nepieciešamību, paaugstina trombembolijas risku, kā arī ārstēšanas izdevumus. Ilgstošas imobilizācijas rezultātā kaulaudi nesaņem mehānisko stimulāciju, kas vēl vairāk veicina osteoporozi. Milliken et al. aprakstīja, ka pēc 3 mēnešu imobilizācijas augšstilba kaula masa samazinās par 20%, bet kaula minerālais blīvums – par 25–43%. Pētījumos pierādīts, ka kaulu minerālais blīvums palielinās tām postmenopauzes vecuma sievietēm, kuras regulāri nodarbojas ar sportu (Milliken et al., 2006).

1.4. Kaula defektu aizvietošanas iespējas

Audzēja un traumas izraisīts kaula defekts vai muskuloskeletālu slimību izraisītais kaula kvantitatīvas un kvalitatīvas īpašības joprojām ir nopietna un neatrisināta problēma medicīnā (Cassidy, 2014). Kaula defektu rekonstrukcija ir otra biežākā audu transplantācija pēc asins komponentu transfūzijām (Campana et al., 2014). Neskatoties uz autokaula, alokaula vai ksenokaula nozīmi kaula defektu aizvietošanā, to pielietošana var būt problemātiska, jo rada donorvietas paliekošu bojājumu, slimību transmisijas risku, infekciju attīstību un imūno nesaderību, kas veicina ārstēšanas izmaksu palielināšanos (Perez et al., 2018). Autokaula izmantošana šiem mērķiem ir galvenā izvēles metode, jo tā nodrošina atbilstošu audu, šūnu, apasiņošanas un atbalsta matricas transplantāciju, lai atjaunotu zaudēto kaula masu un ierosinātu jauna kaula veidošanos (Huang, Liu & Li, 2016). Donorvietas paliekošs bojājums, sarežģītā un trīsdimensionālā defekta forma ir lielākie trūkumi, kas patiesībā arī rosina jaunu kaulu aizvietojošu metožu attīstību, kuras spētu veicināt kaula saaugšanas potenciālu un paātrinātu pacienta atveseļošanās laiku (Shepherd et al., 2012). Neskatoties arī uz modernām kaula fiksācijas metodēm un ārstēšanu, joprojām 10–20% gadījumu veidojas kaula nesaaugšana, nestabilitāte, pievienojas infekcija un pasliktinās asinsrite, kas palielina kaula defektu un samazina sadzīšanas potenciālu (Killington et al., 2017). Pēdējo trīsdesmit gadu laikā ir noticis ievērojams progress jaunu, cilvēka organismam līdzīgu materiālu izveidē, īpaši tādu, ar kuriem iespējams aizvietot kaula defektus ortopēdijā, sejas žokļu un rekonstruktīvajā ķirurģijā (Guo et al., 2015). Jaunu materiālu izveide kombinācijā ar jaunām stratēģijām, stimulējot kaula reģenerāciju, attīstījusi multidisciplināru zinātnes nozari, kura nodarbojas ar audu inženieriju. Šo materiālu pielietojuma mērķis ir audu reģenerācijas lokāla stimulācija un spēja uzlabot kaula sadzīšanas potenciālu (Yu et al., 2015).

1.4.1. Biomateriālu pielietošanas aktualitāte

Materiālus, kurus paredzēts izmantot medicīnā, lai aizvietotu dzīva organisma audus, un kuriem jābūt ciešā kontaktā ar organisma iekšējo vidi, dēvē par biomateriāliem (Winkler et al., 2018). Lai veiksmīgi izveidotu jaunu kaulu, implantētajam biomateriālam jānodrošina mērķa šūnu atbilde uz ierosināto osteogēnēzes signālu un jānodrošina trīsdimensionāla kaula defekta aizvietošana, kas savukārt kļūst par platformu kaula šūnu augšanai, asinsvadu ieaugšanai un jaunas kaulvielas veidošanai (Helder et al., 2018). Biomateriāliem jāveicina kaula mehāniskā stabilitāte un jāierosina reģenerācija. Pēdējo nodrošina osteokonduktivitāte, osteoinduktivitāte, osteogēnēze un osteointegritāte (Wang & Yeung, 2017). Īpaši svarīgi, lai biomateriāli

ierosinātu mehānismus, kas veic bojāto audu aizvietošanu ar jauniem kvalitatīviem kaulaudiem (Ghomi, Jaberzadeh & Fathi, 2011). Ideālam biomateriālam jābūt ar labu biosaderību, netoksiskam, jāspēj sadalīties organisma iekšējās vides ietekmē, jāspēj nodrošināt jaunu asinsvadu ieaugšanu un jāveido ciešs kontakts starp tā virsmu un kaulu (Byambaa et al., 2017). Svarīgi, lai biomateriāls, īpaši sākumā, neierosinātu agrīnu imūno audu atbildes reakciju, jo osteoprogenitorās šūnas nespēj izdzīvot, ja ir zems pH un augsta kālija un nātrijs jonu koncentrācija (Lee, Kasper & Mikos, 2014). Visvairāk pētītie un pielietotie biomateriāli ir stikls, stikla keramika, keramika un kompozītmateriāli, kurus ar nanotehnoloģiju palīdzību papildina dažādas bioloģiski aktīvas vielas (Winkler et al., 2018).

Biokeramika pieder bioaktīvu biomateriālu grupai, kas organismā neizsauc lokālas vai sistēmiskas toksiskas reakcijas (Dorozhkin, 2010). Bioaktivitāte nozīmē, ka implantētais materiāls izraisa specifisku bioloģisku apkārtējo audu atbildes reakciju, kas veicina ciešu ķīmisku saišu veidošanos, tādējādi ierosinot jaunu asinsvadu veidošanos un cilmes šūnu proliferāciju (Yu et al., 2015). Visbiežāk pielietotā un pētītā ir *Ca* fosfāta keramika (*CPC*). Pēdējo 40 gadu laikā *CPC* ir kļuvusi par nozīmīgu kaulu aizstājēju. *CPC* kā kaula aizvietojošā materiāla nozīme arvien palielinās, jo ar to iespējams radīt visdažādākās formas materiālus, kurus bagātina ar dažādiem joniem. Pēdējie atkarībā no kaula defekta vai slimības stāvokļa spēj ierosināt specifisku kaula reģenerāciju un var veicināt kaula remodelāciju vēlamā virzienā (Lobo & Arinze, 2010). *CPC* spēj adaptēties organisma metabolajiem procesiem un, integrējoties molekulārā līmenī ar esošo kaulvielu, spēj sadalīties un aizvietoties ar jauniem kaulaudiem (Dorozhkin, 2012b). Unikālo īpašību dēļ *CPC* savienojumus izmanto, lai aizpildītu kaulu defektu, uzlabotu metāla implanta saderību ar apkārtējiem audiem, uzlabotu audu reģenerāciju, un tie var darboties kā lokāla zāļu piegādes sistēma (Dorozhkin, 2012).

1.4.2. Kalcija fosfāta keramika

Kalcija fosfāta keramika (*CPC*) tiek plaši lietota kā kaulu aizvietojošs materiāls, jo tās ķīmiskā uzbūve ir ļoti līdzīga cilvēka kaula minerālu sastāvam (Prakasam et al., 2017). Svarīgi, ka *CPC* nav toksiskas iedarbības uz apkārtējiem audiem un to neatpazīst kā organismam svešu materiālu. Tādējādi *CPC* integrējas dzīvos imūnkompetentos audos, nodrošinot kvalitatīvu sasaisti starp implantu un kaulu (osteointegritāte) (LeGeros, 1993). *CPC* lieto kā platformu jaunas kaulvielas veidošanai, veicinot osteoblastu piesaisti un proliferāciju (osteokonduktivitāti) (Anselme, 2000). *CPC* piemīt osteoinduktīvas īpašības, proti, tā veicina jauna kaula veidošanos dažādos līmeņos. Pirmkārt, audu līmenī tiek aktivizēta barības vielu un skābekļa piegāde un metabolo gala produktu novadīšana, kā arī angiogēnēzes stimulēšana.

Otrkārt, šūnu līmenī tiek stimulētas cilmes šūnas un ierosināta osteoprogenitoro šūnu diferenciācija. Turklāt izdalītie *Ca* un fosfora (*P*) joni ierosina spēcīgāku šūnu migrācijas hemotaksi. Treškārt, molekulārā līmenī tiek veicināta dažādu *BMP* izdalīšana (Yu et al., 2015).

CPC visbiežāk tiek veidota no *HA*, α vai β trikalcija fosfāta (*TCP*) vai kā divfāziski *Ca* fosfāta savienojumi (*HA* un *TCP* kombinācija) (Lecomte et al., 2008; Dorozhkin, 2015). Resorbējama biokeramika noārdās noteiktā laika posmā, un to pakāpeniski aizvieto paša organisma audi. Problēmas, kas rodas, izmantojot rezorbējamo biokeramiku, ir saistītas ar materiāla spējām saglabāt izturību un stabilitāti visu laika periodu, līdz tas tiek pilnībā noārdīts. Svarīga ir arī resorbcijas ātruma kontrole un pašas *CPC* sastāva pārmaiņas organismā (Prakasam et al., 2017). Lielākais *CPC* trūkums ir tās nelielā mehāniskā izturība un zemā slodzes rezistence, ko pastiprina materiāla porozitāte. Tomēr tā ir nepieciešama jaunu asinsvadu ieaugšanai un kaula šūnu kolonizācijai (Lecomte et al., 2008; Winkler et al., 2018). Līdz ar to tīru *CPC* izmanto nelielu audu defektu aizvietošanai vai kā pārklājums metāla implantiem, uzlabojot to integrāciju apkārtējos audos (Dorozhkin, 2012). Papildus keramiskais pārklājums novērš berzes spēku ietekmi uz implantu un iespējamo metalozes attīstību, tādējādi paildzinot implanta noturību un nepieciešamību pēc tā atkārtotas maiņas (Dorozhkin, 2010). Keramikas izturību iespējams regulēt, izmainot *Ca/P* attiecību biomateriāla izstrādes procesā. Mehāniskā noturība sasniedz savu maksimumu, ja *Ca/P* attiecība ir $\sim 1,67$, kuru palielinot, slodzes tolerance samazinās (Zhang et al., 2014). Tāpat mehāniskās īpašības iespējams uzlabot, samazinot daļiņu izmēru, palielinot to blīvumu un veicot *HA* sintēzi noteiktā temperatūrā (1000 °C, 1100 °C, 1200 °C, 1300 °C) (Thuault et al., 2014).

Bioloģiskie kaulu apatīti spēj nodrošināt jonu apmaiņu, atbrīvošanu un piesaisti, lai nodrošinātu kaula homeostāzi (Cardemil et al., 2013). Biokeramikas īpašību uzlabošanu iespējams veikt ar katjonu (*Ca*) un anjonu (fosfāta vai hidroksila grupa) aizvietošanu (Shepherd et al., 2012). Tā, piemēram, divfāziskiem *Ca* fosfāta savienojumiem pievienojot magnija (*Mg*) vai *Sr* jonus, var panākt ātrāku šo savienojumu rezorbciju (Winkler et al., 2018).

1.4.3. Hidroksilapatīts

Cilvēka kaula sastāvā ir 65–70% hidroksilapatīta (*HA*), kas veido neorganisko kaula substanci (Palmer et al., 2008). *HA* ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) var tikt veidots gan no sintētiski iegūtiem kalcija fosfātiem, gan no dabīga hidroksilapatīta izejvielām. *HA* ķīmiskā uzbūve un kristālveida struktūra līdzinās cilvēka kaula minerāliem, tādēļ tas spontāni spēj izveidot stabilu un ciešu virsmu sasaisti starp implantēto materiālu un apkārt esošo kaulu (Unal et al., 2017). *HA* regulē angiogēnēzi, jo tam piemīt tādu faktoru piesaiste kā epidermālais augšanas faktors,

vaskulārais endotēlija augšanas faktors (*VEGF*) un *bFGF* (Malhotra & Habibovic, 2016). *HA* priekšrocības salīdzinājumā ar citiem biomateriāliem ir tā paredzamais resorbcijas laiks, salīdzinoši vienkārša un lēta materiāla sintēze un kontrolēta audu morfoloģiskā atbildes reakcija (Zhao et al., 2013). Turklāt, pielietojot *HA* izveidē nanotehnoloģijas, šo materiālu var izmantot dažādu vielu pārnesei audos (Murugan & Ramakrishna, 2004).

Dabīgā un sintētiskā *HA* reaktivitāte atšķiras atkarībā no tā sagatavošanas metodēm. Tā, piemēram, sintētiskajam *HA*, kas gatavots augstā temperatūrā, ir raksturīgs augsts kristāliskums. Šāds *HA* tiek bioloģiski rezorbēts ļoti lēni. Parasti *HA* biokeramikas materiālus lieto mazu kaula defektu aizpildīšanai, lai aizvietotu kaula defektus vietās, kur nav nepieciešama liela slodzes tolerance nesošā kaula defektā (Dorozhkin, 2015). Pašlaik, lai varētu izmantot *HA* audu inženierijā, materiāla pagatavošana ir ievērojami attīstīta, uzlabojot tā mehāniskās un bioloģiskās īpašības, kā arī pievienojot tam dažādus metāla jonus, tostarp *Sr*, *Mg* un silīcija (*Si*) jonus (Boanini et al., 2011).

1.4.4. Trikalcija fosfāts

Trikalcija fosfāta (*TCP*) ($Ca_3(PO_4)_2$) savienojumā *Ca/P* attiecība ir 1,5. Savienojums rezorbējas ātrāk nekā *HA*. Implantējot trušiem *HA* un *TCP* granulas, pēc 6 mēnešiem *HA* masas zudums bijis 5,4%, bet *TCP* – 85,4% (Eggli et al., 1988). *TCP* ir vairāk savstarpēji savienotas poras, kas veicina jaunu asinsvadu izaugšanu (Fillingham & Jacobs, 2016). β -*TCP* ir līdzīga ķīmiskā uzbūve kā kaulaudu minerālvielām. Tā, piemēram, Prakasam *et al.* ziņoja par pilnīgu *TCP* granulu rezorbciju un porainās kaulvielas pārveidošanos žurkas lielajā liela kaulā. Tika atklāts, ka osteoklasti *TCP* saturošu kaula transplantātu noārda lēni – aptuveni 10 mēnešu līdz 2 gadu laikā (Prakasam et al., 2017). Fernandes *et al.* atklāja, ka mezenhimālās cilmes šūnas *TCP* klātbūtnē veicina vairāk jaunas kaulvielas veidošanos, kas savukārt nav novērojams *HA* implantiem (Fernandes & Yang, 2016). *TCP* keramika ir bioaktīva un nodrošina labu savienojumu izveidi starp šūnām un materiālu, radot labu osteokonduktivitāti, osteointegrāciju, bioaktivitāti un saderību. Tomēr *TCP* materiāliem nepiemīt osteoinduktīvas īpašības, jo, implantējot tos muskuļaudos, netiek novērota jauna kaula veidošanās (Chaaair, Labjar & Britel, 2017).

1.4.5. Divfāziska kalcija fosfāta keramika

Divfāzisku kalcija fosfāta keramiku veido *HA* un *TCP* savienojums. Tās arhitektūra ir nozīmīga, lai izveidotu labvēlīgu vidi osteogēnētisko šūnu piesaistei, proliferācijai,

diferenciācijai, ekstracelulārās matricēs (*ECM*) produkcijai un osifikācijai (Kasten et al., 2008). Implantētā biomateriāla virsmai jābūt pietiekami raupjai, lai migrējošās šūnas spētu cieši saistīties ar implantu; tā struktūrai jābūt pietiekami porainai, lai migrējošās šūnas spētu nonākt distāli no kaula virsmas, aktivizējot arī jaunu asinsvadu ieaugšanu un barības vielu transportu jauna kaula izveidei. Materiālam jābūt ar prognozējamu resorbcijas laika periodu, kas korelē ar jauna kaula veidošanās laiku – pieaugušam cilvēkam tie ir aptuveni divi gadi (Dorozhkin, 2010). Poru izmērs, struktūra un porozitātes apjoms ietekmē šūnu adhēziju – jo augstāka porozitāte un poru lielums, jo labāk izteikti starpporu savienojumi, kas nodrošina labvēlīgu šūnu pārvietošanos un kaula veidošanos. Poru arhitektūrai ir arī nozīme endotēlija šūnu migrācijā un jaunu kapilāru veidošanā (Rouwema et al., 2008). *HA* nodrošina osteokonduktivitāti un labu bioaktivitāti, bet *TCP* piemīt ātrāka resorbcijas spēja. Tāpēc, pateicoties *HA/TCP* kombinācijai, iespējams līdzsvars starp materiāla izturību un rezorbciju, veidojot labvēlīgu vidi jaunas kaulvielas veidošanai (Chen et al., 2017). Efektīvas biomateriāla remodelācijas priekšnosacījums ir balanss starp keramikas rezorbciju un jauna kaula ieaugšanu, ko iespējams panākt, kombinējot *HA* un *TCP* dažādās masas attiecībās (Helder et al., 2018). Biežāk pētītie ir *HA/TCP* savienojumi ar masas attiecību *HA*₂₀/*TCP*₈₀ vai *HA*₆₀/*TCP*₄₀ biomateriālu veidā, kur atklāts, ka šāda attiecība rosina efektīvāku jauna kaula veidošanos. Efekts līdzinās tam, kāds ir panākams pēc autologa kaula transplantācijas, vai ir lielāks, ja izmanto tīru *TCP* biomateriālu (Jensen et al., 2009; Yang et al., 2014). Chen et al. salīdzināja *HA*₃₀/*TCP*₇₀ un *HA*₇₀/*TCP*₃₀ biomateriālus *in vitro* cilvēka nabas saites vēnas endotēlija šūnās un novēroja lielāku šūnu proliferāciju un labāku angioģenēzi tieši pēc *HA*₃₀/*TCP*₇₀ pielietošanas. Svarīga ir arī poru arhitektūra, kas ietekmē šūnu adhēziju, proliferāciju un diferenciāciju (Chen et al., 2015).

Kaula remodelācijas procesos ir pierādīta *Sr* nozīme, jo tas ir ķīmiski un fizikāli saistīts ar *Ca* joniem. Šīs īpašības veicina *Ca* jonu aizvietošanu gan *HA*, gan *TCP* biomateriālos, veidojot trīsfāziskus savienojumus. Ir pierādīts, ka *TCP* demonstrē vienkāršāku *Sr* piesaisti, jo atšķirībā no *HA*, kas nodrošina tikai divas *Ca* vietas, *TCP* nodrošina piecas (Deng et al., 2018). *Sr* bagātināta *CPC* keramika ir plaši pētīta pēdējos gados, jo *Sr* veicina kaula stiprību, jauna kaula veidošanos un pat ārstē osteoporozi. *Sr* klātbūtne īpaši veicina keramikas bioaktivitāti, mehānisko stabilitāti un pātrina biomateriāla resorbcijas laiku (Zhu et al., 2017).

1.5. Stroncija raksturojums

Stroncija (*Sr*) atoma skaitlis ir 38. Tas pieder pie sārmezemju grupas metāliem, un tā jonu līdzība ar *Ca* joniem cilvēka kaulvielā nodrošina *Sr* iekļaušanos kaula remodelācijas procesos

(Andersen et al., 2013). *Sr* brīvā dabā visbiežāk atrodams okeāna ūdenī, pārtikas piedevās, graudaugos un jūras produktos (līdz pat 25 mg/kg). Cilvēks necīgos daudzumos to spēj uzņemt caur ādu vai plaušām. Vidējas miesasbūves cilvēks diennaktī ar pārtiku un šķidrumu uzņem ~ 1,9 mg *Sr* jonu, bet izdalās tas ar urīnu (0,34 mg), fēcēm (1,5 mg) un sviedriem (0,02 mg) (Nielsen, 2017). Cilvēka ķermenī 99% no kopējā *Sr* daudzuma atrodas jaunā trabekulārā kaulā, esot ciešā sasaistē ar dabīgo kaulu *HA* (Dahl et al., 2001). Tieši *Sr* spēja saistīties ar *HA* padarījusi *Sr* tik unikālu medicīnas un audu inženierijas zinātnēs. *Sr* piemīt kalcijam līdzīgas īpašības, tādēļ tas spēj brīvi iesaistīties kaula remodelācijas procesos (Andersen et al., 2013). Jaunā kompaktā kaulvielā *Sr* ir atrodams 3–4 reizes lielākā koncentrācijā, bet jaunā spongiozā tipa kaulvielā 2–3 reizes vairāk, jo kaula remodelācijas aktivitāte jaunā spongiozā kaulā ir lielāka nekā kortikālās kaula daļās (Verberckmoes & Debroe, 2003; Marie, 2005). Tomēr kopējā *Sr* koncentrācija ir ievērojami mazāka par *Ca* koncentrāciju un sastāda tikai ~ 3,5% no pieauguša cilvēka kopējā *Ca* apjoma (Bose et al., 2013).

1.5.1. Stroncijs un kaulaudi

Sr piemīt duāla ietekme – tas spēj veicināt jauna kaula veidošanos un vienlaikus samazināt tā noārdīšanos (Wang & Yeung, 2017). Tā efektivitāte ir pierādīta arī osteoporozes gadījumā – *Sr* joni veicina kvalitatīvas izmaiņas kaula struktūras organizēšanā un palielina mehānisko kaulu izturību (Iolascon et al., 2014). Sākotnēji *Sr* tika pētīts stroncija ranelāta sastāvā kā medikaments, kas ārstē pēcmenopauzes hormonālo izmaiņu ierosinātu osteoporozi. Eiropā tas reģistrēts 2004. gadā un lietots, lai samazinātu skriemeļu un gūžas kakliņa lūzumu risku (Reginster et al., 2015). *Sr* ranelāta efektivitāte, novēršot osteoporozes radītos iespējamus kaulu lūzumus, ir parādīta vairākos klīniskos pētījumos pacientēm ar pēcmenopauzes osteoporozi. Proti, *SOTI* (*Spinal Osteoporosis Therapeutic Intervention*) pētījumā tika atklāts, ka sievietēm pēc *Sr* ranelāta lietošanas ievērojami palielinājās kaula blīvums un uzlabojās dzīves kvalitātes rādītāji, bet skriemeļu lūzumu risks samazinājās par 33% (Meunier et al., 2004). Savukārt *TROPOS* (*Treatment of Peripheral Osteoporosis*) pētījumā tika noskaidrots, ka skriemeļu lūzuma risks samazinājās par 43%, gūžas kakliņa – par 24%, bet citu kaulu lūzumu risks – par 15% (Reginster et al., 2013). Arī *SEKOIA* (*Strontium Ranelate Efficacy in Knee Osteoarthritis Trial*) pētījumā pēc *Sr* ranelāta lietošanas trīs gadu garumā pēcmenopauzes sievietēm novēroja ievērojamu sāpju samazināšanos un kustību apjoma un funkcionalitātes palielināšanos. Šīm sievietēm, veicot magnētiskās rezonanses izmeklējumu, konstatēja skrimšļa masas zuduma un jaunu kaula bojājumu perēkļu samazināšanos (Pelletier et al., 2015). Diemžēl *Sr* ranelāta lietošana tiek saistīta ar tādām nopietnām blakusparādībām kā galvassāpes,

caureja, slikta dūša un ādas hipersensitivitāte (Rizzoli & Reginster, 2011). Joprojām ir aktuāls jautājums par to, vai Sr lietošana palielina miokarda infarkta un dziļo vēnu trombožu risku (Breart et al., 2010; Donneau & Reginster, 2014). Nevēlamo blakusparādību novēršanai pēc Sr sistēmiskās lietošanas zinātnieki pēdējos gados veikuši Sr bagātinātu biomateriālu izveidi un pētījuši tos dažādos *in vivo* un *in vitro* eksperimentos kaula remodelācijas procesa kvalitatīvai un kvantitatīvai novērtēšanai. Tomēr, neskatoties uz ievērojamo pētījumu skaitu, līdzšinējā literatūrā atrodamas tikai dažas publikācijas par Sr saturošu biomateriālu implantāciju cilvēkiem.

1.5.2. Stroncija darbības mehānisms

Sr joni veicina jauna kaula veidošanos un samazina tā noārdīšanos, vienlaikus pastiprinot kaulvielas mineralizāciju, kas savukārt nodrošina izteiktākas kaula mehāniskās īpašības (Brennan et al., 2009). Šūnu līmenī Sr joni stimulē osteoblastu darbību, bet nomāc osteoklastu funkciju. Iedarbojoties uz šīm šūnām, tiek izmainīta dažādu gēnu darbība un bioloģiski aktīvu vielu sintēze, kas attiecīgi ierosina kaula remodelācijas procesa aktivizāciju (Querido, Farina & Anselme, 2016). Sr iedarbojoties uz kaula šūnām, tiek ierosināti vairāki šūnu signālu pārvades mehānismi, kuri ietver dažādu bioloģiski aktīvu molekulu intensitātes regulāciju. Tādējādi tiek noteikta turpmākā kaula šūnu diferenciācija, proliferācija un izdzīvošana (Singh et al., 2014).

Sr ietekmē osteogēnēzi stimulējošu gēnu pastiprinātu ekspresiju un osteoblastu diferenciāciju. Pirmkārt, jāmin *Runx2* transkripcijas faktora gēns, kurš tiek aktivizēts, jo Sr stimulē mitogēnu aktivētās proteīnu kināzes fosforilizācijas procesu, kas veicina mehanoblastu diferenciāciju par osteoblastiem (Peng et al., 2009). Otrkārt, līdzīgi kā Ca joni, arī Sr joni spēj aktivizēt osteoblastus caur Ca jutīgiem receptoriem ar tam sekojošu šūnu replikācijas stimulēšanu arī caur mitogēnu aktivētās proteīnu kināzi un ekstracelulāriem signālu pārvades ceļiem *ERK 1/2* (Peng et al., 2011). Papildus Sr aktivizē *Akt* proteīnu kināzes pārvades ceļu, kas regulē osteoblastu apoptozes mehānismu (Fromigue et al., 2009). Treškārt, veicinātā osteoblastogēnēze un jaunas kaulvielas veidošanās ir saistīta ar Sr spēju aktivizēt kalcineirīnu, kas spēj izraisīt izmaiņas šūnu kodolos, palielinot šūnu replikāciju un *Wnt* gēnu izdalī. Šie gēni aktivē beta katenīnu un nomāc sklerozīna ekspresiju, kas savukārt ir *Wnt* gēna inhibitors (Rybchyn et al., 2011). Ceturtkārt, ļoti nozīmīgs transkripcijas faktors ir aktivētais T šūnu nukleārais faktors *1c*, kas regulē gēnu ekspresiju un efektīvāku osteoblastu darbību. Sr ietekmē aktivizējas šī faktora regulētie kanoniskie un nekanoniskie *Wnt* signālu pārvades ceļi, pastiprinot osteoblastu replikāciju (Fromigue et al., 2010). Piektkārt, osteoblastu nobriešanas

fāzē *Sr* joni uzlabo *bFGF* un tā receptora signālu pārvades ceļu (Caverzasio & Thouverey, 2011).

Svarīgs *Sr* pozitīvais efekts kaula remodelācijas veicināšanā ir saistāms ar osteoklastoģenēzes un kaula resorbcijas nomākšanu (Billström et al., 2013). Tas iespējams, jo *Sr* stimulē osteoproteģerīna (OPG) ekspresiju, kam ir liela loma kaulvielas metabolisma regulācijā caur *OPG/RANK/RANKL* mehānismu, samazinot *RANKL* sintēzi. Tādējādi tiek nomākta jaunu osteoklastu veidošanās (Atkins et al., 2009). Savukārt Bakker et al. atklāja, ka, vienlaikus aktivizējot kalcija jutīgos receptorus, *Sr* ietekmē jau nobriedušus osteoklastus un ierosina to apoptozi (Bakker et al., 2013).

1.5.3. Stronciju saturošu biomateriālu ietekme kaulaudu reģenerācijā

Ievērojot *Sr* pozitīvo ietekmi uz kaulaudiem, paplašinājusies tā eksperimentālā izpēte audu inženierijas zinātnē ar mērķi uzlabot kaulaudu reģenerāciju (Cianferotti et al., 2013; Prabha et al., 2019). Ņemot vērā *Sr* spēju vienlaikus nomākt kaula rezorbciju un veicināt jaunas kaulvielas veidošanos, *Sr* joni tiek iekļauti dažādu *HA*, *CPC*, *Ca* polifosfātu un bioaktīvu stiklu biomateriālu sastāvā (Billström et al., 2013). Vairākos pētījumus pierādīta *Sr* jonu lokāla darbība, uzlabojot dažādu biomateriālu labāku osteointegrāciju (Lu et al., 2019).

1.5.4. Bioloģiski aktīvu vielu ekspresijas izmaiņas

Pētījumos pierādīta *Sr* saturošu biomateriālu spēja stimulēt osteoblastu diferenciāciju un proliferāciju jaunas kaulvielas veidošanās procesā (Qiu et al., 2006). Šīs *Sr* funkcijas ir konstatētas kaula remodelācijas procesā nozīmīgu bioloģiski aktīvo vielu ekspresijas intensitātes pieaugumā vai samazinājumā. *In vitro* pētījumos atklāts, ka *Sr* jonu klātbūtne *HA* biomateriāla sastāvā pastiprina kolagēna sintēzi un bagātīgāku *HA* nogulsnešanos uz kolagēna fibrillām (Ni et al., 2006). Konstatēta arī *OC* un osteopontīna palielināta ekspresija, tādējādi uzlabojot kaula mineralizācijas pakāpi (Singh, Kumar & Lal, 2015). *Sr* bagātināta *CPC* ierosina arī sārmainās fosfatāzes, *OPG*, *BMP-2* izdalīšanos osteoblastu šūnu kultūrās (Panzavolta et al., 2008; Saidak & Marie, 2012). Salīdzinot tīra *HA* ierosinātas kaula reģenerācijas izmaiņas ar *Sr* izraisītām, tika konstatēts, ka *Sr* klātbūtne *HA* biomateriālā izraisa šūnu transkripcijas faktoru pieaugumu, osteoblastu proliferāciju un diferenciāciju (Yang et al., 2011). Savukārt *in vivo* pētījumos līdzīga kaulaudu atbildes reakcija ir novērojama *Sr* jonu klātbūtnes ietekmē neatkarīgi no biomateriāla veida. Implantējot ar *Sr* bagātinātu želejveida biomateriālu ovariectomizētu žurku garo stobrkaulu metafīzē, konstatēta izteiktāka jaunas kaulvielas

Sr spēj nomākt dažādu *MMPs* izdali, tādējādi novēršot pastiprinātu *ECM* noārdīšanos (Pelletier et al., 2013). Savukārt Andersen *et al.* novēroja, ka Sr saturoši titāna implantu ierosinātā *OPG* sintēze biomateriālam apkārtējos audos ievērojami samazina diferenciācijas antigēna un imūnkompetento šūnu marķiera *CD 68* daudzumu. Tas norāda uz nomāktu osteoklastu priekšteču veidošanos osteogēnēzes procesā (Andersen et al., 2013). Nozīmīga ir Sr spēja iesaistīties iekaisuma citokīnu sekrēcijas regulācijā, samazinot tādu iekaisumu veicinošu citokīnu kā *TNF- α* , *Il-1* (Fernández et al., 2013) un *Il-6* izdali (Römer et al., 2012).

vai sistēmisko ietekmi uz šūnām *Sr* implantācijas gadījumā. *Tie et al.* salīdzināja lokālas un sistēmiskas šūnu atbildes reakcijas pēc *Mg* saturoša biomateriāla implantācijas eksperimenta dzīvniekiem ar un bez *Sr* jonu klātbūtnes. Jāpiemin, ka *Mg* tiek uzskatīts par biosaderīgu un netoksisku ķīmisko elementu. Autori atklāja, ka šūnu hemolīze bija trīs reizes izteiktāka tīrā *Mg* grupā (7,13%) salīdzinājumā ar *Sr* grupu (2,54%). Pētījumā netika atrasti pierādījumi par *Sr* ierosinātiem lokāliem vai sistēmiskiem šūnu bojājumiem eksperimentālo trušu liesā, nierēs un aknās. Arī muskuļaudos netika konstatētas šūnu morfoloģiskās pārmaiņas vai šūnu nekrozes pazīmes. Kopumā orgānos nekonstatēja nekādus iekaisuma infiltrātus (*Tie et al.*, 2016). Lokālas šūnu toksicitātes pazīmes nekonstatēja arī pēc *Sr* saturošu *HA* implantācijas (*Hao J., Archarya et al.*, 2015). Tieši pretēji, analizējot *Sr* iespējamās blakusefektus, tika konstatēts, ka *Sr* klātbūtne palielina šūnu spēju izdzīvot dažādos apstākļos (*Lin et al.*, 2013; *Singh et al.*, 2014). Šis fenomens spilgti pierādīts pēc *Sr* saturošu biomateriālu implantācijas truša augšstilba kaulā, kur novērota izteiktāka osteoblastu proliferācija un dzīvotspēja (*Gu Z., Xie et al.*, 2013).

1.5.7. Kaula apjoma izmaiņas stroncija ietekmē

Kaulaudu reģenerācijas uzlabošanā svarīga ir jaunas kaulvielas veidošanās, kaula apjoms un mehāniskās īpašības (*Querido, Favina & Anselme*, 2015). Audu un biomateriālu saderības pētījumi liecina, ka *Sr* klātbūtne uzlabo osteoblastu migrāciju tuvāk implantam, un tas savukārt ierosina ciešāku jaunā kaula un implanta virsmu kontaktu (*Liu et al.*, 2015). Tādējādi tiek nodrošināta lielāka kaula mehāniskā stabilitāte un izturība (*Guan et al.*, 2013; *Tie et al.*, 2016). Vienaļpus tika konstatēts ievērojami lielāks jaunas kaulvielas apjoms ap implantu salīdzinājumā ar biomateriālu bez *Sr* (*Andersen et al.*, 2013). Savukārt *Hao et al.* parādīja, ka, veicot tikai vienu injekciju ar *Sr* saturošu *HA* želejveida biomateriālu, tika konstatēta vertikāla žurkas galvaskausa kaula masas palielināšanās salīdzinājumā ar kontroles grupu. Tika noskaidrots, ka *Sr* spēj aktivizēt periosta osteoblastu priekšteču šūnas, tādējādi paātrinot kaula dzīšanu un palielinot jaunās kaulvielas apjomu (*Hao J, Chou et al.*, 2015). Līdzīgi tika novērota ievērojami lielāka jauna kaula veidošanās žurku augšstilba kaulā pēc *Sr* saturošu *HA* implantācijas. Salīdzinot ar kontroles grupu, autori atklāja agrīnāku kaula masas veidošanos un nomāktu osteoklastoģenēzi veicinošo gēnu *CatK* un *CR* ekspresiju (*Elgali et al.*, 2016). Savukārt *Kuang et al.* izpētīja, ka *Sr* klātbūtne *CPC* biomateriāla sastāvā paātrināja tā degradāciju, osteokonduktivitāti un šūnu proliferāciju. Ievērojami lielāks jaunā kaula apjoms un mazāks esošā biomateriāla apjoms tika konstatēts implanta zonā 32 nedēļas pēc operācijas žurkas augšstilba kaulā (*Kuang et al.*, 2014). Pētījumā ar osteoporotiskām žurkām pēc *Sr* modificēta *CPC* biomateriālu implantācijas kaula defekta zonā tika konstatēts ievērojami

lielāks jaunā kaula daudzums ne tikai ap implantu, bet visā kaula defekta zonā. *Sr* joni tika atrasti pat 6 mm attālumā no implanta virsmas, liecinot par *Sr* jonu lokālu transportu un tā ietekmi jaunas kaulvielas veidošanās procesā (Thormann et al., 2013).

1.6. Kaula pamatvielas un mineralizācijas faktori

1.6.1. Kolagēns 1 alfa

Kolagēns veido lielāko daļu no kaula ekstracelulārās matricēs (*ECM*) proteīniem, un tā ekspresija liecina par agrīnām kaula mineralizācijas pazīmēm un *ECM* veidošanos. Kolagēns 1 alfa (*Col-1 α*) sastāv no trim polipeptīdu α ķēdēm, kas veido fibrilāras struktūras, nodrošinot kaula elastību un izturību pret stiepi, bīdi un spiedi (Tomoaia & Pasca, 2015). *Col-1 α* veido aptuveni 90–95% no visu kolagēnu kopuma un aptuveni 80% no kopējo proteīnu daudzuma kaulā (Alford et al., 2015). Osteoblasti sintezē kolagēna fibrillas un izdala tās vispirms šķīstoša prokolagēna formā, kas tālāk tiek modificēts par stabilu savienojumu. Kolagēna fibrillas sastāv no atkārtotas aminoskābju secības: glicīns, prolīns un hidroksiprolīns (Cui, Li & Ge, 2007). *Col-1 α* ir nozīmīgs kaulvielas kvalitātes rādītājs, un izmaiņas tā modifikācijas procesā ir atkarīgas no cilvēka vecuma. Līdz ar vecumu kaula struktūra destabilizējas, samazinās kaula mehāniskās īpašības un palielinās kaulu lūzumu risks (Viguet-Carrin, Garnero & Delmas, 2006).

Kolagēna fibrillas veido karkasu, lai varētu veidoties augsti organizēti apatītu kristāli, kuri novietojas uz fibrillām tādā virzienā, kādā vērstas pašas fibrillas. Savukārt kolagēna molekulas, veidojot fibrillas, ir novietojušās ar atstarpēm, kurās novietojas šie apatītu kristāli. Kolagēna fibrillas regulē kristālu lielumu un orientāciju. Elektronmikroskopijas izmeklējumos atklāts, ka attālums starp kolagēnu molekulām ir 67 nm, bet pašas atstarpes var būt pat līdz 40 nm (Ottani, Raspanti & Ruggeri, 2001).

Kaulaudos lielākā kolagēna depoziācija atrodama garo kaulu diafīzes kortikālajā slānī, kur fibrillas ir novietotas ļoti blīvi (Gorski, 1998). Postmenopauzes osteoporozes gadījumā ir lielāks kaula remodelācijas ātrums, kas veicina lielāku kolagēna sintēzi, taču ir samazināta tā kvalitāte, jo izveidotās fibrillas ir mazāka diametra un ar vājākām savstarpējām saitēm (Viguet-Carrin, Garnero & Delmas, 2006).

1.6.2. Osteokalcīns

Osteokalcīns (OC) ir zema molekulārā svara (5700 Da) vislielākais kaulaudu nekologēna tipa proteīns (Patti et al., 2013). Tā sintēze notiek kaula mineralizācijas fāzē, un to izdala nobrieduši osteoblasti, liecinot par kaula veidošanos (Rodrigues et al., 2012). OC sintēzi tieši ietekmē vitamīna D metabolīti, kas ierosina osteokalcīna gēnu *OG1* un *OG2* transkripciju (Wolf, 1996), bet karboksilēšanas regulācijā piedalās K vitamīns (Patti, 2013). OC ir *Ca* atkarīgs biomarķieris ar augstu piesaisti kaulam. OC uzskata par vienu no iespējamiem kaula veidošanās marķieriem, kas norāda kaula mineralizācijas pakāpi (Kuipers et al., 2012; Patti et al., 2013). OC kopā ar kolagēna šķiedrām veido režģi *HA* kristālu depozicijai. Karboksilētam OC ir vislielākā piesaiste *Ca* un citiem minerāliem, tāpēc OC strukturālas vai funkcionālas izmaiņas izsauc patoloģisku kaulaudu mineralizāciju, ietekmējot kaula mehāniskās īpašības, kas palielina lūzumu risku (Rodrigues et al., 2012). Hoang et al. ir pierādījis, ka OC piemīt arī spēja netieši aktivizēt transkripcijas faktoru *Runx-2*, kas savukārt nodrošina osteoblastu attīstību (Hoang et al., 2003). Savukārt Patti et al. ir atklājis OC līmeņa korelāciju ar osteoklastu ierosinātu kaula rezorbciju mineralizācijas laikā (Patti et al., 2013).

1.7. Kaula deģenerācijas enzīmi un to nomācēji

1.7.1. Matrices metaloproteināze-2

Matrices metaloproteināze-2 (*MMP-2*) pieder pie proteolītisko enzīmu saimes, kas ierosina organiskās kaula daļas matrices komponentu noārdīšanu. Tie ir cinka atkarīgie enzīmi, kam ir liela nozīme embriogēnēzē, audu reģenerācijas, fibrozes procesa un audzēja attīstības periodā (Löffek, Schilling & Franzke, 2011). Pētījumos ar dzīvniekiem atklāts, ka *MMPs* spēj ietekmēt tādus audu homeostāzi nodrošinošus procesus kā dažādu bioloģiski aktīvu molekulu izdali, šūnu proliferācija, diferenciācija un apoptoze (Mott & Werb, 2005). Kaulaudos *MMPs* nozīme ir tieši perilakunārās remodelācijas fāzē, kad osteocīti izdala *MMPs*, lai ierosinātu ekstracelulārās kaula matrices komponentu rezorbciju un aizvietošanu ar jaunu kaulvielu. Šis process nodrošināta kvalitatīvu *ECM* veidošanos (Tang et al., 2012).

MMP-2 jeb želatināze A spēj hidrolizēt želatīnu, denaturēto kolagēnu I, IV, V, VII un XI, fibronektīnu, laminīnu, agrekānu un elastīnu (Shimokawa et al., 2002). *In vivo* pētījumos pierādīts, ka *MMP-2* deficīta gadījumā jauna kaula *ECM* ir ar zemu mineralizācijas pakāpi un elasticitāti un samazinātu kaula mehānisko izturību, jo ir izjaukta kaula lakūnu un kanāliņu sistēma (Alliston, 2014). Tas izraisa signālu pārvades traucējumus starp osteocītiem un

osteoblastiem, veicinot patoloģisku jaunas kaulvielas veidošanos, jo palielinās osteocītu apoptoze un nespēja sintezēt sklerozīnu, kas nomāc osteoblastu funkciju (Krane & Inada, 2008).

1.7.2. Matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitors

Matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitors (*TIMP-2*) ir audu specifiskais *MMPs* inhibitors, kurš nodrošina *ECM* nomaiņu, audu remodelāciju un šūnu attīstību. Kopumā ir četri homologi saimes locekļi, no kuriem katrs var nomākt vairākas *MMPs*, tādējādi tieši un netieši regulējot kaulvielas nomaiņu (Baker, Edwards & Murphy, 2002). *TIMP-2* spēj nomākt *MMP-2* ierosinātu *ECM* proteolīzi kaulaudos. Gadījumos, kad ir *TIMP-2* pastiprināta sintēze, novēro patoloģisku *ECM* uzkrāšanos, kas ietekmē kaulvielas kvalitāti. Tāpēc normālas homeostāzes apstākļos jābūt stabilai *MMP-2* un *TIMP-2* ekspresijas attiecībai (Löffek, Schilling & Franzke, 2011). Pētījumos konstatētā korelācija, ka palielinoties *MMP-2*, palielinās arī *TIMP-2*, un otrādi, liecina, ka *MMPs* piedalās to inhibitoru ekspresijas regulēšanā (Kimura et al., 2010). *TIMP-2* ir neglikolizēts proteīns, kurš spēj nomākt visas *MMPs*. *TIMP-2* ir unikāla nozīme arī *MMPs* aktivācijā, jo ir pierādīts, ka tas selektīvi saistās ar membrānas tipa 1 proteīnu uz šūnu virsmas, aktivizējot *pro-MMP-2*, kas ir *MMP-2* neaktīvā forma. Tātad *TIMP-2* ir noteicoša loma *MMP-2* celulārās aktivizācijas fāzē (Bernardo & Fridman, 2003).

1.8. Kaula reģenerācijas un šūnu funkcionālās aktivitātes rādītāji

1.8.1. Osteoproteģerīns

Osteoproteģerīns (*OPG*) pieder pie tumora nekrozes faktora α saimes, kurai ir nozīme kaulaudu metabolisma regulācijā, ietekmējot signālu pārvadi starp osteoblastiem un osteoklastiem. *OPG* galvenā funkcija ir osteoklastu diferenciacijas un funkcijas nomākšana, bloķējot *RANKL* liganda saistīšanos pie osteoklastu prekursoru virsmas receptora *RANK* (Benslimane-Ahmin et al., 2013). *OPG* veido 380 aminoskābju liela ķēde ar septiņiem virsmas domēniem aktīvai receptoru piesaistei (Baud'huin et al., 2013). *OPG* sintezē osteoblasti, endotēlija šūnas un asinsvadu gludie miocīti. *TGF- β* , *Il-1*, *TNF- α* , estrogēni un *Wnt* gēna ligandi veicina *OPG* ekspresiju, bet prostaglandīns *E2* un glikokortikosteroīdi to nomāc (Walsh & Choi, 2003). Savukārt Liu et al. *in vitro* diferencietu osteoklastu pētījumā atklāja, ka *OPG* spēj ietekmēt osteoklastu dzīvildzi caur transmembrānu proteīna un tā liganda *Fas/FasL* sistēmu. Šī sistēma regulē šūnu apoptozi, jo *OPG* samazina mitohondriju kaspāzes kaskādes aktivitāti transmembrānu proteīna un tā liganda *Fas/FasL* sistēmā un izsauc osteoklastu bojāeju (Liu,

Yao & Wise, 2005). *OPG* sintēzes intensitāti var regulēt arī dažādi implantētie biomateriāli, nodrošinot stabilu *OPG/RANKL* savienojumu un osteoklastoģenēzes nomākšanu un veicinot kaulaudu reģenerāciju (Han et al., 2014). *OPG* ekspresijas pilnīgs izsīkums ierosina ātru kaulaudu rezorbciju vai pat ģeneralizētu to sabrukšanu *in vivo*. Samazināta *OPG* aktivitāte vērojama arī pēcmenopauzes osteoporozes sievietēm (Ueki et al., 2001).

1.8.2. Nukleārais faktors kapa beta-105

Nukleārais faktors kapa beta-105 (*NFκB-105*) pieder pie transkripcijas faktoru saimes, kas ietekmē imūno sistēmu un regulē citokīnu, augšanas faktoru un apoptozes inhibitoru sintēzi (Bonizzi & Karin, 2004). *NFκB* grupa regulē dažādu audu attīstību un diferenciāciju un ir iesaistīta iekaisīgu vai autoimūnu slimību attīstībā, leukēmijas, limfomas, resnās zarnas, olnīcu vai prostatas vēža attīstībā (Rayet & Gélinas, 1999). *NFκB-105* ir viens no pieciem saimes locekļiem, kas sastāv no 300 aminoskābju liela domēna. *NFκB-105* spēj saistīties ar DNS un ierosināt fosforilizēšanas un translokācijas procesus ar tiem sekojošu gēnu ekspresijas aktivizēšanu (Scheidereit, 2006). Šūnu stimulāciju un *NFκB* indukciju ietekmē arī *TNF-α*, *Il-1*, baktēriju lipopolisaharīdi un jonizējošais starojums (Chandel et al., 2000).

NFκB-105 ir nozīme kaulaudu mineralizācijā, un tā aktivitāti regulē *OPG/RANKL/RANK* mehānisms (Baud'huin et al., 2007). *In vivo* pētījumā tika pierādīts, ka *NFκB* gēna delēcijas gadījumā neatgriezeniski tiek bloķēta osteoklastoģenēze, kas izsauc osteopetrozi ar palielinātu kaulu lūzumu risku (Iotsova et al., 1997). Tas norāda *NFκB-105* nozīmi osteoklastu diferenciācijā. Li et al. atklāja, ka *NFκB-105* spēj nomākt osteoblastu diferenciāciju un aktivitāti, inhibēt transkripcijas faktoru *Runx-2* un samazināt *BMP* izdali (Eliseev et al., 2006; Li et al., 2007).

1.8.3. Kaula morfogēnais proteīns-2/4

Kaula morfogēnais proteīns-2/4 (*BMP-2/4*) ir multifunkcionāls augšanas faktors, kurš piedalās osteoblastu diferenciācijā un jaunas kaulvielas veidošanā (Li & Cao, 2006). *BMP* pieder pie *TGF-β* saimes. *BMP* veicina kaula veidošanos, stimulējot mezenhimālo cilmes šūnu diferenciāciju osteoblastos, kā arī ierosina sārmainās fosfatāzes, I tipa kolagēna un *OC* gēnu ekspresijas palielināšanos osteoblastoģenēzes laikā (Kim M. S., 2015). *BMP* koordinē kaula katabolo procesu, ietekmējot osteoklastu attīstību (Sánchez-Duffhues, 2015). Kaulos *BMP* sintēzi veic osteoblasti, endotēlija šūnas un hondrocīti. *In vivo* pētījumos dzīvniekiem ar *BMP* gēna iztrūkumu konstatēta agrīna embrija nāve ar skeleta attīstības anomālijām (Abou-Khalil

& Colnot, 2014). *BMP-2/4* aktivizē mineralizācijas procesu, ierosinot bagātīgu *Ca* deponēšanos kaula matricē (Kato et al., 2009). *BMP* piesaistoties pie transmembrānu receptoru kompleksa šūnas virsmā, ierosina intracelulāru signālu molekulu aktivizāciju ar tai sekojošu gēnu transkripciju. Viens no galvenajiem mehānismiem ir *BMP-2/4* spēja aktivizēt *Runx-2* transkripcijas faktoru, kurš mijiedarbojas arī ar *BMP* aktivizēto *SMAD* proteīnu, ierosina osteoblastoģenēzei nozīmīgu gēnu ekspresiju (Mukherjee & Rotwein, 2009). Izšķiroša loma *BMP-2/4* ir osteoporozes gadījumā, jo tā ekstracelulārā aktivitāte ir samazināta (Sanchez-Duffhues et al., 2015). *BMP* pēdējos gados plaši izmanto audu bioinženierijā osteoģenēzes uzlabošanai dažādos kaula stāvokļos. *Lin et al.* pētījumā ar žurkām *in vivo* un ar šūnu kultūrām *in vitro* novēroja cilmes šūnu migrāciju, diferenciāciju osteoblastos, jaunas kaulvielas veidošanos un ierosinātu angioģenēzi pēc *BMP-2* bagātinātu biomateriālu implantācijas (Lin et al., 2015).

1.9. Kaula resorbcijas un lokālās imunitātes rādītāji

1.9.1. Interleikīns-1

Interleikīns-1 (*Il-1*) pēc savas uzbūves ir polipeptīds, kas pieder pie iekaisuma citokīnu grupas, ko galvenokārt sintezē limfocīti un monocīti. *Il-1* ir tieša ietekme uz osteoklastu izraisītu kaula rezorbciju, jo tas veicina to proliferāciju un proosteoklastu diferenciāciju, palielina aktivitāti un nomāc osteoklastu apoptozi (Compston, 2001). Interleikīnam-1 izšķir trīs formas – *Il-1* α , β un *Il-1* receptoru antagonists (Lee et al., 2010). *Il-1* ierosina katēpsīna K aktivizāciju, kas aizsāk kaula rezorbciju (Skoumal et al., 2005). Preklīniskie pētījumi ir pierādījuši, ka *Il-1* ietekmē arī osteoblastu proliferāciju, kolagēna, osteokalcīna, sārmainās fosfatāzes sintēzi, respektīvi, nomāc jauna kaula veidošanos, kā arī spēj aktivizēt iekaisuma citokīna *Il-6* sintēzi (Neve, Corrado & Cantatore, 2011). Paaugstināts *Il-1* līmenis ir atrodams pacientiem ar osteoporozi, kura tiek veicināta, *Il-1* stimulējot *RANKL* sintēzi un pastiprinot osteoklastoģenēzes procesu (Hofbauer et al., 1999). Pētījumos ar pelēm, kurām veikta *Il-1* gēna delēcija, novēroja pastiprinātu kaula veidošanos, taču jaunais kauls nebija tik kvalitatīvs. Līdz ar to *Il-1* ir nepieciešams normālai kaula homeostāzei, taču postmenopauzes osteoporozes un osteoporotisku lūzumu gadījumā tiek novērots nevis *Il-1* gēnu polimorfisms, bet gan *Il-1* receptora antagonista gēnu polimorfisms, kas izjauc normālu receptoru un to antagonistu līdzsvaru un rada pazeminātu antagonista ekspresiju un pastiprinātu kaulu rezorbciju (Lee et al., 2010). Turpretim *Lange et al.* secināja, ka *Il-1* ietekmē arī osteoblastoģenēzi, stimulējot osteoblastu proliferāciju lūzumu gadījumā (Lange et al., 2010).

1.9.2. Interleikīns-10

Interleikīns-10 (*IL-10*) ir pretiekaisuma citokīns, kurš spēj bloķēt iekaisuma citokīnus, piemēram, *IL-1*, *IL-6*, *TNF- α* sintēzi (Schraufstatter et al., 2012). *IL-10* spēj nomākt *RANK/RANKL* ierosinātu osteoklastoģenēzi, jo nomāc osteoklastu priekšteču diferenciāciju (Park-Min et al., 2009), kura tiek realizēta, kavējot aktivēto T šūnu nukleārā faktora γ 1 ekspresiju un tālāku kodola translokāciju (Evan & Fox, 2007). Kaula rezorbciju nomāc, netieši pastiprinot *OPG* ekspresiju un vienlaikus samazinot *RANKL* ekspresiju (Liu et al., 2006). Pētījumos ar *IL-10* gēna deficīta pelēm konstatēja smagas osteoporozes attīstību ar samazinātu kaula masu un mehānisko izturību (Dresner-Pollak et al., 2004). Tas izskaidrojams ar to, ka *IL-10* gēna delēcijas gadījumā var novērot izteiktu *TNF- α* un interferona β iekaisuma mediatoru ekspresiju, kas nomāc osteoblastu diferenciāciju, proliferāciju un jau nobriedušu osteoblastu funkciju (Zhang et al., 2014). Pretēji *IL-1*, *IL-10* regulējošā gēnā var novērot polimorfismu, kas korelē ar samazinātu kaula blīvumu un predispozīciju uz postmenopauzes osteoporozi (Chen et al., 2005). Jung et al. atklāja divus nozīmīgus *IL-10* ietekmes veidus kaula remodelācijas procesā, proti, tas piedalās *MMPs* sintēzes regulācijā un *BMP* darbības mehānismu aktivizācijā kaula šūnās (Jung et al., 2013).

Lai arī mūsdienu literatūrā ir daudz publikāciju par *Sr* ietekmi uz organisma audiem, pielietojot *Sr* bagātinātus biomateriālus, joprojām ir aktuāli jautājumi par sarežģīto darbības mehānismu dažādas homeostāzes apstākļos, par biomateriālu un kaulaudu savstarpējo ietekmi, par kaula molekulārajiem procesiem dažādu bioloģiski aktīvu vielu sintēzes laikā. Mūsu pētījuma mērķis bija analizēt 11 dažādas audu paraugu grupas normālas un izmainītas homeostāzes apstākļos osteoporotiskiem trušiem pēc biomateriālu implantācijas, pēc traumas un veseliem trušiem, kā arī izvērtējot gan lokālas, gan sistēmiskas audu reakcijas viena dzīvnieka audu paraugos.

2. Materiāli un metodes

2.1. Pētījuma grupas

Pētījums tika veikts ar 46 trušiem (suga: Kalifornijas un Lielais Marders; dzimums: sievietes; vecums: 8 mēneši; audzētava: “Podziņas”, Ādažu novads, Latvija, LV-2164, novietnes Nr. 1382580, ganāmpulka Nr. LV06178330). Dzīvnieku aprūpe eksperimenta laikā veikta atbilstoši Rīgā, 2013. gada 22. janvārī izdotajiem Ministru kabineta noteikumiem Nr. 52 “Noteikumi par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību”. Truši tika izmitināti pa vienam 100 x 45 x 62 cm izmēra būros (atbilstoši iepriekš norādītajiem MK noteikumiem Nr. 52). Dzīvnieku barošanai tika izmantots pļavas siens un auzas, savukārt dzirdināšanai – krāna ūdens.

Truši tika sadalīti četrās eksperimentālās grupās (A, B, C un D grupa). Trušu sadalījums pa grupām ir aplūkojams 2.1. tabulā.

A grupas truši netika operēti un veidoja kontroles grupu.

B, C un D grupas trušiem tika ierosināta eksperimentāla osteoporoze.

B grupas trušiem labā augšstilba kaula kakliņa rajonā izveidotais defekts tika aizpildīts ar 5% Sr jonu bagātinātām HA/TCP granulām (masas attiecība 30/70) un granulām bez Sr klātbūtnes.

C grupas trušiem labā augšstilba kaula kakliņa rajonā izveidotais defekts tika aizpildīts ar 5% Sr jonu bagātinātām HA/TCP granulām (masas attiecība 70/30) un granulām bez Sr klātbūtnes.

D grupas trušiem labā augšstilba kaula kakliņa rajona izveidotajā defektā biomateriāli netika implantēti un defekts tika atstāts sekundārai dzīšanai, tie veidoja t.s. *sham* grupu.

2.1. tabula

Pētījuma dizains

Grupa	A	B		C		D
Statuss	Vesēlie	Sr-HA/TCP	HA/TCP	Sr-HA/TCP	HA/TCP	Sham
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.

2.2. Eksperimentālās osteoporozes ierosināšana

Medikamentu izvēle un devas ir balstītas uz iepriekš literatūrā aprakstītās metodoloģijas principiem (Baofeng et al., 2010; Meredith, 2015). Anestēzijas nodrošināšanai tika veikta intramuskulāra medikamentu ievade: ketamīna 10% (100 mg/ml) šķīdums ar devu 30 mg/kg ķermeņa svara, ksilazīna 2% (20 mg/ml) šķīdums ar devu 3 mg/kg ķermeņa svara, atropīna 0,1% šķīdums ar devu 0,1–0,5 mg/kg ķermeņa svara.

Pēc operācijas lauka sagatavošanas vispārējā anestēzijā tika veikts 7 cm garš grieziens vēdera priekšējā sienā pa viduslīniju. Pēc tam veikta laparotomija un atvērts vēdera dobums, izdalītas un ligētas abas olnīcas, un veikta to izņemšana. Vēdera siena tika slēgta divās kārtās. Pēcoperācijas sāpju un iekaisuma mazināšanai trušiem zemādā tika ievadīts ketoprofēns ar devu 1–3 mg/kg reizi 24 stundās (izmantotais preparāts – ketofēns 10 mg/ml).

Pēc brūces sadzīšanas un veselības stāvokļa normalizēšanās, vidēji pēc divām nedēļām, tika uzsākts 6 nedēļu kurss ar intramuskulārām metilprednizolona (1 mg/kg dienā) injekcijām.

2.3. Biomateriālu raksturojums

Pētījumam tika izmantoti nekomerciālie Rīgas Tehniskās universitātes Rūdolfa Cimdīņa Rīgas Biomateriālu inovācijas un attīstības centra izveidotie biomateriālu implantāti.

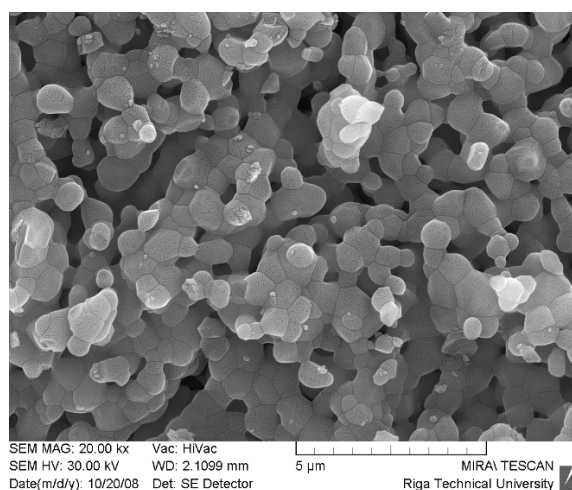
Divfāziski un trīsfāziski Sr saturoši granulveida materiāli tika izgatavoti un to fāžu sastāvs noteikts, izmantojot metodikas, kas aprakstītas literatūrā (Grybauskas et al., 2015; Stipniece et al., 2016). Variējot ar sintēzes parametriem (temperatūra, sintēzes vides beigu pH un reaģentu koncentrācija), tika iegūtas Ca deficīta hidroksilapatīta nogulsnes, kuras, formējot granulās un sažāvējot 1150 °C temperatūrā, tika iegūtas keramiskas granulas 0,5 līdz 1 mm izmērā. Lai novērtētu keramisko granulu mikrostruktūru, tika izmantots skenējošais elektronu mikroskops (FE-SEM, Mira/LMU, Tescan). Rentgenstaru difrakcijas analīze (PANalytical X'Pert PRO) tika izmantota kristālisko fāžu identificēšanai un HA/TCP attiecības noteikšanai. Keramisko granulu īpatnējais virsmas laukums tika noteikts, izmantojot N₂ absorbcijas BET (Brunauer, Emmett and Teller) metodi atbilstoši ASTM C1274-12, ISO 9277:2010 standartam. Granulu beramais blīvums noteikts, ieberot granulas mērcilindrā līdz 5 ml atzīmei un nosverot. Biomateriāla granulu raksturojošie parametri atrodami 2.2. tabulā.

Granulu paraugus raksturojošie parametri

Apzīmējums	HA saturs, %	TCP saturs, %	Sr masa, %	Beramais blīvums, g/cm ³	Virsmas laukums, m ² /g
30/70	23	77	0,017	1,28	0,56
Sr-30/70	31	69	5,1	1,08	0,98
70/30	73	27	0,02	0,98	1,26
Sr-70/30	71	29	6,8	1,05	1,12

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

Veicot rentgenstaru difrakcijas analīzi, nevienā no paraugiem citas kristāliskās fāzes netika identificētas. Analizējot granulu struktūru ar FE-SEM, tika novērtēta granulu neregulāra forma ar šķautnēm. Aplūkojot paraugus lielākā palielinājumā, tika novērota poraina struktūra, ar poru izmēru 200–500 nm un graudiem izmēru diapazonā no 400 nm līdz 1 μm (sk. 2.1. att.). Būtiskas makrostrukturālas un mikrostrukturālas atšķirības starp dažāda sastāva paraugiem netika konstatētas.

2.1. attēls. Sr-HA₃₀/TCP₇₀ keramisko granulu FE-SEM mikrofotogrāfija

Biomateriāli tika sterilizēti ar tvaika sterilizācijas metodi “Getinge HS33” (ražotājs “Getinge IC Production”, Polija) un tika iepakoti papīra plastmasas maisos. Biomateriālu sterilizācija tika veikta 134 °C temperatūrā un 2 bāru atmosfēras spiedienā 30 minūtes ilgi.

2.4. Biomateriālu implantācija

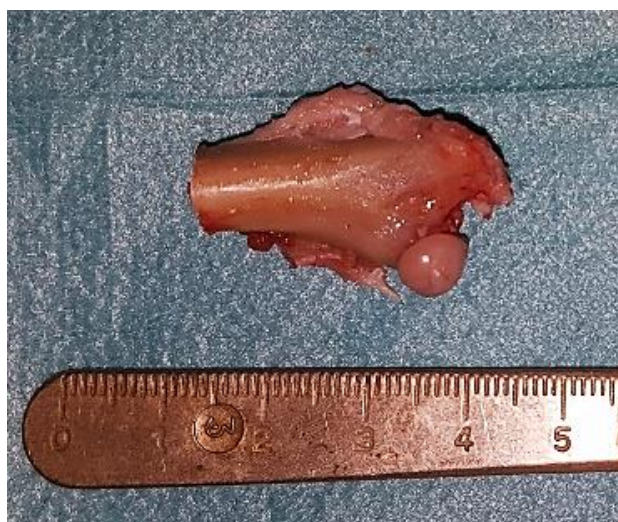
Augšstilba lielā grozītāja *trochanter major* rajonā vispārējā anestēzijā tika veikts aptuveni 2 cm garš grieziens, atslāņojot mīkstos audus un periostu. Ar trepāna urbi 5 mm diametrā tika izveidots apaļš defekts lielajā grozītājā. Defekts tika aizpildīts ar granulām vai atstāts tukšs

atbilstoši pētījuma grupām, kas minētas 2.1. tabulā. Virs kaula defekta tika sašūts periosts. Mīkstie audi šūti pa slāņiem ar atsevišķām šuvēm.

2.5. Morfoloģiski izmeklējamais materiāls

Eitanāzija tika veikta 12 nedēļas pēc operācijas vispārējā anestēzijā ar preparāta T-61 ievadīšanu intrapulmonāli (deva 1,0 ml/kg ķermeņa svara).

Kaula paraugi tika iegūti no labās operētās kājas augšstilba kaula proksimālās trešdaļas, lai izvērtētu lokālu audu reakciju uz implantāciju vai operāciju. Tāpat arī audu paraugi tika iegūti no kreisās neoperētās kājas, lai izvērtētu iespējamās sistēmiskās organisma reakcijas pēc implantācijas un operācijas (sk. 2.2. att.). Adu paraugu iegūšanas laikā netika konstatētas gūžas locītavas skrimšļa makroskopiskās izmaiņas. Arī kontroles grupā audu paraugi tika iegūti no identiskas anatomiskās zonas.



2.2. attēls. Iegūtais kaula materiāls no truša labās kājas

Iegūtais audu materiāls tika fiksēts Stefanini šķīdumā, kura pagatavošanai tika izmantoti 425 ml destilēta ūdens, kurā izšķīdināti 20 g paraformaldehīda, pēc tam tika pievienoti 425 ml Sorensena fosfāta buferšķīduma (pH 7,2) un pievienota filtrēta pikrīnskābe 150 ml. 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, ražotājs “I.T. Baker”, Holande) šķīdumu. Audi tika atūdeņoti, izmantojot 70° un 96° etilspirtu, 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” (ražotājs “Diapath”, Itālija), bet imūnhistoķīmiskai krāsošanai – „Histobond” priekšmetstikli (ražotājs “Marienfield”, Vācija).

2.5.1. Rutīnās histoloģijas metode

Kaula materiāla morfoloģiskās ainas iegūšanai tika izmantota rutīnā krāsošanas metode ar hematoksilīnu un eozīnu (Fischer et al., 2008):

- pirms krāsošanas audu griezumam tika deparafinizēti, skalojot divas reizes pa 10 min ortoksilola šķīdumā, tad pa 3 min 96° un 70° etilspirtā;
- pēc tam audi 3 min tika skaloti destilētā ūdenī, 10 min krāsoti hematoksilīna šķīdumā (“Mayers Hematoxylin”, kods 05M06002, ražotājs “Bio-Optica”, Itālija);
- 10 min skaloti tekošā krāna ūdenī;
- 2 min skaloti “Scotch” buferšķīdumā;
- 2 min krāsoti eozīna šķīdumā (“Eosin Y Alcoholic solution”, kods 05B1003, ražotājs “Bio-Optica”, Itālija);
- 2 min skaloti destilētā ūdenī;
- 3 reizes pa 3 min ievietoti 70° un 96° etilspirtā, uz īsu mirkli karboksilolā un 1 min ortoksilola šķīdumā.

Pēc tam preparāts tika pārklāts ar polistirolu un pārsegts ar segstikliņu. Pēc šīs metodes šūnu kodoli iekrāsojās bazofili – zili violetā krāsā, un šūnu citoplazma iekrāsojās acidofili – rozā krāsā.

2.5.2. Imūnhistoķīmijas metode un reaģenti

Audu paraugi imūnhistoķīmiskai analīzei tika apstrādāti, lietojot biotīna-streptavidīna metodi (Hsu, Raine & Fenger, 1981):

- audu paraugi 24 stundas tika fiksēti 2% formaldehīda un 0,2% pikrīnskābes 0,1 M fosfātu bufera (pH 7,2) maisījuma šķīdumā;
- pēc tam 12 stundas skaloti 10% saharozi saturošā tiroīda buferšķīdumā un atūdeņoti;
- pēc tam audi tika ieguldināti parafīnā un ar mikrotomu sagriezti 3–5 µm biezās griezumās un uzklāti uz “Histobond” priekšmetstikliem.

Audu parafīna griezumam tika krāsoti pēc tālāk norādītā protokola:

- deparafinizācija (3 reizes pa 5 min ksilola šķīdumā);
- skalošana spirtā (3 min – 70°, 3 min – 96°, 3 min – 96°) un destilētā ūdenī;
- skalošana 10 min mazgāšanas buferšķīdumā (“TRIS buffer solution TWEEN20”, kods T0083, ražotājs “Diapath”, Itālija);
- ievietošana uz 5 min 750 W temperatūrā mikroviļņu krāsnī EDTA vārīšanās buferšķīdumā (kods TU103, ražotājs “Diapath”, Itālija);
- atdzesētu paraugu skalošana divas reizes pa 5 min mazgāšanas buferšķīdumā;
- paraugu apstrāde ar 3% ūdeņraža peroksīdu 10 min;
- paraugu skalošana destilētā ūdenī, pēc tam divreiz skalojot pa 5 min mazgāšanas buferšķīdumā;
- fona krāsojuma mazināšana ar normālu bloķēšanas serumu 20 min (kods 9273-05, ražotājs “Cell Marque”, ASV);
- paraugu 60 min ilga apstrāde ar primārām antivielām mitrā kamerā istabas temperatūrā (pielietotās antivielas skatīt 2.3. tabulā);
- paraugu skalošana 10 min mazgāšanas buferšķīdumā;
- paraugu 30 min inkubācija, izmantojot LSAB +LINK ar biotīnu saistītu sekundāro antivielu (kods K1015, ražotājs “DakoCytomation”, Dānija).
- paraugu skalošana 5 min mazgāšanas buferšķīdumā;
- paraugu apstrāde 25 min, izmantojot LSAB+KIT ar enzīmu peroksidāzi saistītu streptavidīnu (kods K0690, ražotājs “DakoCytomation”, Dānija);
- paraugu skalošana 5 minūtes mazgāšanas buferšķīdumā;
- paraugu apstrāde no 3 līdz 10 min ar DAB substrāta hromogēno sistēmu (kods K3468, ražotājs “DakoCytomation”, Dānija), panākot pozitīvo struktūru krāsojumu brūnā krāsā;
- paraugu skalošana tekošā ūdenī;
- paraugu krāsošana 2 min ar hematoksilīnu (“Mayers Hematoxylin”, kods 05M06002, ražotājs “BioOptica”, Itālija).

Dati par imunohistoķīmijā pielietotajām antivielām

Faktors	Avots	Kods	Darba atšķaidījums	Ražotājs un valsts
OPG	trusis	Orb120312	1:100	Biorbyt, USA
NFκB-105	trusis	AB7971	1:100	Abcam, UK
OC	trusis	Orb259644	1:100	Biorbyt, USA
Col-1α	trusis	Orb106535	1:100	Biorbyt, USA
BMP-2/4	kaza	AF355	1:100	R&D systems, UK
MMP-2	trusis	AF902	1:100	Biorbyt, USA
TIMP-2	pele	Sc-21735	1:100	Santa Cruz, USA
IL-1	trusis	Orb308737	1:100	Biorbyt, USA
IL-10	trusis	P22301	1:100	ABBIOTEC, LLC, USA

Apzīmējums: *OPG* – osteoproteģerīns, *NFκB-105* – nukleārais faktors kappa beta-105, *OC* – osteokalcīns, *Col-1α* – kolagēns-1-alfa, *BMP-2/4* – kaula morfogēnais proteīns-2/4, *MMP-2* – matricas metālproteināze-2, *TIMP-2* – matricas metālprotetīnāzes-2 audu inhibitors, *IL-1* – interleikīns-1, *IL-10* – interleikīns-10.

2.6. 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).

2.6.1. 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.

2.6.2. Puskvantitatīvā skaitīšanas metode

Imūnhistoķīmiski noteikto faktoru relatīvā daudzuma novērtēšanai iegūtajos materiālos tika izmantota iepriekš literatūrā plaši aprakstītā un pielietotā puskvantitatīvā skaitīšanas metode (Pilmane, Luts & Sundlers, 1995). Analizēto faktoru daudzums tika novērtēts viena griezuma trīs redzes laukos saskaņā ar metodes gradācijas apzīmēšanu un kodēts atbilstoši statistiskai datu apstrādei (sk. 2.4. tab.).

Puskvantitatīvās metodes pozitīvo struktūru relatīvā biežuma apzīmēšana

Apzīmējums	Paskaidrojums	Statistikā lietojamie apzīmējumi
0	Nevienas pozitīvas struktūras 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

2.6.3. Datu apstrādes statistiskās metodes

Datu statistiskā apstrāde tika veikta, izmantojot *Statistical Package For Social Sciences IBM* (SPSS) 23. versija (*IBM Corporations, ASV*). Datu statistiskās analīzes mērķis bija salīdzināt faktoru ekspresiju starp pētījuma grupām un audu paraugiem. Tā kā iegūtie dati neatbilst normālsadalījumam, tika pielietota 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 $< 0,05$.

3. Rezultāti

Pētījumā tika iekļautas 46 trušu mātītes, no kurām desmit veidoja veselo jeb kontroles grupu, bet 36 trusenēm tika ierosināta osteoporoze ar sekojošu operāciju ar/vai bez biomateriāla implantācijas. Pētījuma laikā tika konstatēta divu trušu nāve. Abi dzīvnieki nomira pētījuma otrajā fāzē – viens pēc Sr-HA₇₀/TCP₃₀ implantācijas, otrs no tukšas kontroles jeb *sham* audu grupas. Patologhistoloģiskās izmeklēšanas laikā netika konstatēts viscerālo orgānu bojājums un netika pierādīta sakarība starp operāciju un nāvi. Šo dzīvnieku audu paraugi netika iekļauti turpmākā analizē. Tādējādi kopumā tika analizēti audu paraugi no 44 dzīvniekiem.

3.1. Rutinās morfoloģijas dati

3.1.1. Kontroles grupas kaula struktūras raksturojums

Visos kontroles grupas audu pārskata griezumos no augšstilba kaula kakliņa rajona tika konstatēta vispārpieņemtai normai raksturīga truša histoloģiskā kaula uzbūve. Proti, to veidoja kompaktā kaulviela ar osteonu kanāliem, kuros atradās asinsvadi. Poraino kaulvielu veidoja izteiktas kaula trabekulas ar osteocītiem un sarkanās kaula smadzenes ar tauksūnām (sk. 3.1. A att.; sk. 1. mikrofotogrāfiju pielikumā).

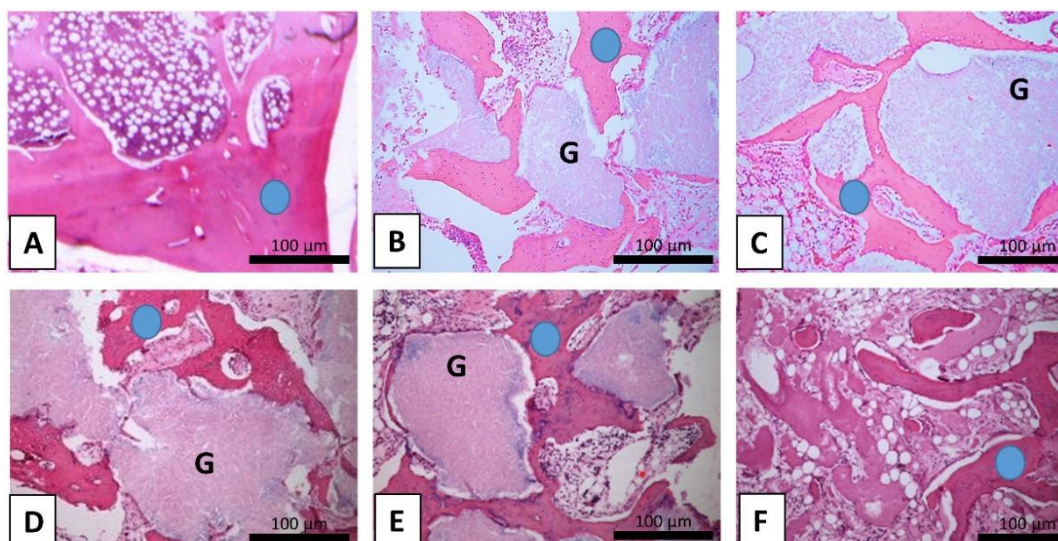
3.1.2. Osteoporotisko dzīvnieku kaula struktūras raksturojums

Visiem eksperimenta dzīvniekiem pēc ierosinātās osteoporozes un sekojošas operācijas ar/vai bez biomateriālu implantācijas tika konstatēta atšķirīga kaula uzbūve salīdzinājumā ar kontroles grupu. Kompaktās kaulvielas slānis bija plānāks un ar retākiem osteoniem, kuru kanālos novērojām izteiktāku saistaudu proliferāciju. Arī trabekulas bija ievērojami plānākas, retākas, un to bija mazāk porainā kaulvielā. Sarkanās kaula smadzenes saturēja ievērojami vairāk tauksūnu. Šādas audu pārmaiņas tika novērotas gan operēto (sk. 2. mikrofotogrāfiju pielikumā), gan neoperēto kāju audu paraugos (sk. 3. mikrofotogrāfiju pielikumā).

Papildus tam audu paraugos pēc biomateriālu pielietošanas tika konstatētas implantētās granulas, starp kurām atradās jaunizveidotais kauls, perēklveida saistaudi un osteoklasti (sk. 3.1. B, C, D, E att.). Pēdējie tika konstatēti tuvu implantētām granulām vairumā audu paraugu ar un bez Sr jonu klātbūtnes (sk. 4. mikrofotogrāfiju pielikumā).

Sham grupas audu paraugos arī tika konstatētas iepriekš aprakstītās kaula struktūras īpatnības. Kompaktās kaulvielas slānis bija plāns un ar reti osteoniem. Porainā kaulvielā bija

plānas trabekulas, un sarkanās kaula smadzenes saturēja daudz taukšūnu. Osteoklastu klātbūtne *sham* grupas audos netika novērota. Kopumā kaula reģenerācijas zonā tika novērota izteiktāka saistaudu klātbūtne un retākas taukšūnas (sk. 3.1. F att.; sk. 5. mikrofotogrāfiju pielikumā).



3.1. 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 .

3.2. Kaula apjoma mērījumi

Osteoporozes pierādīšanai un kaula apjoma noteikšanai tika mērīts kaula trabekulārais laukums, kaula starptrabekulārais laukums un osteoporozes indekss.

Kaula trabekulārais laukums kontroles grupas dzīvniekiem bija 0,393 mm², kas bija statistiski ticami lielāks nekā trušiem ar osteoporozī gan operētās, gan intaktās kājas kaulā (sk. 3.1. tabulu). Operētās kājas audu paraugos kaula trabekulārais laukums vidēji variēja vien no 0,206 mm² līdz 0,242 mm². Kaula trabekulārais laukums operētās kājas *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* kaula paraugos bija vidēji par 40,4% mazāks nekā kontroles trušiem, bet *HA₃₀/TCP₇₀* audos tas bija vidēji samazinājies par 42,5%. Savukārt *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* audu paraugos kaula trabekulārais laukums bija vidēji par 47,6% mazāks nekā veselīgiem trušiem, bet *HA₇₀/TCP₃₀* kaulaudos tas vidēji bija samazinājies par 43,3%. Līdzīgi bija *sham* audu paraugos – kaula trabekulārais laukums bija vidēji par 38,4% mazāks, salīdzinot ar veselo trušu trabekulārā kaula laukumu.

Statistiski ticamas atšķirības kaula trabekulārā laukuma izmēros starp audu paraugiem pēc biomateriālu implantācijas, *sham* vai intaktās kājas audiem netika konstatētas.

3.1. tabula

Kaula trabekulārais laukums kontroles un osteoporotisko trušu audu paraugos

Grupa	A	B		C		D
Statuss	Kontrole	Sr- HA ₃₀ /TCP ₇₀	HA ₃₀ /TCP ₇₀	Sr- HA ₇₀ /TCP ₃₀	HA ₇₀ /TCP ₃₀	Sham
Operētā kāja	—	^a 0,23 mm ² ^b (0,17–0,28)	0,23 mm ² (0,18–0,29)	0,21 mm ² (0,16–0,25)	0,22 mm ² (0,14–0,29)	0,24 mm ² (0,16–0,38)
Intaktā kāja	—	0,23 mm ² (0,16–0,35)	0,20 mm ² (0,08–0,18)	0,22 mm ² (0,18–0,25)	0,21 mm ² (0,14–0,24)	0,21 mm ² (0,13–0,26)
Vesēlie	0,39 mm ² (0,35–0,42)	^c p = 0,001 ^d p = 0,001	p = 0,001 p = 0,001	p = 0,001 p = 0,001	p = 0,001 p = 0,001	p = 0,005 p = 0,001

Apzīmējums: Sr – stroncijs, HA – hidroksilapatīts, TCP – trikalcija fosfāts, ^a norādīta vidējā vērtība, ^b norādīta minimālā un maksimālā vērtība, ^c statistiski nozīmīgs rezultāts starp veselām trušiem un trušiem ar osteoporozi operētā kājā, ^d statistiski nozīmīgs rezultāts starp veselām trušiem un trušiem ar osteoporozi intaktā kājā.

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. 3.2. tabulu). Statistiski ticamas atšķirības kaula starptrabekulārā laukuma izmēros starp audu paraugiem pēc biomateriālu implantācijas *sham* vai intaktās kājas audiem netika konstatētas.

3.2. tabula

Kaula starptrabekulārais laukums kontroles un osteoporotisko trušu audu paraugos

Grupa	A	B		C		D
Statuss	Kontrole	Sr- HA ₃₀ /TCP ₇₀	HA ₃₀ /TCP ₇₀	Sr- HA ₇₀ /TCP ₃₀	HA ₇₀ /TCP ₃₀	Sham
Operētā kāja	—	^a 0,74 mm ² ^b (0,69–0,81)	0,75 mm ² (0,68–0,80)	0,76 mm ² (0,72–0,81)	0,75 mm ² (0,68–0,84)	0,74 mm ² (0,59–0,81)
Intaktā kāja	—	0,75 mm ² (0,63–0,81)	0,84 mm ² (0,80–0,89)	0,76 mm ² (0,73–0,80)	0,76 mm ² (0,69–0,83)	0,79 mm ² (0,71–0,85)
Vesēlie	0,58 mm ² (0,56–0,62)	^c p = 0,001 ^d p = 0,001	p = 0,001 p = 0,001	p = 0,001 p = 0,001	p = 0,0001 p = 0,001	p = 0,0001 p = 0,001

Apzīmējums: Sr – stroncijs, HA – hidroksilapatīts, TCP – trikalcija fosfāts, ^a norādīta vidējā vērtība, ^b norādīta minimālā un maksimālā vērtība, ^c statistiski nozīmīgs rezultāts starp veselām trušiem un trušiem ar osteoporozi operētā kājā, ^d statistiski nozīmīgs rezultāts starp veselām trušiem un trušiem ar osteoporozi intaktā kājā.

Osteoporozes indekss tika iegūts, analizējot kaula trabekulārā laukuma un kaula starptrabekulārā laukuma attiecību. Kontroles trušiem osteoporozes indekss bija lielāks nekā osteoporotiskiem trušiem ar/vai bez biomateriāla implantācijas vai nekā *sham* trušiem (sk. 3.3. tabulu). Osteoporozes indekss kontroles trušiem bija 68%, bet osteoporotiskiem trušiem tas variēja no 27% līdz 33% operētās kājas audos un no 24% līdz 30% intaktās kājas audos. Iegūtie

rezultāti liecināja par ierosināto osteoporozi eksperimenta dzīvniekiem ar sekojošām kaula struktūras izmaiņām, salīdzinot ar kontroles jeb veselajiem trušiem

3.3. tabula

Osteoporozes indekss

Grupa	A	B		C		D
Kāja	Kontrole	Sr- HA ₃₀ /TCP ₇₀	HA ₃₀ /TCP ₇₀	Sr- HA ₇₀ /TCP ₃₀	HA ₇₀ /TCP ₃₀	Sham
Operētā kājā	—	32%	30%	27%	30%	33%
Intaktā kājā	68%	30%	24%	29%	28%	26%

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

3.3. Kontroles un osteoporotisko dzīvnieku kaulā noteikto faktoru imūnhistoķīmiskais raksturojums

3.3.1. Kaula pamatvielas un mineralizācijas faktori

Kolagēna-1-alfa (*Col-1α*) pozitīvās šūnas tika atrastas visos **kontroles** grupas preparātu audos (sk. 3.4. tab.). Vidēji *Col-1α* pozitīvi osteocīti tika konstatēti maz līdz vidēji daudz (+/++) (sk. 6. mikrofotogrāfiju pielikumā). Maz (+) pozitīvu šūnu tika konstatēts četros audu paraugos, maz līdz vidēji daudz (+/++) – piecos audu paraugos, bet vidēji daudz (++) *Col-1α* saturošo šūnu tika atrasts tikai vienā preparātā.

Kolagēna-1-alfa (*Col-1α*) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **B grupas** audos bija variabla. **Sr-HA₃₀/TCP₇₀ operētās** kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts daudz (+++) *Col-1α* pozitīvu kaula šūnu (sk. 3.4. tab. un 7. mikrofotogrāfiju pielikumā). Tikai vienā gadījumā tika novērots vidēji daudz (++) un vienā gadījumā – vidēji daudz līdz daudz (++)/+++ *Col-1α* pozitīvu šūnu redzes laukā. **Neoperētās** kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) *Col-1α* pozitīvu šūnu (sk. 8. mikrofotogrāfiju pielikumā). Tikai vienā gadījumā tika novērots daudz (++) pozitīvu struktūru.

- Operētās kājas audos *Col-1α* pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētā kājā (sk. 3.5. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu *Col-1α* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk (sk. 3.6. tab.).

Kolagēna-1-alfa pozitīvo šūnu relatīvais daudzums kontroles un osteoporotisko dzīvnieku audos

Paraugu skaits	A grupa	B grupa				C grupa				D grupa	
		<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>		<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>		<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>		<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>		<i>sham</i>	
		operētā kāja n = 7	neoperētā kāja n = 7	operētā kāja n = 7	neoperētā kāja n = 7	operētā kāja n = 6	neoperētā kāja n = 6	operētā kāja n = 8	neoperētā kāja n = 8	operētā kāja n = 6	neoperētā kāja n = 6
1.	+/++	++/+++	++	++/+++	+++	++	+/++	++/+++	+	+++	++
2.	++	+++	++	+++	+++	+++	+/++	++/+++	++/+++	+++	++/+++
3.	+/++	+++	++	+++	+++	+++	+	++	+	+++	++
4.	+	++	++	++	++	+++	+++	++/+++	++	++	+/++
5.	+	+++	++	++/+++	++	+++	+	++/+++	+/++	+++	++/+++
6.	+	+++	++	+++	++/+++	+++/++++	++/+++	+++	++	+++/++++	+++
7.	+	+++	+++	+++	++			+++	++		
8.	+/++							+++	++		
9.	+/++										
10.	+/++										
Vidēji	+/++	+++	++	+++	++/+++	+++	+/++	++/+++	++	+++	++

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

+ maz pozitīvu struktūru redzes laukā; +/+ maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; ++ vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; ++/+++ vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; +++ daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; +++/++++ daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru redzes laukā.

HA₃₀/TCP₇₀ operētās kājas audos vidēji tika konstatēts daudz (+++) *Col-1α* pozitīvo struktūru (sk. 3.4. tab. un 9. mikrofotogrāfiju pielikumā). Vidēji daudz (++) osteocītu tika novēroti tikai vienā gadījumā. *Col-1α* atradne **neoperētās** kājas audos bija samērā konstanta, kopumā tika novērots vidēji daudz līdz daudz (++) pozitīvo struktūru (sk. 10. mikrofotogrāfiju pielikumā).

- Statistiski ticama atšķirība starp kopējo *Col-1α* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos netika atrasta (sk. 3.5. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu *Col-1α* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk (sk. 3.6. tab.).

Kolagēna-1-alfa (Col-1α) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **C grupas** audos bija variabla. **Sr-HA₇₀/TCP₃₀ operētās** kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts daudz (+++) *Col-1α* pozitīvu kaula šūnu (sk. 3.4. tab. un 11. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne variēja no vidēji daudz (++) pozitīvām šūnām vienā gadījumā, daudz (+++) – četros gadījumos un daudz līdz ļoti daudz (++++/++) pozitīvām *Col-1α* struktūrām vienā audu paraugā. Savukārt **neoperētās** kājas audu paraugi vidēji saturēja maz līdz vidēji daudz (++) *Col-1α* pozitīvu šūnu (sk. 12. mikrofotogrāfiju pielikumā). To atradne bija variabla. Tā variēja no maz (+) pozitīvām šūnām līdz daudz (+++) pozitīvām šūnām redzes laukā.

- Operētās kājas audos *Col-1α* pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētās kājas audos (sk. 3.5. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu *Col-1α* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk (sk. 3.6. tab.).

HA₇₀/TCP₃₀ operētās kājas audos vidēji tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++) *Col-1α* pozitīvu struktūru (sk. 3.4. tab. un 13. mikrofotogrāfiju pielikumā). Savukārt **neoperētās** kājas audu paraugi vidēji saturēja vidēji daudz (++) *Col-1α* pozitīvu šūnu (sk. 14. mikrofotogrāfiju pielikumā). Divi audu paraugi uzrādīja maz (+) pozitīvu struktūru redzes laukā.

- Operētās kājas audos *Col-1α* pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētās kājas audos (sk. 3.5. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu *Col-1α* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk (sk. 3.6. tab.).

Kolagēna-1-alfa (Col-1α) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **D grupas** audos bija variabla (sk. 3.4. tab.). **Sham operētās** kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts daudz (+++) *Col-1α* pozitīvu struktūru (sk. 15. mikrofotogrāfiju pielikumā). Tika atrasts gan vidēji daudz (++) , gan daudz līdz ļoti daudz (++++/++) pozitīvu kaula šūnu redzes laukā. Savukārt **neoperētās** kājas audu paraugi vidēji saturēja vidēji daudz (++) *Col-1α* pozitīvu šūnu (sk. 16.

mikrofotogrāfiju pielikumā). Atrasts tika no maz līdz vidēji daudz (+/++) līdz pat daudz (+++) *Col-1α* pozitīvu šūnu redzes laukā.

- Operētās kājas audos *Col-1α* pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētās kājas audos (sk. 3.5. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu *Col-1α* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk (sk. 3.6. tab.).

Kolagēna-1-alfa klātbūtne visu osteoporotisko dzīvnieku operēto kāju audos bija līdzīga, un statistiski nozīmīga atšķirība faktora pozitīvo struktūru relatīvajam daudzumam netika atrasta (sk. 3.6. tab.).

3.5. tabula

Kolagēna-1-alfa pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma salīdzinājums osteoporotisko dzīvnieku operētās un neoperētās kājas audos

Nr.	Grupa	Kāja	Paraugu skaits	Rangu vidējais rādītājs	Rangu summa	Manna Vitnija U tests	p vērtība
1.	<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>	Operētā	7	9,93	69,50	7,50	0,015
		Neoperētā	7	5,07	35,50		
2.	<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>	Operētā	7	8,36	58,50	18,50	0,405
		Neoperētā	7	6,64	46,50		
3.	<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>	Operētā	6	8,83	53,00	4,00	0,020
		Neoperētā	6	4,17	25,00		
4.	<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>	Operētā	8	11,88	95,00	5,00	0,003
		Neoperētā	8	5,13	41,00		
5.	<i>Sham</i>	Operētā	6	8,50	51,00	6,00	0,044
		Neoperētā	6	4,50	27,00		

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

Kolagēna-1-alfa pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma salīdzinājums kontroles un osteoporotisko dzīvnieku operētās kājas audos

Nr.	Grupa	Paraugu skaits	Rangu vidējais rādītājs	Rangu summa	Manna-Vitnija U tests	p vērtība
1.	Kontrole	10	5,55	55,50	0,50	0,001
	<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>	7	13,93	97,50		
2.	Kontrole	10	5,55	55,50	0,50	0,001
	<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>	7	13,93	97,50		
3.	Kontrole	10	5,55	55,50	0,50	0,001
	<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>	6	13,42	80,50		
4.	Kontrole	10	5,55	55,50	0,50	< 0,001
	<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>	8	14,44	115,50		
5.	Kontrole	10	5,55	55,50	0,50	0,001
	<i>Sham</i>	6	13,42	80,50		
6.	<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>	7	7,93	55,50	21,50	0,653
	<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>	7	7,07	49,50		
7.	<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>	7	6,36	44,50	16,50	0,431
	<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>	6	7,75	46,50		
8.	<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>	7	9,14	64,00	20,00	0,304
	<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>	8	7,00	56,00		
9.	<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>	7	6,36	44,50	16,50	0,431
	<i>Sham</i>	6	7,75	46,50		
10.	<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>	7	6,07	42,50	14,50	0,288
	<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>	6	8,08	48,50		
11.	<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>	7	8,64	60,50	23,50	0,569
	<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>	8	7,44	59,50		
12.	<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>	7	6,07	42,50	14,50	0,288
	<i>Sham</i>	6	8,08	48,50		
13.	<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>	6	9,25	55,50	13,50	0,142
	<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>	8	6,19	49,50		
14.	<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>	6	6,50	39,00	18,00	1,000
	<i>Sham</i>	6	6,50	39,00		
15.	<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>	8	6,19	49,50	13,50	0,142
	<i>Sham</i>	6	9,25	55,50		

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

Osteokalcīna (OC) pozitīvu šūnu **kontroles** grupā vidēji tika atrasts daudz (+++) (sk. 17. mikrofotogrāfiju pielikumā). Faktora ekspresija bija stabila un tikai divos gadījumos tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++) un daudz līdz ļoti daudz (+++/++++) OC pozitīvu struktūru (sk. 3.7. tab.).

Osteokalcīna (OC) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **B grupas** audos bija variabla: ***Sr-HA₃₀/TCP₇₀*** operētās kājas audu paraugos kopumā tika konstatēts daudz (+++) OC pozitīvu kaula šūnu (sk. 3.7. tab. un 18. mikrofotogrāfiju pielikumā). Tikai vienā gadījumā tika novērots vidēji daudz (++) un vienā gadījumā vidēji daudz līdz daudz (++) OC pozitīvu struktūru. Savukārt **neoperētās** kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) OC pozitīvu šūnu

(sk. 19. mikrofotogrāfiju pielikumā). To atradne bija konstanta, jo tikai vienā gadījumā tika novērots vidēji daudz līdz daudz (++) pozitīvu struktūru.

- Operētās kājas audos OC pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētā kājā (sk. 3.8. tab.).
- Statistiski ticama atšķirība OC pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem netika atrasta (sk. 3.9. tab.).

HA₃₀/TCP₇₀ operētās kājas audos vidēji tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++) OC pozitīvu struktūru (sk. 3.7. tab. un 20. mikrofotogrāfiju pielikumā). Vidēji daudz (++) osteocītu tika novērots divos gadījumos, bet daudz (++) OC pozitīvu šūnu tika atrasts četros gadījumos. OC neoperētās kājas audos vidēji tika novērots vidēji daudz (++) šūnās (sk. 21. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne bija variabla, un tās variēja no maz (+) līdz daudz (+++) OC pozitīvām struktūrām redzes laukā.

- Statistiski ticama atšķirība starp kopējo OC pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos netika atrasta (sk. 3.8. tab.).
- Statistiski ticama atšķirība OC pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem arī netika atrasta (sk. 3.9. tab.).

Osteokalcīna (OC) atradne osteoporotisko dzīvnieku **C grupas** audos arī bija variabla:

Sr-HA₇₀/TCP₃₀ operētās kājas audu paraugos tika novērota lielākā OC ekspresija. Vidēji tika konstatēts daudz līdz ļoti daudz (+++/++++) OC pozitīvu kaula šūnu (sk. 3.7. tab. un 22. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne variēja no vidēji daudz līdz daudz (++) pozitīvām šūnām vienā gadījumā, daudz līdz ļoti daudz (+++/++++) – trīs gadījumos un ļoti daudz (++++) pozitīvām OC struktūrām divos audu paraugos. Krietni mazāk OC imūnpozitīvo struktūru tika novērots neoperētās kājas audos, kur vidēji bija maz līdz vidēji daudz (++) OC pozitīvu šūnu (sk. 23. mikrofotogrāfiju pielikumā). To atradne variēja no maz (+) pozitīvām šūnām līdz daudz (+++) pozitīvām šūnām redzes laukā.

- Operētās kājas audos OC pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētās kājas audos (sk. 3.8. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu OC pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk (sk. 3.9. tab.).

Osteokalcīna pozitīvo šūnu relatīvais daudzums kontroles un osteoporotisko dzīvnieku audos

Paraugu skaits	A grupa	B grupa				C grupa				D grupa	
		<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>		<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>		<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>		<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>		<i>sham</i>	
	kontrole n = 10	operētā kāja n = 7	neoperētā kāja n = 7	operētā kāja n = 7	neoperētā kāja n = 7	operētā kāja n = 6	neoperētā kāja n = 6	operētā kāja n = 8	neoperētā kāja n = 8	operētā kāja n = 6	neoperētā kāja n = 6
1.	+++	++	++	+++	++/+++	++/+++	+	++++/++++	+	++	++
2.	+++	+++	++	++/+++	++/+++	++++	++	+++	++	+++	++/+++
3.	+++	+++	++/++++	+++	++	++++/++++	+ / ++	++++	++	+++	++
4.	+++	+++	++	++	+	++++/++++	+	+++	+	++	+
5.	++/+++	+++	++	++	+ / ++	++++	+++	+++	++	++	++
6.	+++	++/++++	++	+++	++	++++	++	+++	++	+++	++
7.	+++	+++	++	+++	+++			++	+		
8.	+++							+++	++		
9.	+++										
10.	++++/++++										
Vidēji	+++	+++	++	++/+++	++	++++/++++	+ / ++	+++	++	++/+++	++

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

+ maz pozitīvu struktūru redzes laukā; + / ++ maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; ++ vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; ++ / +++ vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; +++ daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; +++ / ++++ daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; ++++ ļoti daudz pozitīvu struktūru redzes laukā.

HA₇₀/TCP₃₀ operētās kājas audos vidēji tika konstatēts daudz (+++) OC pozitīvu struktūru (sk. 3.7. tab. un 24. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (+++++) pozitīvām struktūrām redzes laukā. Savukārt **neoperētās** kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) OC pozitīvu šūnu (sk. 25. mikrofotogrāfiju pielikumā). Trīs audu paraugi uzrādīja maz (+) pozitīvu struktūru redzes laukā.

- Operētās kājas audos OC pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk kā neoperētās kājas audos (sk. 3.8. tab.).
- Statistiski ticama atšķirība OC pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem netika atrasta (sk. 3.9. tab.).

Osteokalcīna (OC) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **D grupas** audu paraugos bija līdzīga (sk. 3.7. tab.). **Sham** operētās kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++) OC pozitīvu struktūru (sk. 26. mikrofotogrāfiju pielikumā). Tika atrasts vidēji daudz (++) un daudz (+++) pozitīvu kaula šūnu redzes laukā. Savukārt **neoperētās** kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) OC pozitīvu šūnu (sk. 27. mikrofotogrāfiju pielikumā). Tās variēja no maz (+) līdz vidēji daudz līdz daudz (++) OC pozitīvām šūnām.

- Statistiski ticama atšķirība starp kopējo OC pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos netika atrasta (sk. 3.8. tab.).
- Savukārt salīdzinājumā ar kontroles grupu OC pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami mazāk (sk. 3.9. tab.).

Osteokalcīna pozitīvas kaula šūnas audu paraugos pēc **Sr-HA₇₀/TCP₃₀** granulu implantācijas tika novērotas statistiski ticami vairāk nekā audu paraugos pēc **Sr-HA₃₀/TCP₇₀**, **HA₃₀/TCP₇₀** granulu implantācijas un **sham** operācijas (sk. 3.9. tab.).

3.8. tabula

Osteokalcīna pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma salīdzinājums osteoporotisko dzīvnieku operētās un neoperētās kājas audos

Nr.	Grupa	Kāja	Paraugu skaits	Rangu vidējais rādītājs	Rangu summa	Manna Vitnija U tests	P vērtība
1.	<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>	Operētā	7	10,36	72,50	4,50	0,005
		Neoperētā	7	4,64	32,50		
2.	<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>	Operētā	7	9,29	65,00	12,00	0,097
		Neoperētā	7	5,71	40,00		
3.	<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>	Operētā	6	9,33	56,00	1,00	0,006
		Neoperētā	6	3,67	22,00		
4.	<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>	Operētā	8	12,19	97,50	2,50	0,001
		Neoperētā	8	4,81	38,50		
5.	<i>Sham</i>	Operētā	6	8,00	48,00	9,00	0,105
		Neoperētā	6	5,00	30,00		

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

Osteokalcīna pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma salīdzinājums kontroles un osteoporotisko dzīvnieku operētās kājas audos

Nr.	Grupa	Paraugu skaits	Rangu vidējais rādītājs	Rangu summa	Manna-Vitnija U tests	p vērtība
1.	Kontrole	10	9,95	99,50	25,50	0,212
	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	7,64	53,50		
2.	Kontrole	10	10,45	104,50	20,50	0,079
	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	6,93	48,50		
3.	Kontrole	10	6,55	65,50	10,50	0,023
	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	11,75	70,50		
4.	Kontrole	10	9,05	90,50	35,50	0,613
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	10,06	80,50		
5.	Kontrole	10	10,00	100,00	15,00	0,047
	Sham	6	6,00	36,00		
6.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	8,07	56,50	20,50	0,548
	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	6,93	48,50		
7.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	4,79	33,50	5,50	0,022
	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	9,58	57,50		
8.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	6,71	47,00	19,00	0,214
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	9,13	73,00		
9.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	7,86	55,00	15,00	0,320
	Sham	6	6,00	36,00		
10.	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	4,64	32,50	4,500	0,016
	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	9,75	58,50		
11.	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	6,29	44,00	16,00	0,116
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	9,50	76,00		
12.	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	7,43	52,00	18,00	0,630
	Sham	6	6,50	39,00		
13.	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	9,58	57,50	11,50	0,093
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	5,94	47,50		
14.	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	9,00	54,00	3,00	0,014
	Sham	6	4,00	24,00		
15.	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	9,00	72,00	12,00	0,082
	Sham	6	5,50	33,00		

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

3.3.2. Kaula reģenerācijas un šūnu funkcionālās aktivitātes faktori

Kaula morfogēnā proteīna-2/4 (BMP-2/4) pozitīvās šūnas tika atrastas visos **kontroles** grupas audos (sk. 3.10. tab.). Vidēji BMP-2/4 pozitīvi osteocīti tika konstatēti maz līdz vidēji daudz (+/++) (sk. 28. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne variēja no maz (+) līdz vidēji daudz (++) BMP-2/4 pozitīvām šūnām, kur maz (+) šādu šūnu tika konstatēts trijos audu paraugos, maz līdz vidēji daudz (+/++) – piecos audu paraugos, bet vidēji daudz (++) BMP-2/4 saturošo šūnu tika atrasts divos preparātos.

Kaula morfogēnā proteīna-2/4 (BMP-2/4) pozitīvo struktūru klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **B grupas** audos bija variabla:

Sr-HA₃₀/TCP₇₀ operētās kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (+++/++) **BMP-2/4** pozitīvu kaula šūnu (sk. 3.10. tab. un 29. mikrofotogrāfiju pielikumā). Tikai vienā gadījumā tika novērots maz līdz vidēji daudz (+/++) un vienā gadījumā daudz (+++/++) **BMP-2/4** pozitīvu struktūru. Savukārt **neoperētās** kājas audu paraugi vidēji saturēja maz līdz vidēji daudz (+/++) **BMP-2/4** pozitīvu šūnu (sk. 30. mikrofotogrāfiju pielikumā). Paraugos atradne variēja no maz (+) līdz daudz (++) pozitīvām struktūrām redzes laukā.

- Operētās kājas audos **BMP-2/4** pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētā kājā (sk. 3.11. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu **BMP-2/4** pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk (sk. 3.12. tab.).

HA₃₀/TCP₇₀ operētās kājas audos vidēji tika konstatēts vidēji daudz (++) **BMP-2/4** pozitīvu struktūru (sk. 3.10. tab. un 31. mikrofotogrāfiju pielikumā). Faktora pozitīvo struktūru relatīvais daudzums bija līdzīgs – maz (+) pozitīvu struktūru tika novērots tikai vienā gadījumā. Līdzīgi **neoperētās** kājas audos kopumā tika novērots vidēji daudz (++) pozitīvu šūnu, un tās variēja no maz (+) līdz vidēji daudz (+++) (sk. 32. mikrofotogrāfiju pielikumā).

- Statistiski ticama atšķirība starp kopējo **BMP-2/4** pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos netika atrasta (sk. 3.11. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu **BMP-2/4** pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk (sk. 3.12. tab.).

Kaula morfogēnā proteīna-2/4 (BMP-2/4) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **C grupas** audos bija variabla. **Sr-HA₇₀/TCP₃₀ operētās** kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (+++/++) **BMP-2/4** pozitīvu kaula šūnu (sk. 3.10. tab. un 33. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne bija samērā līdzīga, un tika novērots vidēji daudz un daudz pozitīvu struktūru redzes laukā. Savukārt **BMP-2/4** klātbūtne **neoperētās** kājas audos tika konstatēta samērā reti, jo iezīmējas retas (0/+) un maz (+) **BMP-2/4** pozitīvu šūnu redzes laukā (sk. 34. mikrofotogrāfiju pielikumā).

- Operētās kājas audos **BMP-2/4** pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētās kājas audos (sk. 3.11. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu **BMP-2/4** pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk (sk. 3.12. tab.).

Kaula morfogēnā proteīna-2/4 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums kontroles un osteoporotisko dzīvnieku audos

Paugaugu skaits	A grupa	B grupa				C grupa				D grupa	
		<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>		<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>		<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>		<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>		<i>sham</i>	
		operētā kāja n = 7	neoperētā kāja n = 7	operētā kāja n = 7	neoperētā kāja n = 7	operētā kāja n = 6	neoperētā kāja n = 6	operētā kāja n = 8	neoperētā kāja n = 8	operētā kāja n = 6	neoperētā kāja n = 6
1.	+/++	++/+++	++	++	++	++	+	++	0/+	++	0/+
2.	++	++/+++	++	++	++	++/+++	0/+	+/++	0/+	++	++
3.	+/++	+++	++	++	++	++/+++	+	++/+++	0/+	++	++
4.	+	+/++	+/++	+	+/++	++	+	+/++	0/+	+	0/+
5.	+	++	+	++	+	++/+++	+	++/+++	0/+	++	+/++
6.	+	++/+++	+/++	++	+	++	0/+	++	+	++	+
7.	+/++	++	+	++	++			++	+		
8.	+/++							++/+++	+/++		
9.	+/++										
10.	++										
Vidēji	+/++	++/+++	+/++	++	++	++/+++	0/+	++	0/+	++	+/++

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

0/+ dažas pozitīvas struktūras redzes laukā; + maz pozitīvu struktūru redzes laukā; +/+ maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; ++ vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; ++/+++ vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; +++ daudz pozitīvu struktūru redzes laukā.

HA₇₀/TCP₃₀ operētās kājas audos vidēji tika konstatēts vidēji daudz (++) **BMP-2/4** pozitīvu šūnu (sk. 3.10. tab. un 35. mikrofotogrāfiju pielikumā). Divos paraugos bija atrodamas maz līdz vidēji daudz (+/++) pozitīvu struktūru redzes laukā. Trīs paraugos vērojām vidēji daudz līdz daudz **BMP-2/4** pozitīvu osteocītu. Savukārt **neoperētās** kājas audos vidēji tika konstatētas dažas (0/+) **BMP-2/4** pozitīvās šūnas redzes laukā (sk. 36. mikrofotogrāfiju pielikumā).

- Operētās kājas audos **BMP-2/4** pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētās kājas audos (sk. 3.11. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu **BMP-2/4** pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk (sk. 3.12. tab.).

Kaula morfogēnā proteīna-2/4 (BMP-2/4) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **D grupas** audu paraugos bija līdzīga (sk. 3.10. tab.). **Sham** operētās kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts vidēji daudz (++) **BMP-2/4** pozitīvu struktūru (sk. 37. mikrofotogrāfiju pielikumā). Tikai vienā gadījumā vērojām maz (+) pozitīvu šūnu. **Neoperētās** kājas audu paraugos kopumā atradām maz līdz vidēji daudz (+/++) **BMP-2/4** pozitīvu šūnas (sk. 38. mikrofotogrāfiju pielikumā). Tās variēja no retām (0/+) līdz vidēji daudz (++).

- Statistiski ticama atšķirība starp kopējo **BMP-2/4** pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos netika atrasta (sk. 3.11. tab.).
- Statistiski ticama atšķirība **BMP-2/4** pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audi netika atrasta (sk. 3.12. tab.).

Kaula morfogēnā proteīna-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 un **sham** operācijas (sk. 3.12. tab.).

3.11. tabula

Kaula morfogēnā proteīna-2/4 pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma salīdzinājums osteoporotisko dzīvnieku operētās un neoperētās kājas audos

Nr.	Grupa	Kāja	Paraugu skaits	Rangu vidējais rādītājs	Rangu summa	Manna Vitnija U tests	P vērtība
1.	<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>	Operētā	7	10,00	70,00	7,00	0,021
		Neoperētā	7	5,00	35,00		
2.	<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>	Operētā	7	8,43	59,00	18,00	0,295
		Neoperētā	7	6,57	46,00		
3.	<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>	Operētā	6	9,50	57,00	3,50	0,003
		Neoperētā	6	3,50	21,00		
4.	<i>Ha₇₀/TCP₃₀</i>	Operētā	8	12,38	99,00	1,00	0,011
		Neoperētā	8	4,63	37,00		
5.	<i>Sham</i>	Operētā	6	8,08	48,50	8,50	0,088

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

Kaula morfogēnā proteīna-2/4 pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma salīdzinājums kontroles un osteoporotisko dzīvnieku operētās kājas audos

Nr.	Grupa	Paraugu skaits	Rangu vidējais rādītājs	Rangu summa	Manna-Vitnija U tests	p vērtība
1.	Kontrole	10	6,15	61,50	6,50	0,004
	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	13,07	91,50		
2.	Kontrole	10	6,95	69,50	14,50	0,031
	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	11,93	83,50		
3.	Kontrole	10	5,80	58,00	3,00	0,002
	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	13,00	78,00		
4.	Kontrole	10	6,70	67,00	12,00	0,009
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	13,00	104,00		
5.	Kontrole	10	6,85	68,50	13,50	0,056
	Sham	6	11,25	67,50		
6.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	9,29	65,00	12,00	0,075
	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	5,71	40,00		
7.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	7,21	50,50	19,50	0,816
	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	6,75	40,50		
8.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	9,07	63,50	20,50	0,359
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	7,06	56,50		
9.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	8,57	60,00	10,00	0,086
	Sham	6	5,17	31,00		
10.	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	5,29	37,00	9,00	0,035
	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	9,00	54,00		
11.	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	7,00	49,00	21,00	0,358
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	8,88	71,00		
12.	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	7,07	49,50	20,50	0,909
	Sham	6	6,92	41,50		
13.	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	8,50	51,00	18,00	0,399
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	6,75	54,00		
14.	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	8,25	49,50	7,50	0,043
	Sham	6	4,75	28,50		
15.	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	8,31	66,50	17,50	0,349
	Sham	6	6,42	38,50		

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

Nukleārā faktora kappā beta-105 (NFkB-105) pozitīvas šūnas **kontroles grupā** vidēji tika atrastas vidēji daudz (++) (sk. 39. mikrofotogrāfiju pielikumā). Tikai divos gadījumos tika konstatēts maz līdz vidēji daudz (+/++) **NFkB-105** pozitīvu struktūru (sk. 3.13. tab.).

Nukleārā faktora kappā beta-105 (NFkB-105) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **B grupas** audos bija variabla. **Sr-HA₃₀/TCP₇₀ operētās** kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts vidēji daudz (++) **NFkB-105** pozitīvu kaula šūnu (sk. 3.13. tab. un 40. mikrofotogrāfiju pielikumā). Tikai vienā gadījumā tika novērots maz līdz vidēji daudz (+/++) **NFkB-105** pozitīvu struktūru. Savukārt **neoperētās** kājas audu paraugi vidēji saturēja maz (+) **NFkB-105** pozitīvu

šūnu (sk. 41. mikrofotogrāfiju pielikumā). Faktora klātbūtne bija nemainīga, izņemot vienu gadījumu, kad konstatējām maz līdz vidēji daudz (+/++) pozitīvu struktūru redzes laukā.

- Operētās kājas audos *NFkB-105* pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētā kājā (sk. 3.14. tab.).
- Statistiski ticama atšķirība *NFkB-105* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem netika atrasta (sk. 3.15. tab.).

HA₃₀/TCP₇₀ operētās kājas audos vidēji tika konstatēts maz līdz vidēji daudz (+/++) *NFkB-105* pozitīvu struktūru (sk. 3.13. tab. un 42. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne variēja no maz (+) līdz vidēji daudz (++) šūnām redzes laukā. Savukārt neoperētās kājas audos vidēji tika novērots maz (+) pozitīvu struktūru (sk. 43. mikrofotogrāfiju pielikumā). Vienā audu paraugā pozitīvas struktūras pat netika atrastas.

- Operētās kājas audos *NFkB-105* pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētā kājā (sk. 3.14. tab.).
- Savukārt salīdzinājumā ar kontroles grupu *NFkB-105* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami mazāk (sk. 3.15. tab.).

Nukleārā faktora kappa beta-105 (*NFkB-105*) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **C grupas** audos bija variabla. **Sr-HA₇₀/TCP₃₀ operētās** kājas audu paraugos tika novērota izteiktāka *NFkB-105* ekspresija (sk. 3.13. tab.). Vidēji tika konstatēts daudz (++++) *NFkB-105* pozitīvu kaula šūnu (sk. 44. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne variēja no vidēji daudz (++) līdz pat daudz līdz ļoti daudz (+++/++++) pozitīvām struktūrām redzes laukā. Savukārt *NFkB-105* klātbūtne neoperētās kājas audos tika konstatēta mazākā daudzumā. Kopumā vērojām vidēji daudz (++) *NFkB-105* pozitīvu šūnu redzes laukā (sk. 45. mikrofotogrāfiju pielikumā).

- Operētās kājas audos *NFkB-105* pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētā kājā (sk. 3.14. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu *NFkB-105* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk (sk. 3.15. tab.).

HA₇₀/TCP₃₀ operētās kājas audos vidēji tika konstatēts vidēji daudz (++) *NFkB-105* pozitīvu struktūru (sk. 3.13. tab. un 46. mikrofotogrāfiju pielikumā). Daudz (+++) pozitīvu struktūru atradām tikai divos audu paraugos, vidēji daudz līdz daudz – vienā, bet piecos audu paraugos konstatējām vidēji daudz *NFkB-105* pozitīvas šūnas. Neoperētās kājas audos kopumā vērojām maz līdz vidēji daudz (+/++) pozitīvu struktūru (sk. 47. mikrofotogrāfiju pielikumā). Tomēr atradne bija variabla un tika atrasts pat maz (+) *NFkB-105* pozitīvu šūnu.

Nukleārā faktora kappa beta-105 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums kontroles un osteoporotisko dzīvnieku audos

Paugaugu skaits	A grupa	B grupa				C grupa				D grupa	
		<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>		<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>		<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>		<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>		<i>sham</i>	
		operētā kāja n = 7	neoperētā kāja n = 7	operētā kāja n = 7	neoperētā kāja n = 7	operētā kāja n = 6	neoperētā kāja n = 6	operētā kāja n = 8	neoperētā kāja n = 8	operētā kāja n = 6	neoperētā kāja n = 6
1.	++	++	+/++	+/++	+/++	+++	+/++	++	+/++	+	+
2.	+/++	++	+	+/++	+	+++	++	++	+/++	+/++	+
3.	+/++	++	+	++	+	+++ /++++	++	++	++	+/++	+/++
4.	++	+/++	+	+	+	++	+/++	+++	++	++ /++++	++ /++++
5.	++	++	+	+	0	++	+/++	++ /++++	+	++	++
6.	++	++	+	+/++	+	+++	++	++	++	++	++
7.	++	++	+	+/++	+			++	+/++		
8.	++							+++	++		
9.	++										
10.	++										
Vidēji	++	++	+	+/++	+	+++	+/++	++	++	++	++

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

0 – nevienas pozitīvas struktūras redzes laukā; + maz pozitīvu struktūru redzes laukā; +/+ maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; ++ vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; +++ vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; ++++ daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; ++++/++++ daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru redzes laukā.

- Operētās kājas audos *NFkB-105* pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētās kājas audos (sk. 3.14. tab.).
- Statistiski ticama atšķirība *NFkB-105* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem netika atrasta (sk. 3.15. tab.).

Nukleārā faktora kappā beta-105 (*NFkB-105*) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **D grupas** audos bija līdzīga (sk. 3.13. tab.). **Sham operētās** kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts vidēji daudz (++) *NFkB-105* pozitīvu struktūru (sk. 48. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne bija variabla un iezīmējas gan maz (+), gan vidēji daudz līdz daudz (++) pozitīvu šūnu redzes laukā. Arī **neoperētās** kājas audu paraugos kopumā atradām vidēji daudz (++) *NFkB-105* pozitīvu kaula šūnu (sk. 49. mikrofotogrāfiju pielikumā).

- Statistiski ticama atšķirība starp kopējo *NFkB-105* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos netika atrasta (sk. 3.14. tab.).
- Statistiski ticama atšķirība *NFkB-105* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem netika atrasta (sk. 3.15. tab.).

Nukleārā faktora kappā beta-105 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 granulu implantācijas (sk. 3.15. tab.).

Nukleārā faktora kappā beta 105 pozitīvas kaula šūnas audu paraugos pēc **Sr-*HA*₇₀/*TCP*₃₀** granulu implantācijas tika novērotas statistiski ticami vairāk nekā audu paraugos pēc *Sr-*HA*₃₀/*TCP*₇₀*, *HA*₃₀/*TCP*₇₀ granulu implantācijas un *sham* operācijas (sk. 3.15. tab.).

Nukleārā faktora kappā beta 105 pozitīvas kaula šūnas audu paraugos pēc ***HA*₇₀/*TCP*₃₀** granulu implantācijas tika novērotas statistiski ticami vairāk nekā audu paraugos pēc *HA*₃₀/*TCP*₇₀ granulu implantācijas un *sham* operācijas (sk. 3.15. tab.).

3.14. tabula

Nukleārā faktora kappā beta-105 pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma salīdzinājums osteoporotisko dzīvnieku operētās un neoperētās kājas audos

Nr.	Grupa	Kāja	Paraugu skaits	Rangu vidējais rādītājs	Rangu summa	Manna Vitnija U tests	P vērtība
1.	<i>Sr-<i>HA</i>₃₀/<i>TCP</i>₇₀</i>	Operētā	7	10,93	76,50	0,50	0,001
		Neoperētā	7	4,07	28,50		
2.	<i>HA</i> ₃₀ / <i>TCP</i> ₇₀	Operētā	7	9,71	68,00	9,00	0,030
		Neoperētā	7	5,29	37,00		
3.	<i>Sr-<i>HA</i>₇₀/<i>TCP</i>₃₀</i>	Operētā	6	9,00	54,00	3,00	0,012
		Neoperētā	6	4,00	24,00		
4.	<i>HA</i> ₇₀ / <i>TCP</i> ₃₀	Operētā	8	11,25	90,00	10,00	0,011
		Neoperētā	8	5,75	46,00		
5.	<i>Sham</i>	Operētā	6	6,75	40,50	16,50	0,794
		Neoperētā	6	6,25	37,50		

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

Nukleārā faktora kappā beta-105 pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma salīdzinājums kontroles un osteoporotisko dzīvnieku operētās kājas audos

Nr.	Grupa	Paraugu skaits	Rangu vidējais rādītājs	Rangu summa	Manna-Vitnija U tests	p vērtība
1.	Kontrole	10	9,10	91,00	34,00	0,895
	<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>	7	8,86	62,00		
2.	Kontrole	10	11,55	115,50	9,50	0,007
	<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>	7	5,36	37,50		
3.	Kontrole	10	6,50	65,00	10,00	0,016
	<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>	6	11,83	71,00		
4.	Kontrole	10	7,95	79,50	24,50	0,100
	<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>	8	11,44	91,50		
5.	Kontrole	10	9,65	96,50	18,50	0,148
	<i>Sham</i>	6	6,58	39,50		
6.	<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>	7	10,14	71,00	6,00	0,01
	<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>	7	4,86	34,00		
7.	<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>	7	4,86	34,00	6,00	0,014
	<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>	6	9,50	57,00		
8.	<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>	7	6,14	43,00	15,00	0,058
	<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>	8	9,63	77,00		
9.	<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>	7	8,14	57,00	13,00	0,159
	<i>Sham</i>	6	5,67	34,00		
10.	<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>	7	4,14	29,00	1,00	0,003
	<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>	6	10,33	62,00		
11.	<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>	7	4,36	30,50	2,50	0,002
	<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>	8	11,19	89,50		
12.	<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>	7	5,93	41,50	13,50	0,249
	<i>Sham</i>	6	8,25	49,50		
13.	<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>	6	9,33	56,00	13,00	0,124
	<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>	8	6,13	49,00		
14.	<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>	6	9,00	54,00	3,00	0,012
	<i>Sham</i>	6	4,00	24,00		
15.	<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>	8	9,56	76,50	7,50	0,018
	<i>Sham</i>	6	4,75	28,50		

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

Osteoprotegerīna (OPG) pozitīvas šūnas **kontroles** grupā kopumā tika atrastas vidēji daudz līdz daudz (++)/+++ (sk. 50. mikrofotogrāfiju pielikumā). Faktora ekspresija bija stabila un tikai divos gadījumos tika konstatēts vidēji daudz (++) **OPG** pozitīvu struktūru (sk. 3.16. tab.).

Osteoprotegerīna (OPG) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **B grupas** audos bija variabla. ***Sr-HA₃₀/TCP₇₀*** operētās kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts daudz (++) **OPG** pozitīvu kaula šūnu (sk. 3.16. tab. un 51. mikrofotogrāfiju pielikumā). Tikai vienā gadījumā tika novērots vidēji daudz (++) **OPG** pozitīvu struktūru. Savukārt ***neoperētās*** kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) **OPG** pozitīvu šūnu (sk. 52. mikrofotogrāfiju pielikumā). Tikai vienā gadījumā tika novērots vidēji daudz līdz daudz (++)/+++ pozitīvu kaula šūnu.

- Operētās kājas audos *OPG* pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētā kājā (sk. 3.17. tab.).
- Statistiski ticama atšķirība *OPG* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem netika atrasta (sk. 3.18. tab.).

HA₃₀/TCP₇₀ operētās kājas audos vidēji tika konstatēts vidēji daudz (++) *OPG* pozitīvu struktūru (sk. 3.16. tab. un 53. mikrofotogrāfiju pielikumā). Vienā gadījumā tika atrasts daudz (+++) *OPG* saturošu šūnu. Arī neoperētās kājas audos vidēji tika novērots vidēji daudz (++) *OPG* pozitīvu šūnu (sk. 54. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne bija variabla, un iezīmējas gan maz līdz vidēji daudz (+/+), gan vidēji daudz līdz daudz (++) pozitīvi osteocīti redzes laukā.

- Statistiski ticama atšķirība starp kopējo *OPG* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos netika atrasta (sk. 3.17. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu, *OPG* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami mazāk (sk. 3.18. tab.).

Osteoprotegerīna (*OPG*) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **C grupas** audos bija variabla. **Sr-HA₇₀/TCP₃₀ operētās** kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts daudz (+++) *OPG* pozitīvu kaula šūnu (sk. 3.16. tab. un sk. 55. mikrofotogrāfiju pielikumā). Tikai divos gadījumos tika novērots vidēji daudz līdz daudz (++) *OPG* pozitīvu šūnu. Savukārt neoperētās kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) *OPG* pozitīvu šūnu (sk. 56. mikrofotogrāfiju pielikumā). To atradne bija konstanta, jo tikai vienā gadījumā tika atrasts maz līdz vidēji daudz (+/++) *OPG* pozitīvu šūnu redzes laukā.

- Operētās kājas audos *OPG* pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētās kājas audos (sk. 3.17. tab.).
- Statistiski ticama atšķirība *OPG* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem arī netika atrasta (sk. 3.18. tab.).

HA₇₀/TCP₃₀ operētās kājas audos vidēji tika konstatēts vidēji daudz (++) *OPG* pozitīvu šūnu (sk. 3.16. tab. un 57. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne variēja no vidēji daudz (++) līdz daudz (+++) pozitīvām struktūrām redzes laukā. Daudz šūnu tika atrasts tikai divos gadījumos.

Osteoproteģerīna pozitīvo šūnu relatīvais daudzums kontroles un osteoporotisko dzīvnieku audos

Paugaugu skaits	A grupa	B grupa				C grupa				D grupa	
		<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>		<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>		<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>		<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>		<i>sham</i>	
	kontrole n = 10	operētā kāja n = 7	neoperētā kāja n = 7	operētā kāja n = 7	neoperētā kāja n = 7	operētā kāja n = 6	neoperētā kāja n = 6	operētā kāja n = 8	neoperētā kāja n = 8	operētā kāja n = 6	neoperētā kāja n = 6
1.	++/+++	+++	++/+++	++	++/+++	+++	++	++	+/++	++	++
2.	++/+++	+++	++	+++	++/+++	+++	++	++	++	++/+++	++
3.	++/+++	+++	++	++/+++	++	++/+++	++	+++	++	++	++/+++
4.	++	++	++	++	++	+++	+/++	++	+/++	++/+++	++
5.	++/+++	++/+++	++	++	+/++	++/+++	++	++	++	++	++
6.	+++	++/+++	++	++	++	+++	++	++	++	+++	++
7.	++	+++	++	++	++			++	+/++		
8.	++/+++							+++	++		
9.	++/+++										
10.	+++										
Vidēji	++/+++	+++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++

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

+/++ maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; ++ vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; ++/+++ vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; +++ daudz pozitīvu struktūru redzes laukā.

HA₇₀/TCP₃₀ neoperētās kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) **OPG** pozitīvu šūnu (sk. 58. mikrofotogrāfiju pielikumā). Trīs audu paraugi uzrādīja maz līdz vidēji daudz (+/++) pozitīvu osteocītu redzes laukā. Savukārt daudz pozitīvu šūnu netika konstatēts.

- Operētās kājas audos **OPG** pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētās kājas audos (sk. 3.17. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu **OPG** pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami mazāk (sk. 3.18. tab.).

Osteoprotegerīna (OPG) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **D grupas** audu paraugos bija samērā līdzīga (sk. 3.16. tab.). **Sham operētās** kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts vidēji daudz (++) **OPG** pozitīvu šūnu (sk. 59. mikrofotogrāfiju pielikumā). **Neoperētās** kājas audu paraugos kopumā atradām vidēji daudz (++) **OPG** pozitīvu šūnu (sk. 60. mikrofotogrāfiju pielikumā). Vidēji daudz līdz daudz (++/+++) pozitīvu šūnu tika atrasts tikai vienā gadījumā.

- Statistiski ticama atšķirība starp kopējo **OPG** pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos netika atrasta (sk. 3.17. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu, **OPG** pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami mazāk (sk. 3.18. tab.).

Osteoprotegerīna pozitīvas kaula šūnas audu paraugos pēc **Sr-HA₃₀/TCP₇₀** granulu implantācijas tika novērotas statistiski ticami vairāk nekā audu paraugos pēc **HA₃₀/TCP₇₀** vai **HA₇₀/TCP₃₀** granulu implantācijas un **sham** operācijas (sk. 3.18. tab.).

Osteoprotegerīna pozitīvas kaula šūnas audu paraugos pēc **Sr-HA₇₀/TCP₃₀** granulu implantācijas tika novērotas statistiski ticami vairāk nekā audu paraugos pēc **HA₃₀/TCP₇₀** vai **HA₇₀/TCP₃₀** granulu implantācijas un **sham** operācijas (sk. 3.18. tab.).

3.17. tabula

Osteoprotegerīna pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma salīdzinājums osteoporotisko dzīvnieku operētās un neoperētās kājas audos

Nr.	Grupa	Kāja	Paraugu skaits	Rangu vidējais rādītājs	Rangu summa	Manna Vitnija U tests	p vērtība
1.	<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>	Operētā	7	10,29	72,00	5,00	0,007
		Neoperētā	7	4,71	33,00		
2.	<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>	Operētā	7	8,00	56,00	21,00	0,600
		Neoperētā	7	7,00	49,00		
3.	<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>	Operētā	6	9,50	57,00	3,00	0,002
		Neoperētā	6	3,50	21,00		
4.	<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>	Operētā	8	10,63	85,00	15,00	0,029
		Neoperētā	8	6,38	51,00		
5.	<i>Sham</i>	Operētā	6	7,00	42,00	15,00	0,523
		Neoperētā	6	6,00	36,00		

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

Osteoprotegerīna pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma salīdzinājums kontroles un osteoporotisko dzīvnieku operētās kājas audos

Nr.	Grupa	Paraugu skaits	Rangu vidējais rādītājs	Rangu summa	Manna-Vitnija U tests	p vērtība
1.	Kontrole	10	8,45	84,50	29,50	0,561
	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	9,79	68,50		
2.	Kontrole	10	11,05	110,50	14,50	0,033
	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	6,07	42,50		
3.	Kontrole	10	7,50	75,00	20,00	0,232
	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	10,17	61,00		
4.	Kontrole	10	11,60	116,00	19,00	0,049
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	6,88	55,500		
5.	Kontrole	10	10,50	105,00	10,00	0,018
	Sham	6	5,17	31,00		
6.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	9,64	67,50	9,50	0,04
	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	5,36	37,50		
7.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	6,57	46,00	18,00	0,619
	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	7,50	45,00		
8.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	10,14	71,00	13,00	0,048
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	6,13	49,00		
9.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	9,14	64,00	6,00	0,023
	Sham	6	4,50	27,00		
10.	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	4,71	33,00	5,00	0,015
	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	9,67	58,00		
11.	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	8,00	56,00	28,00	1,000
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	8,00	64,00		
12.	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	7,00	49,00	21,00	1,000
	Sham	6	7,00	42,00		
13.	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	10,17	61,00	8,00	0,025
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	5,50	44,00		
14.	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	9,17	55,00	2,00	0,007
	Sham	6	3,83	23,00		
15.	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	7,50	60,00	24,00	1,000
	Sham	6	7,50	45,00		

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

3.3.3. Kaula deģenerācijas enzīmi un to nomācēj faktori

Matrices metaloproteināzes-2 (MMP-2) pozitīvās šūnas tika atrastas visos **kontroles** grupas preparātu audos (sk. 3.19. tab.). Vidēji MMP-2 pozitīvi osteocīti tika konstatēti vidēji daudz (++) (sk. 61. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne bija variabla, un tā variēja no maz (+) līdz daudz (+++) MMP-2 pozitīvām šūnām.

Matrices metaloproteināzes-2 (MMP-2) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **B grupas** audos arī bija variabla. **Sr-HA₃₀/TCP₇₀ operētās** kājas audu paraugos kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) MMP-2 pozitīvu kaula šūnu (sk. 3.19. tab. un 62. mikrofotogrāfiju pielikumā). Pozitīvo struktūru daudzums variēja no maz (+) līdz daudz (+++) redzes laukā. Neoperētās

kājas audu paraugi vidēji saturēja maz līdz vidēji daudz (+/++) *MMP-2* pozitīvu šūnu (sk. 63. mikrofotogrāfiju pielikumā).

- Statistiski ticama atšķirība starp kopējo *MMP-2* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos netika atrasta (sk. 3.20. tab.).
- Statistiski ticama atšķirība *MMP-2* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem netika atrasta (sk. 3.21. tab.).

HA₃₀/TCP₇₀ operētās kājas audos vidēji tika konstatēts vidēji daudz (++) *MMP-2* pozitīvu struktūru (sk. 3.19. tab. un 64. mikrofotogrāfiju pielikumā). Faktora pozitīvo šūnu skaits variēja no maz līdz vidēji daudz (+/++) un līdz daudz (+++) pozitīvām struktūrām redzes laukā. Neoperētās kājas audos vidēji tika novērots maz līdz vidēji daudz (+/++) pozitīvu struktūru (sk. 65. mikrofotogrāfiju pielikumā).

- Operētās kājas audos *MMP-2* pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētās kājas audos (sk. 3.20. tab.).
- Statistiski ticama atšķirība *MMP-2* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem netika atrasta (sk. 3.21. tab.).

Matrices metaloproteināzes-2 (*MMP-2*) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **C grupas** audos bija variabla. ***Sr-HA₇₀/TCP₃₀*** operētās kājas audu paraugos vidējais *MMP-2* pozitīvo kaula šūnu skaits bija vidēji daudz līdz daudz (++/+++) (sk. 3.19. tab. un 66. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne variēja no vidēji daudz (++) līdz daudz (+++) pozitīvām struktūrām redzes laukā, vidēji daudz struktūru tika atrasts tikai vienā paraugā. Savukārt *MMP-2* klātbūtne neoperētās kājas audos tika konstatēta mazākā daudzumā. Vidēji vērojām maz līdz vidēji daudz (+/++) *MMP-2* pozitīvu šūnu redzes laukā (sk. 67. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne variēja no maz (+) šūnām trijos paraugos, maz līdz vidēji daudz (+/++) – divos paraugos un vidēji daudz (++) pozitīvām *MMP-2* šūnām tikai vienā paraugā.

- Operētās kājas audos *MMP-2* pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētā kājā (sk. 3.20. tab.).
- Statistiski ticama atšķirība *MMP-2* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem netika atrasta (sk. 3.21. tab.).

HA₇₀/TCP₃₀ operētās kājas audos kopumā tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++) *MMP-2* pozitīvu struktūru (sk. 3.19. tab. un 68. mikrofotogrāfiju pielikumā). Daudz (+++) pozitīvu struktūru atradām tikai divos audu paraugos, vidēji daudz līdz daudz – vienā, bet piecos audu paraugos konstatējām vidēji daudz *MMP-2* pozitīvu šūnu. ***HA₇₀/TCP₃₀*** neoperētās kājas audos vidēji vērojām vidēji daudz (++) pozitīvu šūnu (sk. 69. mikrofotogrāfiju pielikumā). Tomēr atradne bija variabla un tika atrasts pat maz (+) *MMP-2* pozitīvu šūnu.

Matrices metaloproteināzes-2 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums kontroles un osteoporotisko dzīvnieku audos

Paugaugu skaits	A grupa	B grupa				C grupa				D grupa	
		<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>		<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>		<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>		<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>		<i>sham</i>	
	kontrole n = 10	operētā kāja n = 7	neoperētā kāja n = 7	operētā kāja n = 7	neoperētā kāja n = 7	operētā kāja n = 6	neoperētā kāja n = 6	operētā kāja n = 8	neoperētā kāja n = 8	operētā kāja n = 6	neoperētā kāja n = 6
1.	++	+++	++	++	+	++/+++	++	+++/++++	+	+	0/+
2.	++/+++	++	++	++	+	++/+++	+/++	+++	+	++	+
3.	+++	++	++	+++	+/++	++	+	+++	++	++	+/++
4.	+/++	+/++	+	++	+/++	+++	+/++	++/+++	+/++	+++	++
5.	+/++	++	+	++	+	++/+++	+	++	++	+++/++++	+++
6.	++/+++	+/++	+	+/++	+	+++	+	++/+++	++	++/+++	+/++
7.	+	+	+	++	+/++			++	++		
8.	+							++	+/++		
9.	++										
10.	++/+++										
Vidēji	++	++	+/++	++	+/++	++/+++	+/++	++/+++	+/++	++	+/++

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

0/+ dažas pozitīvas struktūras redzes laukā; + maz pozitīvu struktūru redzes laukā; +/+ maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; ++ vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; +++/+++ vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; +++ daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; +++/++++ daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru redzes laukā.

- Operētās kājas audos *MMP-2* pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētās kājas audos (sk. 3.20. tab.).
- Statistiski ticama atšķirība *MMP-2* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem netika atrasta (sk. 3.21. tab.).

Matrices metaloproteināzes-2 (*MMP-2*) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **D grupas** audu paraugos bija samērā līdzīga (sk. 3.19. tab.). **Sham** operētās kājas audu paraugos kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) *MMP-2* pozitīvu struktūru (sk. 70. mikrofotogrāfiju pielikumā). Faktora pozitīvo šūnu atradne bija variabla. Tā variēja no maz (+) līdz daudz līdz ļoti daudz (+++/+++++) pozitīvām *MMP-2* šūnām redzes laukā. Neoperētās kājas audu paraugos vidēji atradām maz līdz vidēji daudz (+/++) *MMP-2* pozitīvu šūnu (sk. 71. mikrofotogrāfiju pielikumā). Faktora pozitīvo šūnu atradne variēja pat no dažām (0/+) līdz daudz (+++) *MMP-2* pozitīvām šūnām redzes laukā.

- Statistiski ticama atšķirība starp kopējo *MMP-2* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos netika atrasta (sk. 3.20. tab.).
- Statistiski ticama atšķirība *MMP-2* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem netika atrasta (sk. 3.21. tab.).

Matrices metaloproteināzes-2 pozitīvas kaula šūnas audu paraugos pēc **Sr-*HA*₇₀/*TCP*₃₀** granulu implantācijas tika novērotas statistiski ticami vairāk nekā audu paraugos pēc **Sr-*HA*₃₀/*TCP*₇₀** un ***HA*₃₀/*TCP*₇₀** granulu implantācijas (sk. 3.21. tab.).

Matrices metaloproteināzes-2 pozitīvas kaula šūnas audu paraugos no operētās kājas pēc ***HA*₇₀/*TCP*₃₀** granulu implantācijas tika novērotas statistiski ticami vairāk nekā audu paraugos pēc **Sr-*HA*₃₀/*TCP*₇₀** granulu implantācijas (sk. 3.21. tab.).

3.20. tabula

Matrices metaloproteināzes-2 pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma salīdzinājums osteoporotisko dzīvnieku operētās un neoperētās kājas audos

Nr.	Grupa	Kāja	Paraugu skaits	Rangu vidējais rādītājs	Rangu summa	Manna Vitnija U tests	p vērtība
1.	<i>Sr-HA</i> ₃₀ / <i>TCP</i> ₇₀	Operētā	7	8,79	61,50	15,50	0,219
		Neoperētā	7	6,21	43,50		
2.	<i>HA</i> ₃₀ / <i>TCP</i> ₇₀	Operētā	7	10,79	75,50	1,50	0,002
		Neoperētā	7	4,21	29,50		
3.	<i>Sr-HA</i> ₇₀ / <i>TCP</i> ₃₀	Operētā	6	9,42	56,20	0,50	0,004
		Neoperētā	6	3,58	21,50		
4.	<i>HA</i> ₇₀ / <i>TCP</i> ₃₀	Operētā	8	11,75	94,00	6,00	0,004
		Neoperētā	8	5,25	42,00		
5.	<i>Sham</i>	Operētā	6	8,00	48,00	9,00	0,145
		Neoperētā	6	5,00	30,00		

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

Matrices metaloproteināzes-2 pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma salīdzinājums kontroles un osteoporotisko dzīvnieku operētās kājas audos

Nr.	Grupa	Paraugu skaits	Rangu vidējais rādītājs	Rangu summa	Manna-Vitnija U tests	p vērtība
1.	Kontrole	10	9,75	97,50	27,50	0,450
	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	7,93	55,50		
2.	Kontrole	10	9,10	91,00	34,00	0,917
	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	8,86	62,00		
3.	Kontrole	10	6,90	69,00	14,00	0,071
	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	11,17	67,00		
4.	Kontrole	10	7,75	77,50	22,50	0,108
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	11,69	93,50		
5.	Kontrole	10	7,85	78,50	23,50	0,470
	Sham	6	9,58	57,50		
6.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	6,57	46,00	18,00	0,354
	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	8,43	59,00		
7.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	4,93	34,50	6,50	0,033
	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	9,42	56,50		
8.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	5,50	38,50	10,50	0,035
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	10,19	81,50		
9.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	5,86	41,00	13,00	0,238
	Sham	6	8,33	50,00		
10.	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	5,07	35,50	7,50	0,040
	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	9,25	55,50		
11.	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	5,93	41,50	13,50	0,067
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	9,81	78,50		
12.	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	6,21	43,50	15,50	0,392
	Sham	6	7,92	47,50		
13.	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	7,75	46,50	22,50	0,839
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	7,31	58,50		
14.	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	7,08	42,50	14,50	0,563
	Sham	6	5,92	35,50		
15.	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	7,94	63,50	20,50	0,662
	Sham	6	6,92	41,50		

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

Matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitora (TIMP-2) pozitīvas šūnas kontroles grupā vidēji tika atrastas vidēji daudz līdz daudz (++) (++++) (sk. 72. mikrofotogrāfiju pielikumā). Divos paraugos TIMP-2 pozitīvo struktūru bija maz līdz vidēji daudz (+++), divos gadījumos – vidēji daudz (++), savukārt vidēji daudz līdz daudz (++) (++++) faktora pozitīvu šūnu tika atrasts sešos audu paraugos (sk. 3.22. tab.).

Matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitora (TIMP-2) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku B grupas audu paraugos bija līdzīga. Sr-HA₃₀/TCP₇₀ operētās kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts daudz (++++) TIMP-2 pozitīvu kaula šūnu (sk. 3.22. tab. un 73. mikrofotogrāfiju pielikumā). TIMP-2 faktora klātbūtne audos bija samērā stabila. Tikai divos paraugos tika novērots vidēji daudz līdz daudz (++) (++++) TIMP-2 pozitīvu struktūru. Līdzīgi arī

neoperētās kājas audu paraugi vidēji saturēja daudz (+++) *TIMP-2* pozitīvu šūnu (sk. 74. mikrofotogrāfiju pielikumā). Bija atrodamas gan vidēji daudz, gan daudz faktora saturošas šūnas.

- Statistiski ticama atšķirība starp kopējo *TIMP-2* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos netika atrasta (sk. 3.23. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu *TIMP-2* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk (sk. 3.24. tab.).

HA₃₀/TCP₇₀ operētās kājas audos vidēji tika konstatēts daudz (+++) *TIMP-2* pozitīvu struktūru (sk. 3.22. tab. un 75. mikrofotogrāfiju pielikumā). Tikai vienā paraugā tika atrasts vidēji daudz (++) *TIMP-2* saturošu šūnu. Neoperētās kājas audos kopumā tika novērots vidēji daudz līdz daudz (++) *TIMP-2* pozitīvu šūnu (sk. 76. mikrofotogrāfiju pielikumā). Iezīmējas vidēji daudz (++) , vidēji daudz līdz daudz (++) un daudz (++) pozitīvu struktūru redzes laukā.

- Statistiski ticama atšķirība starp kopējo *TIMP-2* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos netika atrasta (sk. 3.23. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu *TIMP-2* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk (sk. 3.24. tab.).

Matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitora (*TIMP-2*) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **C grupas** audos bija variabla. ***Sr-HA₇₀/TCP₃₀*** operētās kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts daudz (+++) *TIMP-2* pozitīvu kaula šūnu (sk. 3.22. tab. un 77. mikrofotogrāfiju pielikumā). Tikai vienā gadījumā tika novērots vidēji daudz līdz daudz (++) *TIMP-2* pozitīvu struktūru. Savukārt neoperētās kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) *TIMP-2* pozitīvu šūnu (sk. 78. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne variēja no maz līdz vidēji daudz (++) un līdz vidēji daudz līdz daudz (++) pozitīvām šūnām redzes laukā.

- Operētās kājas audos *TIMP-2* pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētās kājas audos (sk. 3.23. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu *TIMP-2* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk (sk. 3.24. tab.).

HA₇₀/TCP₃₀ operētās kājas audos vidēji tika konstatēts daudz (+++) *TIMP-2* pozitīvu struktūru (sk. 3.22. tab. un 79. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne variēja no vidēji daudz līdz daudz (++) pozitīvām struktūrām redzes laukā trīs paraugos, daudz (++) – četros paraugos un daudz līdz ļoti daudz (++) *TIMP-2* pozitīvu šūnu vienā audu paraugā.

Matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitora pozitīvo šūnu relatīvais daudzums kontroles un osteoporotisko dzīvnieku audos

P a r a u g u s k a i t s	A grupa	B grupa				C grupa				D grupa	
		Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀		HA ₃₀ /TCP ₇₀		Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀		HA ₇₀ /TCP ₃₀		sham	
	kontrole n = 10	operētā kāja n = 7	neoperētā kāja n = 7	operētā kāja n = 7	neoperētā kāja n = 7	operētā kāja n = 6	neoperētā kāja n = 6	operētā kāja n = 8	neoperētā kāja n = 8	operētā kāja n = 6	neoperētā kāja n = 6
1.	++/+++	++/+++	++/+++	+++	++	+++	++/+++	+++/++++	++	+++	+++
2.	++/+++	+++	++/+++	+++	++/+++	+++	++/+++	++/+++	++	+++	+++
3.	++/+++	+++	++/+++	++	++	+++	+ / ++	++/+++	+ / ++	+++	+++
4.	++	+++	++	+++	+++	+++	++/+++	++/+++	+ / ++	++	++
5.	++/+++	+++	+++	+++	++	++/+++	+ / ++	+++	++/+++	+++	+++
6.	++/+++	+++	+++	+++	++/+++	+++	++	+++	+ / ++	++++	+++
7.	+ / ++	++/+++	+++	+++	+++			+++	++		
8.	+ / ++							+++	+ / ++		
9.	++										
10.	++/+++										
Vidēji	++/+++	+++	+++	+++	++/+++	+++	++	+++	++	+++	+++

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

+ / ++ maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; ++ vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; ++ / +++ vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru redzes laukā;

+++ daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; +++ / ++++ daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; ++++ ļoti daudz pozitīvu struktūru redzes laukā.

Neoperētās kājas audu paraugi kopumā saturēja vidēji daudz (++) *TIMP-2* pozitīvu šūnu (sk. 80. mikrofotogrāfiju pielikumā).

- Operētās kājas audos *TIMP-2* pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētās kājas audos (sk. 3.23. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu *TIMP-2* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami mazāk (sk. 3.24. tab.).

Matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitora (*TIMP-2*) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **D grupas** audu paraugos bija līdzīga (sk. 3.22. tab.). **Sham operētās** kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts daudz (+++) *TIMP-2* pozitīvu struktūru (sk. 81. mikrofotogrāfiju pielikumā). Faktora pozitīvu šūnu tika konstatēts gan vidēji daudz (++) , gan daudz līdz ļoti daudz (+++/++++). Neoperētās kājas audu paraugos vidēji atradām arī daudz (++) *TIMP-2* pozitīvu šūnu (sk. 82. mikrofotogrāfiju pielikumā). Vidēji daudz (++) pozitīvu šūnu tika atrasts tikai vienā audu paraugā.

- Statistiski ticama atšķirība starp kopējo *TIMP-2* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos netika atrasta (sk. 3.23. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu *TIMP-2* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk (sk. 3.24. tab.).

Matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitora klātbūtne visu osteoporotisko dzīvnieku operēto kāju audos bija līdzīga, un statistiski nozīmīga atšķirība netika atrasta (sk. 3.24. tab.).

3.23. tabula

Matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitora pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma salīdzinājums osteoporotisko dzīvnieku operētās un neoperētās kājas audos

Nr.	Grupa	Kāja	Paraugu skaits	Rangu vidējais rādītājs	Rangu summa	Manna Vitnija U tests	p vērtība
1.	<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>	Operētā	7	8,64	60,50	16,50	0,244
		Neoperētā	7	6,36	44,50		
2.	<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>	Operētā	7	9,36	65,50	11,50	0,062
		Neoperētā	7	5,64	39,50		
3.	<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>	Operētā	6	9,25	55,50	1,50	0,005
		Neoperētā	6	3,75	22,50		
4.	<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>	Operētā	8	12,31	98,50	1,50	0,001
		Neoperētā	8	4,69	37,50		
5.	<i>Sham</i>	Operētā	6	6,92	41,50	15,50	0,598
		Neoperētā	6	6,08	36,50		

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

**Matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitora pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma
salīdzinājums kontroles un osteoporotisko dzīvnieku operētās kājas audos**

Nr.	Grupa	Paraugu skaits	Rangu vidējais rādītājs	Rangu summa	Manna-Vitnija U tests	p vērtība
1.	Kontrole	10	6,10	61,00	6,00	0,002
	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	13,14	92,00		
2.	Kontrole	10	6,20	62,00	7,00	0,004
	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	13,00	91,00		
3.	Kontrole	10	5,80	58,00	3,00	0,002
	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	13,00	78,00		
4.	Kontrole	10	6,40	64,00	9,00	0,003
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	13,38	107,00		
5.	Kontrole	10	6,20	62,00	7,00	0,01
	Sham	6	12,33	74,00		
6.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	7,14	50,00	22,00	0,656
	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	7,86	55,00		
7.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	6,64	46,50	18,50	0,626
	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	7,42	44,50		
8.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	8,00	56,00	28,00	1,000
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	8,00	64,00		
9.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	6,43	45,00	17,00	0,484
	Sham	6	7,67	46,00		
10.	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	7,00	49,00	21,00	1,000
	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	7,00	42,00		
11.	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	8,29	58,00	26,00	0,782
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	7,75	62,00		
12.	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	6,64	46,50	18,50	0,628
	Sham	6	7,42	44,50		
13.	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	7,92	47,50	21,50	0,703
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	7,19	57,50		
14.	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	6,17	37,00	16,00	0,674
	Sham	6	6,83	41,00		
15.	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	7,00	56,00	20,00	0,565
	Sham	6	8,17	49,00		

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

3.3.4. Kaula resorbcijas un lokālās imunitātes faktori

Kontroles grupā vidēji tika atrastas dažas (0/+) **interleikīna-1 (Il-1)** pozitīvas šūnas (0/+) (sk. 83. mikrofotogrāfiju pielikumā). Vienā audu paraugā netika konstatētas faktora pozitīvas šūnas redzes laukā. Dažas (0/+) struktūras tika novērotas sešos gadījumos un maz (+) struktūru – trīs gadījumos (sk. 3.25. tab.).

Interleikīna-1 (Il-1) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **B grupas** audu paraugos bija variabla. **Sr-HA₃₀/TCP₇₀** operētās kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts maz (+) **Il-1** pozitīvu kaula šūnu (sk. 3.25. tab. un 84. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne variēja no dažām (0/+) līdz vidēji daudz (++) pozitīvām šūnām redzes laukā. Savukārt **neoperētās** kājas audu

paraugi vidēji saturēja dažas (0/+) *Il-1* pozitīvas šūnas (sk. 85. mikrofotogrāfiju pielikumā). Divos audu paraugos netika atrastas faktora pozitīvas šūnas. Daži (0/+) imūnpozitīvi osteocīti tika novēroti trīs gadījumos un maz (+) – divos gadījumos.

- Operētās kājas audos *Il-1* pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētā kājā (sk. 3.26. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu *Il-1* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk (sk. 3.27. tab.).

HA₃₀/TCP₇₀ operētās kājas audos vidēji tika konstatēts maz (+) *Il-1* pozitīvu struktūru (sk. 3.25. tab. un 86. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne variēja no pozitīvo šūnu trūkuma līdz vidēji daudz (++) *Il-1* pozitīvām šūnām redzes laukā. Neoperētās kājas audos vidēji tika novērotas dažas (0/+) *Il-1* pozitīvas šūnas (sk. 87. mikrofotogrāfiju pielikumā). Šūnu skaits variēja – no nevienas pozitīvas šūnas (0) līdz maz (+) *Il-1* pozitīviem osteocītiem redzes laukā.

- Statistiski ticama atšķirība starp kopējo *Il-1* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos netika atrasta (sk. 3.26. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu *Il-1* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk (sk. 3.27. tab.).

Interleikīna-1 (*Il-1*) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **C grupas** audu paraugos bija variabla. ***Sr-HA₇₀/TCP₃₀*** operētās kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts maz līdz vidēji daudz (+/++) *Il-1* pozitīvu kaula šūnu (sk. 3.25. tab. un 88. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne variēja no maz (+) līdz vidēji daudz (++) *Il-1* pozitīviem osteocītiem. Savukārt neoperētās kājas audos vidēji bija dažas (0/+) *Il-1* pozitīvas šūnas (sk. 89. mikrofotogrāfiju pielikumā).

- Operētās kājas audos *Il-1* pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētās kājas audos (sk. 3.26. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu *Il-1* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk (sk. 3.27. tab.).

HA₇₀/TCP₃₀ operētās kājas audu paraugos tika novērota lielākā *Il-1* pozitīvo šūnu klātbūtne. *Il-1* vidējais šūnu skaits bija vidēji daudz (++) (sk. 3.22. tab. un 90. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne variēja no maz līdz vidēji daudz (+/++) pozitīvām šūnām piecos audu paraugos, vidēji daudz (++) – divos paraugos un vidēji daudz līdz daudz (++)/++++) *Il-1* pozitīvām struktūrām redzes laukā.

Interleikīna-1 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums kontroles un osteoporotisko dzīvnieku audos

Paraugu skaits	A grupa	B grupa				C grupa				D grupa	
		<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>		<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>		<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>		<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>		<i>sham</i>	
		operētā kāja n = 7	neoperētā kāja n = 7	operētā kāja n = 7	neoperētā kāja n = 7	operētā kāja n = 6	neoperētā kāja n = 6	operētā kāja n = 8	neoperētā kāja n = 8	operētā kāja n = 6	neoperētā kāja n = 6
1.	+	++	+	+	+	+	0/+	++	+	0/+	0/+
2.	+	+/+++	+	+	0/+	+/+++	0/+	+/+++	0/+	+	0/+
3.	0/+	+	0/+	++	0/+	+/+++	+	+/+++	0/+	+	+
4.	0/+	0/+	0	0	+	++	0/+	++/+++	0/+	+	0/+
5.	0/+	+	0/+	+	0	+/+++	+/+++	+/+++	0	+/+++	+/+++
6.	+	+	0	+/+++	0/+	+	0/+	++	+	+/+++	+/+++
7.	0/+	+	0/+	+/+++	+			+/+++	0/+		
8.	0/+							+/+++	+		
9.	0										
10.	0/+										
Vidēji	0/+	+	0/+	+	0/+	+/+++	0/+	++	0/+	+	+

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

0 – nevienas pozitīvas struktūras redzes laukā; 0/+ dažas pozitīvas struktūras redzes laukā; + maz pozitīvu struktūru redzes laukā; +/+ maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; ++ vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; +/++++ vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru redzes laukā.

Savukārt **HA₇₀/TCP₃₀** neoperētās kājas audu paraugi vidēji saturēja dažas (0/+) *Il-1* pozitīvas šūnas (sk. 91. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne bija variabla, un šūnu skaits variēja – no nevienas šūnas (0) līdz maz (+) *Il-1* pozitīvām struktūrām redzes laukā.

- Operētās kājas audos *Il-1* pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētās kājas audos (sk. 3.26. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu *Il-1* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk (sk. 3.27. tab.).

Interleikīna-1 (*Il-1*) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **D grupas** operētās un neoperētās kājas audos bija līdzīga (sk. 3.25. tab.). **Sham** operētās kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts maz (+) *Il-1* pozitīvu struktūru (sk. 92. mikrofotogrāfiju pielikumā). Šūnu skaits variēja no dažām (0/+) līdz maz līdz vidēji daudz (+/++) *Il-1* pozitīvām šūnām redzes laukā. Neoperētās kājas audu paraugi vidēji saturēja maz (+) *Il-1* pozitīvu šūnu (sk. 93. mikrofotogrāfiju pielikumā). Trīs audu paraugos tika atrastas dažas (0/+) faktoru saturošas šūnas.

- Statistiski ticama atšķirība starp kopējo *Il-1* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos netika atrasta (sk. 3.26. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu *Il-1* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk (sk. 3.27. tab.).

Interleikīna-1 pozitīvas kaula šūnas audu paraugos pēc **HA₇₀/TCP₃₀** granulu implantācijas tika novērotas statistiski ticami vairāk nekā audu paraugos pēc **Sr-HA₃₀/TCP₇₀**, **HA₃₀/TCP₇₀** granulu implantācijas un *sham* operācijas (sk. 3.27. tab.).

3.26. tabula

Interleikīna-1 pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma salīdzinājums osteoporotisko dzīvnieku operētās un neoperētās kājas audos

Nr.	Grupa	Kāja	Paraugu skaits	Rangu vidējais rādītājs	Rangu summa	Manna Vitnija U tests	p vērtība
1.	<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>	Operētā	7	9,93	69,50	7,50	0,022
		Neoperētā	7	5,07	35,50		
2.	<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>	Operētā	7	9,43	66,00	11,00	0,071
		Neoperētā	7	5,57	39,00		
3.	<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>	Operētā	6	8,75	52,50	4,50	0,024
		Neoperētā	6	4,25	25,50		
4.	<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>	Operētā	8	12,50	100,00	1,50	0,001
		Neoperētā	8	4,50	36,00		
5.	<i>Sham</i>	Operētā	6	7,17	43,00	14,00	0,498
		Neoperētā	6	5,83	35,00		

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

Interleikīna-1 pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma salīdzinājums kontroles un osteoporotisko dzīvnieku operētās kājas audos

Nr.	Grupa	Paraugu skaits	Rangu vidējais rādītājs	Rangu summa	Manna-Vitnija U tests	p vērtība
1.	Kontrole	10	6,70	67,00	12,00	0,016
	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	12,29	86,00		
2.	Kontrole	10	6,90	69,00	14,00	0,032
	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	12,00	84,00		
3.	Kontrole	10	5,80	58,00	3,00	0,002
	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	13,00	78,00		
4.	Kontrole	10	5,50	55,50	0,50	<0,001
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	14,50	116,00		
5.	Kontrole	10	6,55	65,50	14,50	0,023
	Sham	6	11,75	70,50		
6.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	7,21	50,50	22,50	0,784
	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	7,79	54,50		
7.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	5,86	41,00	13,00	0,221
	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	8,33	50,00		
8.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	5,21	36,50	8,50	0,018
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	10,44	83,50		
9.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	7,07	49,50	14,50	0,938
	Sham	6	6,92	41,50		
10.	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	6,21	43,50	15,50	0,404
	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	7,92	47,50		
11.	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	5,57	39,00	11,00	0,037
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	10,13	81,00		
12.	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	7,36	51,50	18,50	0,703
	Sham	6	6,58	39,50		
13.	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	5,75	34,50	13,50	0,131
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	8,81	70,50		
14.	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	7,83	47,00	10,00	0,167
	Sham	6	5,17	31,00		
15.	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	9,88	79,00	5,00	0,008
	Sham	6	4,33	26,00		

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

Interleikīna-10 (Il-10) pozitīvās šūnas tika atrastas visos **kontroles** grupas preparātos (sk. 3.28. tab.). Vidēji **Il-10** pozitīvi osteocīti tika konstatēti vidēji daudz (++) (sk. 94. mikrofotogrāfija pielikumā). Atradne variēja no maz (+) līdz vidēji daudz un līdz daudz (+++/+++) **Il-10** pozitīvām šūnām, kur maz (+) pozitīvu šūnu tika konstatēts vienā audu paraugā, maz līdz vidēji daudz (+/++) – divos audu paraugos, vidēji daudz (++) – četros paraugos, bet vidēji daudz līdz daudz **Il-10** pozitīvu struktūru tika atrasts trīs audu paraugos.

Interleikīna-10 (Il-10) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **B grupas** audu paraugos bija samērā līdzīga. **Sr-HA₃₀/TCP₇₀** operētās kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts vidēji daudz (++) **Il-10** pozitīvu kaula šūnu (sk. 3.28. tab. un 95. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne variēja no maz līdz vidēji daudz (+/++) faktora pozitīvām šūnām vienā gadījumā, vidēji daudz

(++) – divos gadījumos, vidēji daudz līdz daudz (++) – divos gadījumos un daudz (+++) *Il-10* pozitīvu šūnu vienā gadījumā. Neoperētās kājas audu paraugi vidēji saturēja maz līdz vidēji daudz (+/++) *Il-10* pozitīvu šūnu (sk. 96. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne variēja no maz (+) līdz daudz (+++) *Il-10* pozitīvām struktūrām redzes laukā.

- Statistiski ticama atšķirība starp kopējo *Il-10* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos netika atrasta (sk. 3.29. tab.).
- Statistiski ticama atšķirība *Il-10* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem netika atrasta (sk. 3.30. tab.).

HA₃₀/TCP₇₀ operētās kājas audos kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) *Il-10* pozitīvu struktūru (sk. 3.28. tab. un 97. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne variēja no vidēji daudz (++) līdz daudz (+++) *Il-10* pozitīvām struktūrām redzes laukā. Līdzīgi neoperētās kājas audu paraugi vidēji saturēja vidēji daudz (++) *Il-10* pozitīvu šūnu (sk. 98. mikrofotogrāfiju pielikumā).

- Statistiski ticama atšķirība starp kopējo *Il-10* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos netika atrasta (sk. 3.29. tab.).
- Statistiski ticama atšķirība *Il-10* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem netika atrasta (sk. 3.30. tab.).

Interleikīna-10 (*Il-10*) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **C grupas** audos bija variabla. ***Sr-HA₇₀/TCP₃₀*** operētās kājas audu paraugos kopumā tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++) *Il-10* pozitīvu šūnu (sk. 3.22. tab. un 99. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne variēja no vidēji daudz (++) līdz daudz (+++) *Il-10* pozitīvām struktūrām redzes laukā. Savukārt neoperētās kājas audu paraugi vidēji saturēja maz līdz vidēji daudz (+/++) *Il-10* pozitīvu šūnu (sk. 100. mikrofotogrāfiju pielikumā). To atradne bija variabla. Tā variēja no maz (+) pozitīvām šūnām līdz vidēji daudz (++) pozitīvām šūnām redzes laukā.

- Operētās kājas audos *Il-10* pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētās kājas audos (sk. 3.29. tab.).
- Statistiski ticama atšķirība *Il-10* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audiem netika atrasta (sk. 3.30. tab.).

HA₇₀/TCP₃₀ operētās kājas audos vidēji tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++) *Il-10* pozitīvu struktūru (sk. 3.28. tab. un 101. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne variēja no vidēji daudz (++) līdz daudz (+++) pozitīvām struktūrām redzes laukā. Vidēji daudz (++) šūnu tika atrasts divos audu paraugos, vidēji daudz līdz daudz (++) – četros paraugos, bet daudz (+++) *Il-10* pozitīvu šūnu bija vērojamas divos audu paraugos.

Interleikīna-10 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums kontroles un osteoporotisko dzīvnieku audos

Paraugu skaits	A grupa	B grupa				C grupa				D grupa	
		<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>		<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>		<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>		<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>		<i>sham</i>	
		operētā kāja n = 7	neoperētā kāja n = 7	operētā kāja n = 7	neoperētā kāja n = 7	operētā kāja n = 6	neoperētā kāja n = 6	operētā kāja n = 8	neoperētā kāja n = 8	operētā kāja n = 6	neoperētā kāja n = 6
1.	+/++	++	+++	++	++	++/+++	+/++	+++	+/++	++/+++	+/++
2.	++/+++	+++	+++	++	+/++	++/+++	+	++/+++	++	++	++
3.	++/+++	++	+	+++	++/+++	++/+++	+/++	++	++/+++	+++	+++
4.	+	++/+++	++	++	++	++	++	++/+++	++	+/++	+
5.	++	++/+++	+	++/+++	+	+++	+	++/+++	+/++	+++	++
6.	++	+/++	+/++	++	++	++	+/++	+++	++/+++	+++	++
7.	++	++	+	+++	++			++/+++	+/++		
8.	++							++	+/++		
9.	+/++										
10.	++/+++										
Vidēji	++	++	+/++	++	++	++/+++	+/++	++/+++	++	++/+++	++

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

+ maz pozitīvu struktūru redzes laukā; +/+ maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; ++ vidēji daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; ++/+++ vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru redzes laukā; +++ daudz pozitīvu struktūru redzes laukā.

Savukārt HA₇₀/TCP₃₀ neoperētās kājas audu paraugi vidēji saturēja vidēji daudz (++) *Il-10* pozitīvu šūnu (sk. 102. mikrofotogrāfiju pielikumā).

- Operētās kājas audos *Il-10* pozitīvo struktūru bija statistiski nozīmīgi vairāk nekā neoperētās kājas audos (sk. 3.29. tab.).
- Salīdzinājumā ar kontroles grupu *Il-10* pozitīvo struktūru operētās kājas audos bija statistiski ticami vairāk (sk. 3.30. tab.).

Interleikīna-10 (*Il-10*) klātbūtne osteoporotisko dzīvnieku **D grupas** audu paraugos bija samērā līdzīga (sk. 3.28. tab.). Sham operētās kājas audu paraugos vidēji tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++) *Il-10* pozitīvu struktūru (sk. 103. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atradne variēja no maz līdz vidēji daudz (++) un līdz daudz (++) *Il-10* pozitīvām šūnām redzes laukā. Savukārt neoperētās kājas audu paraugi vidēji saturēja vidēji daudz (++) *Il-10* pozitīvu šūnu (sk. 104. mikrofotogrāfiju pielikumā). Atrasts tika no maz (+) līdz daudz (++) *Il-10* pozitīvām struktūrām redzes laukā.

- Statistiski ticama atšķirība starp kopējo *Il-10* pozitīvo struktūru daudzumu operētās un neoperētās kājas audos netika atrasta (sk. 3.29. tab.).
- Statistiski ticama atšķirība *Il-10* pozitīvo struktūru skaitā starp kontroles grupu un operētās kājas audi netika atrasta (sk. 3.30. tab.).

Interleikīna-10 klātbūtne visu osteoporotisko dzīvnieku operēto kāju audos bija līdzīga, un statistiski nozīmīga atšķirība netika atrasta (sk. 3.30. tab.).

3.29. tabula

Interleikīna-10 pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma salīdzinājums osteoporotisko dzīvnieku operētās un neoperētās kājas audos

Nr.	Grupa	Kāja	Paraugu skaits	Rangu vidējais rādītājs	Rangu summa	Manna Vitnija U tests	P vērtība
1.	<i>Sr-HA₃₀/TCP₇₀</i>	Operētā	7	8,71	61,00	16,00	0,267
		Neoperētā	7	6,29	44,00		
2.	<i>HA₃₀/TCP₇₀</i>	Operētā	7	9,21	64,50	12,50	0,089
		Neoperētā	7	5,79	40,50		
3.	<i>Sr-HA₇₀/TCP₃₀</i>	Operētā	6	9,33	56,00	1,00	0,005
		Neoperētā	6	3,67	22,00		
4.	<i>HA₇₀/TCP₃₀</i>	Operētā	8	11,25	90,00	10,00	0,016
		Neoperētā	8	5,75	46,00		
5.	<i>Sham</i>	Operētā	6	7,92	47,50	9,50	0,157
		Neoperētā	6	5,08	30,50		

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

**Interleikīna-10 pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma salīdzinājums kontroles
un osteoporotisko dzīvnieku operētās kājas audos**

Nr.	Grupa	Paraugu skaits	Rangu vidējais rādītājs	Rangu summa	Manna-Vitnija U tests	p vērtība
1.	Kontrole	10	8,10	81,00	26,00	0,355
	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	10,29	72,00		
2.	Kontrole	10	7,65	76,50	21,50	0,161
	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	10,93	76,50		
3.	Kontrole	10	6,95	69,50	14,50	0,076
	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	11,08	66,50		
4.	Kontrole	10	7,10	71,00	16,00	0,025
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	12,50	100,00		
5.	Kontrole	10	6,95	69,50	14,50	0,084
	Sham	6	11,08	66,50		
6.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	7,00	49,00	21,00	0,630
	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	8,0	56,00		
7.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	6,21	43,50	15,50	0,404
	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	7,92	47,50		
8.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	6,57	46,00	18,00	0,221
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	9,25	74,00		
9.	Sr-HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	6,07	42,50	14,50	0,336
	Sham	6	8,08	48,50		
10.	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	6,64	46,50	18,50	0,701
	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	7,42	44,50		
11.	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	7,14	50,00	22,00	0,460
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	8,75	70,00		
12.	HA ₃₀ /TCP ₇₀	7	6,50	45,50	17,50	0,596
	Sham	6	7,58	45,50		
13.	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	7,00	42,00	21,00	0,674
	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	7,88	63,00		
14.	Sr-HA ₇₀ /TCP ₃₀	6	6,00	36,00	15,00	0,616
	Sham	6	7,00	42,00		
15.	HA ₇₀ /TCP ₃₀	8	7,25	58,00	22,00	0,786
	Sham	6	7,83	47,00		

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

3.4. Imūnhistokīmiski noteikto faktoru savstarpējās korelācijas dati

Kaula trabekulārais laukums un tādi faktori kā *OPG*, *OC*, *NFκB-105*, *BMP-2/4*, *MMP-2*, *TIMP-2*, *Col-1α*, *Il-1* un *Il-10* tika analizēti, izmantojot Spīrmēna rangu korelācijas koeficientu, lai novērtētu savstarpējās atbilstības ciešuma efektivitāti. Statistiski nozīmīgas korelācijas ir norādītas 3.31. tabulā. No analizētajiem parametriem grupu ietvaros vienīgi audu paraugi pēc *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* granulu implantācijas neuzrādīja statistiski ticamas savstarpējās korelācijas.

Ļoti cieša pozitīva korelācija kontroles grupas audos tika konstatēta starp *BMP-2/4* un *Col-1α* ($p = 0,003$, $r_s = 0,829$), *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* audu paraugos starp kaula trabekulāro laukumu un *Col-1α* ($p = 0,028$, $r_s = 0,809$), *HA₃₀/TCP₇₀* audu paraugos starp *OC* un *NFκB-105* ($p = 0,02$, $r_s = 0,833$), *NFκB-105* un *Il-1* ($p = 0,026$, $r_s = 0,814$), *Il-1* un *Col-1α* ($p = 0,026$, $r_s = 0,8014$). Savukārt D grupas audos ļoti stipra pozitīva korelācija tika novērota starp *NFκB-105* un *MMP-2* ($p = 0,005$, $r_s = 0,939$) un *NFκB-105* un *Il-1* ($p = 0,039$, $r_s = 0,833$).

Cieša pozitīva korelācija kontroles grupā tika novērota starp *OC* un *BMP-2/4* ($p = 0,049$, $r_s = 0,634$), *MMP-2* un *Il-10* ($p = 0,042$, $r_s = 0,650$), kaula trabekulāro laukumu un *NFκB-105* ($p = 0,039$, $r_s = 0,657$), *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* audu paraugos starp *NFκB-105* un *Col-1α* ($p = 0,046$, $r_s = 0,734$), *HA₃₀/TCP₇₀* audu paraugos starp *OC* un *Il-1* ($p = 0,042$, $r_s = 0,772$) un *NFκB-105* un *Col-1α* ($p = 0,044$, $r_s = 0,767$), bet *HA₇₀/TCP₃₀* audu paraugos starp *OC* un *MMP-2* ($p = 0,037$, $r_s = 0,736$).

3.31. tabula

Imūnhistoķīmiski noteikto marķieru statistiski nozīmīgas pozitīvas korelācijas

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

Apzīmējums: *Sr* – stroncijs, *HA* – hidroksilapatīts, *TCP* – trikalcijs fosfāts, *KTL* – kaula trabekulārais laukums, SP – cieša pozitīva korelācija, ĻSP – ļoti cieša pozitīva korelācija.

4. Diskusija

Arvien vairāk tiek pētīti dažādi kaulu aizvietojošie materiāli, īpaši tādi, kam pievienotas bioloģiski aktīvas vielas, kuru 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 rezorbciju (Xie et al., 2018). Lokāla osteoporozes ārstēšana un kaula defektu aizvietošana ar biomateriāliem ir daudzsološa metode, taču pirms ieviešanas klīniskā praksē nepieciešams izvērtēt tās drošību un efektivitāti pētījumos ar eksperimenta dzīvniekiem. 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, kas tika implantēti trušu mātītēm ar osteoporozi un tika 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, kuos 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.

Truši kā eksperimenta dzīvnieki arvien biežāk tiek izmantoti kaula reģenerācijas novērtēšanai pēc dažādu biomateriālu implantācijas (Wancket, 2015). Tas ir iespējams, jo jau septiņu līdz astoņu mēnešu vecumā truši ir pieaugušā vecumā, tiem nav nepieciešama sarežģīta aprūpe un to muskuloskeletālā sistēma ir nobriedusi (McGovern, Griffin & Hutmacher, 2018). Trušiem kaulaudu uzbūve un remodelācijas īpatnības ir samērīgi līdzīgas cilvēka kauliem, proti, tiem ir aktīva Haversa kanālu sistēma, dinamiska vecā kaula resorbcija un jauna kaula

veidošanās, kas ir mazāk izteikta citiem eksperimenta dzīvniekiem. Arī kaula minerālais blīvums ir proporcionāli līdzīgs cilvēka fizioloģiskiem un patoloģiskiem kaula stāvokļiem (Wang, Mabrey & Agrawal, 1988). Vēl jo vairāk, trušiem iespējams samērā ātri un bez sarežģītām manipulācijām ierosināt osteoporozi (Wanderman et al., 2018). Mūsdienīgu protokolu dzīvnieku osteoporozes ierosināšanai izveidoja Baofeng et al., un tas ietver ovariectomiju un intramuskulāru metilprednizolona injekciju kursu ar devu 1mg/kg dienā. Nelielā kortikosteroīdu deva ietekmē tikai kaulaudus, neierosinot, piemēram, skrimšļaudu noārdīšanos. Autori atklāja, ka, pielietojot šādu protokolu, kaula minerālais blīvums samazinās vidēji par 36% (Baofeng et al., 2010). Arī mūsu pētījumā tika pielietots šāds protokols.

Lai arī kaula minerālais blīvums netika noteikts, mēs analizējām kaula trabekulāro laukumu. Tika novērota statistiski ticama atšķirība veselajiem un osteoporotiskajiem trušiem, proti, kaula trabekulārais laukums veseliem trušiem vidēji bija 0,393 mm², savukārt osteoporotiskiem trušiem tas variēja no 0,206 mm² līdz 0,242 mm², kas norāda uz tā samazinājumu par 38–48%. Iegūtie dati liecina par stabili ierosinātu osteoporozi visiem eksperimenta dzīvniekiem, neatkarīgi no implantētā biomateriāla vai operētās kājas. To apstiprina arī kaulu morfoloģiskā uzbūve, jo veseliem trušiem bija izteikts kompaktās kaulvielas slānis, bet porainajā kaulvielā tika konstatētas izteiktas trabekulas ar osteocītiem un sarkanās kaula smadzenes ar taukšūnām. Osteoporozes skartajiem trušiem kompaktās kaulvielas slānis bija ievērojami plānāks, un osteonu kanālos bija vērojama izteikta saistaudu proliferācija. Arī porainajā kaulvielā bija vērojamas retas un plānas kaula trabekulas, bet sarkanajās kaula smadzenēs vairāk taukšūnas. Identisku histoloģisko atradni aprakstīja arī *Sadiq et al.*, analizējot audu paraugus no augšstilba kaula, kuri iegūti no trušu mātītēm, kurām osteoporoze tika ierosināta pēc ovariectomijas un ar glikokortikosteroīdu palīdzību. (Sadiq, Alfari & Allasadi, 2016).

Mūsu pētījumā, analizējot audu paraugus 12 nedēļas pēc operācijas, kaula trabekulārais laukums bija samērā līdzīgs visiem osteoporotiskiem dzīvniekiem pēc biomateriāla implantācijas vai *sham* operācijas. Statistiski ticama atšķirība netika novērota starp HA un TCP masas attiecībām (30/70 vai 70/30), Sr klātbūtnes vai tukšās kontroles. 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 osteoporotiskiem 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 saistās ar biomateriāla spēju ierosināt kaulaudu reģenerāciju.

Mūsu pētījumā visos audu paraugos tika novērotas implantētās granulas, starp kurām atradās jaunais kauls, kas vairākas granulas savienoja savā starpā. *CPC* spēj veidot ciešu kontaktu starp biomateriāla granulu un kaulu. Tas notiek, pateicoties hidroksiapatīta līdzībai ar kaulu, kā arī trikalcija fosfāta pastiprinātai osteokonduktivitātei, jo implantu biodegradācija notiek vienlaikus ar kaula remodelāciju un jauna kaula veidošanos (Yu et al., 2015; Chen et al., 2017). Biosaderīgiem implantiem šo procesu iesāk un regulē makrofāgi un gigantsūnas, un tas parasti ilgst pirmās 2 nedēļas pēc implantācijas. Pēc tam, iekaisuma fāzei samazinoties, fibrotiskā kapsula saglabājas vien vietās, kur granulas ir tikai daļējā kontaktā ar kaulu (Barbeck et al., 2015). Mūsu pētījumā netika novērota iekaisuma reakcija biomateriālu zonā. 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

granulu 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 atrasts 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 *Ca* polifosfāta biomateriāla sastāvā spēj palielināt *Col-1α* ekspresiju salīdzinājumā ar tīru biomateriālu. Tomēr šī atradne novērota veselu trušu kaulaudos (Tian et al., 2009). Tas norāda, 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 osteoģenēzi (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 rezorbciju. Pretēju *Il-1* darbības mehānismu apraksta Lange et al., norādot, ka *Il-1* atkarībā no organisma vajadzībām un stāvokļa, spēj stimulēt osteoblastoģenēzi (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, Banfi & Mariotti, 2012). Mūsu atradne daļēji sakrīt ar citu autoru darbiem, kur osteoporotiskas žurkas augšstilba kaulā lielāka OC ekspresija tika konstatēta pēc *Sr* saturoša *Ca* 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 (Tarafer 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 kalvārija 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 rezorbciju (Paiva & Granjero, 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 medītēto kaula rezorbciju nākošā kaula zonā. Pretrunīgi dati uzrādīti Neve et al. pētījumā, kur autori atklāja, ka *Il-1* spēj nomākt *OC* sintēzi (Neve, Corrado & Contatore, 2011). Lai arī osteoblasti *OC* izdala kaula veidošanās procesā, literatūrā ir aprakstīts, ka *OC* veicina arī osteoklastu prekursoru diferenciāciju un osteoklastu medītēto kaula rezorbciju (Patti et al., 2013). To pamato citu autoru darbi, kuros novērota pavājināta osteoklastu darbība un samazināta kaula resorbcijas funkcija zonās, kur nav atrodama *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 operācijas 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* nozīme 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 izdalīšanu, 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 par 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 mijiedarbojoties 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 matricē 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 (*Montalabano 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 neaprašītas korelācijas un rezultāti.

Osteoprotegerīns (OPG) ir visbiežāk pētītais šūnu funkcionālās aktivitātes rādītājs, jo tas spēj nomākt osteoklastoģenēzi un kaula rezorbciju, bloķējot *RANK/RANKL* mehānismu (Tong et al., 2019). Šim faktoram ir ļoti liela nozīme osteoporozes ierosinātās kaula pārmaiņās un tām sekojošā kaula remodelācijā (Jiménez 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 novērots 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 konstatējām 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 rezorbciju, jo vienlaikus ar *OPG* pieaugumu, samazinās *RANKL* produkcija, kas nomāc osteoklastu prekursoru 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, *Thormann 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 rezorbciju 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 osteoklastoģenēzi, 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 osteoblastogēnei 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 vairāk nekā pēc *HA₃₀/TCP₇₀* vai *sham* operācijas. Pētījumā iegūtie dati daļēji sakrīt ar citu autoru darbiem. *Tian et al.* novēroja *BMP-2/4* faktora ekspresijas pieaugumu pēc *Sr* bagātināta *Ca* 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 veseliem kontroles trušiem, tīru biomateriālu vai *sham* operāciju. Tas norāda, 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).

Mums likās ļoti būtiski uzsvērt literatūrā aprakstītās sakarības starp iekaisuma modulēšanu un osteogēnēzi. Proti, kaulu reģenerācijas procesos ļoti nozīmīgas šūnas ir makrofāgi, kuri regulē kaula homeostāzi. Audos pēc biomateriālu implantācijas ir novēroti divu veidu makrofāgi: klasiski aktivētie iekaisuma makrofāgi *M1*, kuri sekretē iekaisuma citokīnus un cīnās ar infekciju, un alternatīvā ceļā aktivēti iekaisuma makrofāgi *M2*, kuri stimulē audu remodelāciju un osteogēnēzi (Brown et al., 2012; Zhao et al., 2017). Vairākos *in vivo* un *in vitro* pētījumos pierādīta *Sr* spēja regulēt makrofāgu ierosināto atbildi un veicināt *BMP-2/4* sekrēciju

(Lee, 2016). *Lu et al.* pierādīja, ka *Sr* bagātināti biomateriāli samazina *M1* aktivitāti un iekaisumu veicinošo citokīni izdali (*Lu et al.*, 2019). Svarīgi minēt, ka *Sr* saturoši biomateriāli, palielinot *M2* makrofāgu aktivitāti, samazina iekaisuma šūnu infiltrāciju, kas savukārt samazina fibrozas kapsulas veidošanos implanta zonā, tādējādi uzlabojot implanta osteointegritāti un funkcionalitāti (*Yuan*, 2017). Lai arī mēs neveicām *M1* un *M2* makrofāgu specifisku analīzi, par to funkcionālo nozīmi daļēji liecina atrastās gigantšūnas ap implantētajām granulām. Līdz ar to var secināt, ka attiecīga lokālā audu imunitāte, kura tiek daļēji regulēta ar biomateriālu palīdzību, var veicināt efektīvāku kaula remodelācijai nepieciešamo augšanas faktoru sintēzi un jaunas kaulvielas veidošanos.

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 rezorbciju. 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 starp 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-HA₇₀/TCP₃₀* uzrādīja statistiski ticami vairāk *MMP-2* pozitīvo kaula šūnu nekā pēc *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* un *HA₃₀/TCP₇₀* granulu implantācijas. Tomēr, salīdzinot ierosināto kaulaudu atbildi starp operēto un neoperēto kāju, audu paraugos pēc *HA₃₀/TCP₇₀*, *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* un *HA₇₀/TCP₃₀* implantācijas, novērojām statistiski ticami vairāk *MMP-2* pozitīvu šūnu. Varētu teikt, ka *MMP-2* klātbūtne ir kaula kvalitātes rādītājs, jo tā ierosina *ECM* komponentu rezorbciju un aizvietošanu ar jaunu kaulvielu.

Literatūrā pieejami pretrunīgi dati par *MMPs* ekspresiju pēc *Sr* saturošu biomateriālu implantācijas. *Xie et al.* pētījumā ar veselīgiem trušiem konstatēja, ka, salīdzinot ar tīru biomateriālu, *Sr* bagātinātas *Ca* 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 novērtēta 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 proteināžu 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.

Lai arī statistiski ticama korelācija starp *MMP-2* un *Col-1α* mūsu pētījumā netika novērota, mūsaprāt, ir būtiski uzsvērt iegūtos rezultātus. Veselos trušos *MMP-2* pozitīvo šūnu daudzums bija lielāks nekā *Col-1α* pozitīvo šūnu daudzums, kas apstiprina proteināžu nozīmi normālos kaula remodelācijas procesos, nodrošinot aktīvu kaula kanāliņu sistēmu informācijas un barība vielu pārvadei starp osteocītiem un osteoblastiem (Alliston, 2014). Un pretēji – osteoporotiskos operētās kājas audu paraugos tika konstatēts ievērojami lielāks *Col-1α* pozitīvo šūnu daudzums. Tas varētu norādīt uz kaula remodelācijas procesu, kurš tiek stabilizēts pēc

sākotnēji ierosinātās osteoporozes, un faktu, ka *ECM* nomaiņa notiek kontrolēti un ar iespējamu pozitīvu bilanci jauna kaula veidošanās procesā, kura izvērtēšanai būtu nepieciešams ilgāks pētījuma novērojuma laiks.

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 ir lielāka osteoporozes gadījumā. *In vitro* pētījumos konstatēta *TIMP-2* spēja regulēt osteoklastu ierosināto kaula rezorbciju (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 et al., 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. Kopumā var teikt, ka *Il-1* šūnu daudzums bija vismazākais no visiem analizētajiem faktoriem. 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 rezorbciju (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 (Fernández, 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* šūnas 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 audu paraugos no operētās un neoperētās kājas pēc *Sr* saturošu biomateriālu implantācijas konstatējām līdzīgu *Il-1* pozitīvo šūnu daudzumu, salīdzinot ar citām audu grupām. Tātad *Sr* klātbūtne nepalielina ne lokālu audu reakciju ap biomateriālu, ne ģeneralizētu iekaisuma atbildi. 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 & Contatore, 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-1α* 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 sadzīšanas 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 rezorbciju 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 pretiekaisuma aktivitāti, un tā ir stabila salīdzinājumā arī ar veseliem 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, Yao & Wise, 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 *TNF- α* , *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. Mūsuprāt, to varētu izskaidrot ar *HA* un *TCP* masas attiecībām. Zināms, ka lielāka *HA* koncentrācijai biomateriāla sastāvā nodrošina lēnāku tā šķīdību un rezorbciju, 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 reģenerācijas 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 (*HA₃₀/TCP₇₀* un *HA₇₀/TCP₃₀*) no operētās un neoperētās kājas audiem un *sham* operācijas. Darbā tika salīdzināti deviņi kaula homeostāzes nodrošināšanai nozīmīgi audu faktori – *OC*, *Col-1 α* , *OPG*, *BMP-2/4*, *NF κ B-105*, *MMP-2*, *TIMP-2*, *Il-1* un *Il-10*. Daļa no faktoriem, pēc pašreiz pieejamās literatūras datiem, tika analizēti pirmo reizi osteoporotisku trušu kaulaudos pēc *Sr* saturošu biomateriālu lietošanas. 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 starp 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 veselīgiem trušiem. Vienīgi *Sr*-

*HA*₇₀/*TCP*₃₀ ierosināja lielāku *OC* un *NFκB-105* ekspresiju, bet *HA*₇₀/*TCP*₃₀ lielāku *Il-10* atradni, kamēr *OPG* un *MMP-2* daudzums ir praktiski vienāds. Līdzīgi *sham* operācija spēj ierosināt lielāku *Col-1α*, *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-HA*₇₀/*TCP*₃₀ un *HA*₇₀/*TCP*₃₀ biomateriālu ierosināto audu atbildi raksturo palielināts *Col-1α*, *NFκB-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, imūnmodulējošu darbību, osteoblastoģenēzes un mineralizācijas procesus ar tiem sekojošu šūnu aktivitātes palielināšanu, bet kavēt osteoklastoģenēzi. Jāuzsver arī *HA* un *TCP* masas attiecības nozīme osteoporotiska kaula reģenerācijas procesos.

Analizējot audu paraugus starp 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 *HA*₇₀/*TCP*₃₀ 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-HA*₇₀/*TCP*₃₀ 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 *Sr* drošu pielietojamību biomateriālu sastāvā.
3. Statistiski nozīmīga *Col-1α* 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-1α* šūnu klātbūtne kaulos pēc biomateriālu implantācijas un *sham* operācijas liecina par operācijas traumas un biomateriāla 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, liecinot par *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 osteoblastoģenēzes procesu veicināšanā.
6. Liels *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* granulū implantācijas, 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 koncentrācijas hidroksilapatīta 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 norītošajai osteoģenēzes stimulēšanai.
8. Līdzīgā *MMP-2* atradne kontroles un osteoporotisko trušu kaulaudos liecina par biomateriālu un *sham* operācijas ietekmi ekstracelulārās matricē 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 matricē 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 matricē 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-1α*, *OC*, *BMP-2/4*, *NFκB-105*, *OPG*, *MMP-2*, *TIMP-2*, *Il-1* un *Il-10* šūnu relatīvā daudzuma palielināšanās. Kopumā šo faktoru izdala norāda uz uzlabotiem kaula mineralizācijas, ekstracelulārās matricē remodelācijas un šūnu aktivitātes procesiem, salīdzinot ar *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* audu paraugiem.

Izmantotās literatūras saraksts

1. Abou-Khalil, R. and Colnot, C. 2014. Cellular and molecular bases of skeletal regeneration: What can we learn from genetic mouse models? *Bone*. 64, 211–221.
2. Abu-Amer, Y. 2013. NF-κB signaling and bone resorption. *Osteoporosis International*. 24 (9), 2377–2386.
3. Alford, A. I., Kozloff, K. M., and Hankenson, K. D. 2015. Extracellular matrix networks in bone remodeling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 65, 20–31.
4. Alliston T. 2014. Biologic regulation of bone quality. *Current Osteoporosis Reports*. 12 (3), 366–375.
5. 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.
6. Anselme, K. 2000. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 21(7), 667–681.
7. Atkins, G. J., Welldon, K. J., Halbout, P. and Findlay, D. M. 2009. Strontium ranelate treatment of human primary osteoblasts promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response. *Osteoporosis International*. 20 (4), 653–664.
8. Bahney, C.S., Zondervan, R.L., Allison, P., Theologis, A. et al. 2019. Cellular biology of fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research*. 37(1), 35–50.
9. 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.
10. 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.
11. Bakker, A. D., Zandieh-Doulabi, B. and Klein-Nulend, J. 2013. Strontium ranelate affects signaling from mechanically-stimulated osteocytes towards osteoclasts and osteoblasts. *Bone*. 53 (1), 112–119.
12. Bala, Y., Farlay, D. and Boivin, G. 2013. Bone mineralization: from tissue to crystal in normal and pathological contexts. *Osteoporosis International*. 24(8), 2153–2166.
13. 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.
14. Barbeck, M., Dard, M., Kokkinopoulou, M., Markl, J. et al. 2015. Small-sized granules of biphasic bone substitutes support fast implant bed vascularization. *Biomaterials*. 5, e1056943.
15. 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.
16. Benslimane-Ahmim, Z., Poirier, F., Delomenie, C., Lokajczyk, A. et al. 2013. Mechanistic study of the proangiogenic effect of osteoprotegerin. *Angiogenesis*. 16 (3), 575–593.
17. Bernardo, M. M., and Fridman, R. 2003. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. *The Biochemical Journal*. 374 (Pt 3), 739–745.
18. 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.
19. Boanini, E., Torricelli, P., Fini, M., and Bigi, A. 2011. Osteopenic bone cell response to strontium-substituted hydroxyapatite. *Journal of materials science. Materials in Medicine*. 22 (9), 2079–2088.

20. Bonizzi, G. and Karin, M. 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology*. 25 (6), 280–288.
21. 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.
22. Bose, S., Fielding, G., Tarafder, S. and Bandyopadhyay, A. 2013. Understanding of dopant – induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics. *Trends in Biotechnology*. 31 (10), 594–605.
23. 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.
24. Breart, G., Cooper, C., Meyer, O., Speirs, C. et al. 2010. Osteoporosis and venous thromboembolism: a retrospective cohort study in the UK General Practice Research Database. *Osteoporosis International*. 21 (7), 1181–1187.
25. Brennan, T. C., Rybchyn, M. S., Green, W., Atwa, S. et al. 2009. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. *British Journal of Pharmacology*. 157 (7), 1291–1300.
26. Brown, B. N., Londono, R., Tottey, S., Zhang, L. et al. 2012. Macrophage phenotype as a predictor of constructive remodeling following the implantation of biologically derived surgical mesh materials. *Acta Biomaterialia*. 8 (3), 978–987.
27. Byambaa, B., Annabi, N., Yue, K., Trujillo-de Santiago, G. et al. 2017. Bioprinted Osteogenic and Vasculogenic Patterns for Engineering 3D Bone Tissue. *Advanced Healthcare Materials*. 6 (16), 10.1002/adhm.201700015.
28. Campana, V., Milano, G., Pagano, E., Barba, M. et al. 2014. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. 25 (10), 2445–2461.
29. 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.
30. Cassidy, J. W. 2014. Nanotechnology in the Regeneration of Complex Tissues. *Bone and Tissue Regeneration Insights*. 5, 25–35.
31. Caverzasio, J., and Thouverey, C. 2011. Activation of FGF receptors is a new mechanism by which strontium ranelate induces osteoblastic cell growth. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 27 (3-4), 243–250.
32. Chaair, H., Labjar, H. and Britel, O. 2017. Synthesis of β -tricalcium phosphate. *Morphologie*. 101 (334), 120–124.
33. Chandel, N. S., Trzyna, W. C., McClintock, D. S. and Schumacker, P. T. 2000. Role of oxidants in NF-kappaB activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *Journal of Immunology*. 165 (2), 1013–1021.
34. 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.
35. Chen, H. Y., Chen, W. C., Hsu, C. M., Tsai, F. J. et al. 2005. Tumor necrosis factor alpha, CYP 17, urokinase, and interleukin 10 gene polymorphisms in postmenopausal women: correlation to bone mineral density and susceptibility to osteoporosis. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology*. 122 (1), 73–78.
36. Chen, Y. W., Shi, G. Q., Ding, Y. L., Yu, X. X. et al. 2008. In vitro study on the influence of strontium-doped calcium polyphosphate on the angiogenesis-related behaviors of HUVECs. *Journal of Material Science Materials in Medicine*. 19 (7), 2655–2662.

37. Chen, Y., Wang, J., Zhu, X. D., Tang, Z. R. et al. 2015. Enhanced effect of β -tricalcium phosphate phase on neovascularization of porous calcium phosphate ceramics: in vitro and in vivo evidence. *Acta Biomaterialia*. 11, 435–448.
38. Chen, Y.J., Pao, J.I., Chen, C.S., Chen, Y.C. et al. 2017. Evaluation of New Biphasic Calcium Phosphate Bone Substitute: Rabbit Femur Defect Model and Preliminary Clinical Results. *Journal of Medical and Biological Engineering*. 37 (1), 85–93.
39. Cianferotti, L., D'Asta, F. and Brandi, M. L. 2013. A review on strontium ranelate long-term antifracture efficacy in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*. 5 (3): 127–139.
40. Compston, J. E. 2001. Sex steroids and bone. *Physiological reviews*. 81 (1), 419–447.
41. Cui, F. Z., Li, Y. and Ge, J. 2007. Self-assembly of mineralized collagen composites. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 57(1-6): 1–27.
42. Dahl, S. G., Allain, P., Marie, P. J., Muraus, Y. et al. 2001. Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone*. 28 (4), 446–453.
43. 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.
44. Deng, Y., Liu, M., Chen, X., Wang, M. et al. 2018. Enhanced osteoinductivity of porous biphasic calcium phosphate ceramic beads with high content of strontium incorporated calcium deficient hydroxyapatite. *Journal of Materials Chemistry B*. 6, 6572–6584.
45. Donneau, A. F. and Reginster, J. Y. 2014. Cardiovascular safety of strontium ranelate: real-life assessment in clinical practice. *Osteoporosis International*. 25 (2), 397–408.
46. Dorozhkin S. V. 2012b. Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates. *Acta Biomaterialia*. 8(3), 963–977.
47. Dorozhkin, S. V. 2010. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*. 31(7), 1465–1485.
48. Dorozhkin, S. V. 2012. Amorphous Calcium Orthophosphates: Nature, Chemistry and Biomedical Applications. *International Journal of Materials and Chemistry*. 2, 19–46.
49. Dorozhkin, S. V. 2015. Calcium orthophosphate deposits: Preparation, properties and biomedical applications. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*. 55, 272–326.
50. Dresner-Pollak, R., Gelb, N., Rachmilewitz, D., Karmeli, F. et al. 2004. Interleukin 10-deficient mice develop osteopenia, decreased bone formation, and mechanical fragility of long bones. *Gastroenterology*. 127 (3), 792–801.
51. Eggli, P. S., Müller, W., and Schenk, R. K. 1988. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 232, 127–138.
52. Elgali, I., Turri, A., Xia, W., Norlindh, B. et al. 2016. Guided bone regeneration using resorbable membrane and different bone substitutes: Early histological and molecular events. *Acta Biomaterialia*. 29, 409–423.
53. Eliseev, R. A., Schwarz, E. M., Zuscik, M. J., O'Keefe, R. J. et al. 2006. Smad7 mediates inhibition of Saos2 osteosarcoma cell differentiation by NF κ B. *Experimental Cell Research*. 312 (1), 40–50.
54. Evans, K. E. and Fox, S. W. 2007. Interleukin-10 inhibits osteoclastogenesis by reducing NFATc1 expression and preventing its translocation to the nucleus. *BMC Cell Biology*. 8, 4
55. Fernandes, G., and Yang, S. 2016. Application of platelet-rich plasma with stem cells in bone and periodontal tissue engineering. *Bone Research*, 4, 16036.

56. 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.
57. Ferreira, A.M., Gentile, P., Chiono, V. and Ciardelli, G. 2012. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*. 8 (9), 3191–3200.
58. Fillingham, Y., and Jacobs, J. 2016. Bone grafts and their substitutes. *The Bone & Joint Journal*. 98-B (1 Suppl A), 6–9.
59. 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.
60. Fromigué, O., Haÿ, E., Barbara, A. and Marie, P. J. 2010. Essential role of nuclear factor of activated T cells (NFAT)- mediated Wnt signaling in osteoblast differentiation induced by strontium ranelate. *The Journal of Biological Chemistry*. 285 (33), 25251–25258.
61. Fromigué, O., Haÿ, E., Barbara, A. and Petrel, C. 2009. Calcium sensing receptor- dependent and receptor-independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 13 (8B), 2189–2199.
62. Ghomi, H., Jaberzadeh, M., and Fathi, M. 2011. Novel fabrication of forsterite scaffold with improved mechanical properties. *Journal of Alloys and Compounds*. 509.
63. Gorski, J.P. 1998. Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of non-collagenous matrix proteins in lamellar vs. woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms. *Critical Reviews in Oral biology and Medicine*. 9 (2), 201–223.
64. 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 Craniomaxillofac Surgery*. 43, 167–174.
65. Gu, Z., Xie, H., Li, L., Zhang, X. et al. 2013. Application of strontium- doped calcium polyphosphate scaffold on angiogenesis for bone tissue engineering. *Journal of Material Sciencs Materials in Medicine*. 24 (5), 1251–1260.
66. Gu, Z., Zhang, X., Li, L., Wang, Q. et al. 2013. Acceleration of segmental bone regeneration in a rabbit model by strontium-doped calcium polyphosphate scaffold through stimulating VEGF and bFGF secretion from osteoblasts. *Materials Science and Engineering. C, Materials for Biological Applications*. 33(1): 274-281.
67. Guan, R. G., Cipriano, A. F., Zhao, Z. Y., Lock, J. et al. 2013. Development and evaluation of a magnesium-zinc-strontium alloy for biomedical applications-- alloy processing, microstructure, mechanical properties, and biodegradation. *Materials Science and Engineering. C, Materials for Biological Applications*. 33 (7), 3661–3669.
68. Guo, Y., Tran, R. T, Xie, D., Wang, Y. et al. 2015. Citrate-based biphasic scaffolds for the repair of large segmental bone defects. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. 103 (2), 772–781.
69. Han, B., Wang, X., Liu, J., Liang, F. et al. 2014. Influence of calcium hydroxide-loaded microcapsules on osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand activity. *Journal of Endodontics*. 40 (12), 1977–1982.
70. Hao, J., Acharya, A., Chen, K., Chou, J. et al. 2015. Novel bioresorbable strontium hydroxyapatite membrane for guided bone regeneration. *Clinical Oral Implants Research*. 26 (1), 1–7.
71. Hao, J., Chou, J., Kuroda, S., Otsuka, M. et al. 2015. Strontium hydroxyapatite in situ gel-forming system – a new approach for minimally invasive bone augmentation. *Clinical Oral Implants Research*. 26 (5), 581–585.

72. Helder, M. N., van Esterik, F. A. S., Kwehandjaja, M. D., Ten Bruggenkate, C. M. et al. 2018. Evaluation of a new biphasic calcium phosphate for maxillary sinus floor elevation: Micro-CT and histomorphometrical analyses. *Clinical Oral Implants Research*. 29 (5), 488–498.
73. Hernlund, E., Svedbom, A., Ivergård, M., Compston, J. et al. 2013. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Archives of Osteoporosis*. 8(1-2), 136.
74. Hoang, Q. Q., Sicheri, F., Howard, A. J., and Yang, D. S. 2003. Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature*. 425 (6961), 977–980.
75. Hofbauer, L. C., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Spelsberg, T. C. et al. 1999. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone*. 25 (3), 255–229
76. 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.
77. Huang, R. L., Liu, K. and Li, Q. 2016. Bone regeneration following the in vivo bioreactor principle: is in vitro manipulation of exogenous elements still needed? *Regenerative Medicine*. 11 (5), 475–481.
78. Iolascon, G., Frizzi, L., Di Pietro, G., Capaldo, A. et al. 2014. Bone quality and bone strength: benefits of the bone-forming approach. *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*. 11(1), 20–24.
79. Iotsova, V., Caamaño, J., Loy, J., Yang, Y. et al. 1997. Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2. *Nature Medicine*. 3 (11), 1285–1289.
80. Isaac, J., Nohra, J., Lao, J., Jallot, E. et al. 2011. Effects of strontium-doped bioactive glass on the differentiation of cultured osteogenic cells. *European Cells & Materials*. 21, 130–143.
81. 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.
82. Jensen, S. S., Bornstein, M. M., Dard, M., Bosshardt, D. D. et al. 2009. Comparative study of biphasic calcium phosphates with different HA/TCP ratios in mandibular bone defects. A long-term histomorphometric study in minipigs. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*. 90 (1), 171–181.
83. 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.
84. 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.
85. 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.
86. 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.
87. 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.

88. Kasten, P., Vogel, J., Geiger, F., Niemeyer, P. et al. 2008. The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials*. 29 (29), 3983–3992.
89. Kato, S., Kawabata, N., Suzuki, N., Ohmura, M. et al. 2009. Bone morphogenetic protein-2 induces the differentiation of a mesenchymal progenitor cell line, ROB-C26, into mature osteoblasts and adipocytes, *Life Sciences*. 84 (9-10), 302–310.
90. 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.
91. Killington, K., Mafi, R., Mafi, P., Khan, W. S. 2018. A Systematic Review of Clinical Studies Investigating Mesenchymal Stem Cells for Fracture Non-Union and Bone Defects. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 13 (4), 284–291.
92. Kim, J. N., Lee, J. Y., Shin, K. J., Gil, Y. C. et al. 2015. Haversian system of compact bone and comparison between endosteal and periosteal sides using three-dimensional reconstruction in rat. *Anatomy & Cell Biology*. 48(4), 258–261.
93. 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.
94. Kimura, K., Cheng, X. W., Nakamura, K., Inoue, A. et al. 2010. Matrix metalloproteinase-2 regulates the expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 37 (11), 1096–1101.
95. Krane, S. M. and Inada, M. 2008. Matrix metalloproteinases and bone. *Bone*. 43 (1), 7–18
96. Kuang, G. M., Yau, W. P., Lu, W.W. and Chiu, K. Y. 2014. Local application of strontium in a calcium phosphate cement system accelerates healing of soft tissue tendon grafts in anterior cruciate ligament reconstruction: experiment using a rabbit model. *The American Journal of Sports Medicine*. 42 (12), 2996–3002.
97. Kuipers, A.L., Gundberg, C., Kammerer, C.M., Dressen, A.S. et al. 2012. Genetic analysis of serum osteocalcin and bone mineral in multigenerational Afro-Caribbean families. *Osteoporosis International*. 23 (5), 1521–1531.
98. 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.
99. 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.
100. Lecomte, A., Gautier, H., Bouler, J. M., Gouyette, A. et al. 2008. Biphasic calcium phosphate: a comparative study of interconnected porosity in two ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*. 84(1), 1–6.
101. Lee, C. H., Kim, Y. J., Jang, J. H., and Park, J. W. 2016. Modulating macrophage polarization with divalent cations in nanostructured titanium implant surfaces. *Nanotechnology*. 27 (8), 085101.
102. Lee, E. J., Kasper, F. K., and Mikos, A. G. 2014. Biomaterials for tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*. 42(2), 323–337.
103. 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.
104. LeGeros, R. Z. 1993. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clinical Materials*. 14(1), 65–88.

105. 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.
106. Li, X. and Cao, X. 2006. BMP signaling and skeletogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1068, 26–40.
107. Li, Y., Li, A., Strait, K., Zhang, H. et al. 2007. Endogenous TNFalpha lowers maximum peak bone mass and inhibits osteoblastic Smad activation through NF-kappaB. *Journal of Bone and Mineral Research*. 22 (5), 646–655.
108. 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.
109. 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.
110. 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.
111. 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.
112. 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.
113. 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.
114. Lobo, S. E., and Arinzech, T. L. 2010. Biphasic Calcium Phosphate Ceramics for Bone Regeneration and Tissue Engineering Applications. *Materials*. 3(2), 815–826.
115. Löffek, S., Schilling, O. and Franzke, C. W. 2011. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *European Respiratory Journal*. 38(1), 191–208.
116. Lu, X., Zhang, W., Liu, Z., Ma, S. et al. 2019. Application of a Strontium-Loaded, Phase-Transited Lysozyme Coating to a Titanium Surface to Enhance Osteogenesis and Osteoimmunomodulation. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 25, 2658–2671.
117. Luo, X., Barbieri, D., Duan, R., Yuan, H. et al. 2015. Strontium-containing apatite/polylactide composites enhance bone formation in osteopenic rabbits. *Acta Biomaterialia*. 26, 331–337.
118. Malhotra, A., Habibovic, P. 2016. Calcium Phosphates and Angiogenesis: Implications and Advances for Bone Regeneration. *Trends in Biotechnology*. 34 (12), 983–992.
119. Marie, P. J. 2005. Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation. *Osteoporosis International*. 16, 7–10.
120. McGovern, J.A., Griffin, M. and Hutmacher, D. W. 2018. Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. *Disease Models and Mechanisms*. 11 (4), dmm033084.
121. Meredith, A. 2015. BSAVA Small Animal Formulary 9th Edition, Part B: Exotic Pets. 9th ed. Edinburgh, United Kingdom: British Small Animal Veterinary Association.
122. Meunier, P. J, Roux, C., Seeman, E., Ortolani, S. et al. 2004. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *The New England Journal of Medicine*. 350(5), 459–468.
123. Milliken, L. A., Wilhelmy, J., Martin, C. J., Finkenthal, N. et al. 2006. Depressive symptoms and changes in body weight exert independent and site-specific effects on bone in

- postmenopausal women exercising for 1 year. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*. 61 (5), 488–494.
124. Mohan, B. G., Shenoy, S. J., Babu, S.S., Varma, H. K. et al. 2013. Strontium calcium phosphate for the repair of leporine (*Oryctolagus cuniculus*) ulna segmental defect. *Journal of Biomedical Materials research. Part A*. 101 (1), 261–271.
 125. 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.
 126. Mott, J. D. and Werb, Z. 2004. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Current Opinion in Cell Biology*. 16 (5), 558–564.
 127. Mukherjee, A. and Rotwein, P. 2009. Akt promotes BMP2-mediated osteoblast differentiation and bone development. *Journal of Cell Science*. 122 (Pt 5), 716–726.
 128. Murugan, R., and Ramakrishna, S. 2004. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. *Biomaterials*. 25(17), 3829–3835.
 129. 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.
 130. Neve, A., Corrado, A. and Cantatore, F. P. 2011. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell and Tissue Research*. 343 (2), 289–302.
 131. 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.
 132. 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
 133. Nielsen, S. P. 2017. Review – the biological role of strontium. *Bone*. 35 (3), 583–588.
 134. 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.
 135. Novosel, E. C., Kleinhans, C. and Kluger, P. J. 2011. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 63(4-5), 300–311.
 136. 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.
 137. Ottani, V., Raspanti, M. and Ruggeri, A. 2001. Collagen structure and functional implications. *Micron*. 32 (3), 251–260
 138. 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.
 139. Palmer, L. C., Newcomb, C. J., Kaltz, S. R., Spoerke, E. D. et al. 2008. Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. *Chemical Reviews*. 108 (11), 4754–4783.
 140. Panzavolta, S., Torricelli, P., Sturba, L., Bracci, B. et al. 2008. Setting properties and in vitro bioactivity of strontium-enriched gelatin-calcium phosphate bone cements. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 84 (4), 965–972.
 141. Park, J. W., Kang, D. G. and Hanawa, T. 2016. New bone formation induced by surface strontium-modified ceramic bone graft substitute. *Oral Diseases*. 22 (1), 53–61.

142. Park-Min, K. H., Ji, J. D., Antoniv, T., Reid, A. C. et al. 2009. IL-10 suppresses calcium-mediated costimulation of receptor activator NF-kappa B signaling during human osteoclast differentiation by inhibiting TREM-2 expression. *Journal of Immunology*. 183 (4), 2444–2455.
143. 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.
144. Patti, A., Gennari, L., Merlotti, D., Dotta, F. et al. 2013. Endocrine Actions of Osteocalcin. *International Journal of Endocrinology*, 2013, 846480.
145. Pelletier, J. P, Roubille, C., Raynauld, J. P., Abram, F. et al. 2015. Diseasemodifying effect of strontium ranelate in a subset of patients from the Phase III knee osteoarthritis study SEKOIA using quantitative MRI: reduction in bone marrow lesions protects against cartilage loss. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 74 (2), 422–429.
146. Pelletier, J. P., Kapoor, M., Fahmi, H., Lajeunesse, D. et al. 2013. Strontium ranelate reduces the progression of experimental dog osteoarthritis by inhibiting the expression of key proteases in cartilage and of IL-1 β in the synovium. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2013, 72 (2), 250–257.
147. Peng, S., Liu, X. S., Huang, S., Li, Z. et al. 2011. The cross-talk between osteoclasts and osteoblasts in response to strontium treatment: involvement of osteoprotegerin. *Bone*. 49, (6), 1290–1298.
148. Peng, S., Zhou, G., Luk, K. D., Cheung, K. M. et al. 2009. Strontium promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through the Ras/MAPK signaling pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 23 (1-3), 165–174.
149. Perez, J. R., Kouroupis, D., Li, D. J., Best, T. M. et al 2018. Tissue Engineering and Cell-Based Therapies for Fractures and Bone Defects. *Frontiers of Bioengineering and Biotechnology*. 6, 105.
150. 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.
151. Prabha, R. D., Nair, B. P., Ditzel, N., Kjems, J. et al. 2019. Strontium functionalized scaffold for bone tissue engineering. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*. 94, 509–515.
152. 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.
153. Qiu, K., Zhao, X. J., Wan, C. X., Zhao, C. S. et al. 2006. Effect of strontium ions on the growth of ROS17/2.8 cells on porous calcium polyphosphate scaffolds. *Biomaterials*. 27 (8), 1277–1286.
154. Querido, W., Farina, M and Anselme, K. 2015. Strontium ranelate improves the interaction of osteoblastic cells with titanium substrates: Increase in cell proliferation, differentiation and matrix mineralization. *Biomatter*. 5 (1), e1027847.
155. Raisz, L. G. 2005. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *The Journal of Clinical Investigations*. 115 (12), 3318–3325.
156. Ray, S., Thormann, U., Sommer, U., Khassawna, T. E. et al. 2016. Effects of macroporous, strontium loaded xerogel-scaffolds on new bone formation in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. *Injury*. 47 (Suppl 1), 52–61.
157. Rayet, B. and G  linas, C. 1999. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*. 18 (49), 6938–6947.
158. Reginster, J. Y, Brandi, M. L, Cannata-And  a, J., Cooper, C. et al. 2015. The position of strontium ranelate in today’s management of osteoporosis. *Osteoporosis International*. 26 (6), 1667–1671.

159. Reginster, J. Y., Badurski, J., Bellamy, N., Bensen, W. et al. 2013. Efficacy and safety of strontium ranelate in the treatment of knee osteoarthritis: results of a double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 72 (2), 179–186.
160. Rizzoli, R. and Reginster, J. Y. 2011. Adverse drug reactions to osteoporosis treatments. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 4 (5), 593–604.
161. 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.
162. Römer, P., Desaga, B., Proff, P., Faltermeier, A. et al. 2012. Strontium promotes cell proliferation and suppresses IL-6 expression in human PDL cells. *Annals of Anatomy*. 194 (2), 208–211.
163. Rouwkema, J., Rivron, N. C., and van Blitterswijk, C. A. 2008. Vascularization in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*. 26 (8), 434–441.
164. Rucci N. 2008. Molecular biology of bone remodeling. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*. 5 (1), 49 – 56.
165. Rybchyn, M. S., Slater, M., Conigrave, A. D. and Mason, R. S. 2011. An Akt-dependent increase in canonical Wnt signaling and a decrease in sclerostin protein levels are involved in strontium ranelate-induced osteogenic effects in human osteoblasts. *The Journal of Biological Chemistry*. 286 (27), 23771–23779.
166. Sadiq, D., Alfaris, 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.
167. 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.
168. Saidak, Z. and Marie, P. J. 2012. Strontium signaling: Molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis. *Pharmacology & Therapeutics*. 136 (2), 216–226
169. Sánchez-Duffhues, G., Hiepen, C., Knaus, P. and Ten Dijke, P. 2015. Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. *Bone*. 80, 43–59.
170. Sapir-Koren, R. and Livshits, G. 2014. Bone mineralization is regulated by signaling cross talk between molecular factors of local and systemic origin: the role of fibroblast growth factor 23. *Biofactors*. 40(6), 555–568.
171. Scheidereit, C. 2006. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene*. 25 (51), 6685–6705.
172. Schmidt-Bleek, K., Willie, B. M., Schwabe, P., Seemann, P. et al. 2016. BMPs in bone regeneration: Less is more effective, a paradigm-shift. *Cytokine Growth Factor Rev*. 27, 141–148.
173. 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.
174. Shepherd, J. H., Shepherd, D.V. and Best, S. M. 2012. Substituted hydroxyapatites for bone repair. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. 23 (10), 2335–2347,
175. Shimokawa Ki, K., Katayama, M., Matsuda, Y., Takahashi, H. et al. 2002. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities in human seminal plasma. *Molecular Human Reproduction*. 8 (1), 32–36.
176. 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.

177. Singh, S., Kumar, D., and Lal, A. K. 2015. Serum Osteocalcin as a Diagnostic Biomarker for Primary Osteoporosis in Women. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*. 9 (8), RC04–RC7.
178. Skoumal, M., Haberhauer, G., Kolarz, G., Hawa, G. et al. 2005. Serum cathepsin K levels of patients with longstanding rheumatoid arthritis: correlation with radiological destruction. *Arthritis Research and Therapy*. 7 (1), R65–R70.
179. 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.
180. 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.
181. 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.
182. Tang, S. Y., Herber, R. P., Ho, S. P. and Alliston, T. 2012. Matrix metalloproteinase-13 is required for osteocytic perilacunar remodeling and maintains bone fracture resistance. *Journal of bone and mineral research*. 27 (9), 1936–1950.
183. 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.
184. 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.
185. 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.
186. Thuault, A., Savary, E., Hornez, J. C., Moreau, G. et al. 2014. Improvement of the hydroxyapatite mechanical properties by direct microwave sintering in single mode cavity. *Journal of the European Ceramic Society*. 34, 10.1016/j.jeurceramsoc.2013.12.035.
187. 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.
188. 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.
189. Tomoaia, G. and Pasca, R. D. 2015. On the Collagen Mineralization. A Review. *Clujul Medical*. 88, (1), 15–22.
190. 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.
191. Ueki, Y., Tiziani, V., Santanna, C., Fukai, N. et al. 2001. Mutations in the gene encoding c-Abl-binding protein SH3BP2 cause cherubism. *Nature Genetics*. 28 (2), 125–126.
192. Unal, S., Ekren, N., Sengil, A. Z., Oktar, F. N. et al. 2018. Synthesis, characterization, and biological properties of composites of hydroxyapatite and hexagonal boron nitride. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*. 106 (6), 2384–2392.
193. 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.

194. Verberckmoes, S. C., Debroe, M. E. 2003. Dose dependent effect of strontium on osteoblast function and mineralization. *Kidney International*. 64 (2), 534–543.
195. Viguier-Carrin, S., Garnero, P. and Delmas, P. D. 2006. The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis International*. 17 (3): 319–336.
196. Walsh, M.C. and Choi, Y. 2003. Biology of the TRANCE axis. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 14 (3-4), 251–263.
197. Walsh, M.C. and Choi, Y. 2014. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Frontiers in Immunology*. 5, 511.
198. Wancket, L. M. 2015. Animal Models for Evaluation of Bone Implants and Devices: Comparative Bone Structure and Common Model Uses. *Veterinary Pathology*. 52, 842–850.
199. Wanderman, N. R., Mallet, C., Giambini, H., Bao, N. et al. 2018. An Ovariectomy-Induced Rabbit Osteoporotic Model: A New Perspective. *Asian Spine Journal*. 12 (1), 12–17.
200. Wang, W. and Yeung, K. 2017. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*. 2 (4), 224–247.
201. Wang, X., Mabrey, J. D. and Agrawal, C. M. 1998. An interspecies comparison of bone fracture properties. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 8, 1–9.
202. Winkler, T., Sass, F. A., Duda, G. N. and Schmidt-Bleek, K. 2018. A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge. *Bone & Joint Research*. 7 (3), 232–243.
203. Wolf, G. 1996. Function of the bone protein osteocalcin: definitive evidence. *Nutrition Reviews*. 54 (10), 332–333.
204. 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.
205. Wu, C.C., Kuo, C.L., Fan, F.Y. and Yang, K.C. 2015. Strontium-impregnated bioabsorbable composite for osteoporotic fracture fixation. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. 103(10), 3355–3363.
206. 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.
207. 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.
208. 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.
209. Xu, D. F., Bi, F. G., Ma, C. Y., Wen, Z. F. et al. 2017. A systematic review of undisplaced femoral neck fracture treatments for patients over 65 years of age, with a focus on union rates and avascular necrosis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 12 (1), 28.
210. Yamaguchi, M. and Weitzmann, M. N. 2012. The intact strontium ranelate complex stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis by antagonizing NF-κB activation. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 359 (1-2), 399–407.
211. Yang, C., Unursaikhan, O., Lee, J. S., gu, U. W. et al. 2014. Osteoconductivity and biodegradation of synthetic bone substitutes with different tricalcium phosphate contents in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*. 102 (1), 80–88.
212. Yang, F., Yang, D., Tu, J., Zheng, Q. et al. 2011. Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating Wnt/catenin signaling. *Stem Cells*. 29 (6), 981–991.

213. 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.
214. Yu, X., Tang, X., Gohil, S. V., and Laurencin, C. T. 2015. Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. *Advanced Healthcare Materials*. 4 (9), 1268–1285.
215. 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.
216. Zhang, J., Liu, W., Schnitzler, V., Tancr t, F. et al. 2014. Calcium phosphate cements for bone substitution: chemistry, handling and mechanical properties. *Acta Biomaterialia*. 10(3), 1035–1049.
217. 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.
218. 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.
219. Zhao, X. Y., Zhu, Y. J., Qi, C., Chen, F. et al. 2013. Hierarchical hollow hydroxyapatite microspheres: microwave-assisted rapid synthesis by using pyridoxal-5'-phosphate as a phosphorus source and application in drug delivery. *Chemistry, an Asian Journal*. 8 (6), 1313–1320.
220. Zhao, Y. L., Tian, P. X., Han, F., Zheng, J. et al. 2017. Comparison of the characteristics of macrophages derived from murine spleen, peritoneal cavity, and bone marrow. *Journal of Zhejiang University. Science. B*. 18 (12), 1055–1063.
221. Zhu, H., Guo, D., Qi, W., and Xu, K. 2017. Development of Sr-incorporated biphasic calcium phosphate bone cement. *Biomedical Materials (Bristol, England)*. 12 (1), 015016.
222. 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- 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, Melnkalne, 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, 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 ievadišanu 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 Prof. *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 maniem draugiem, kuri spēja veldzēt darba nogurumu un uzlādēt jaunus spēkus.

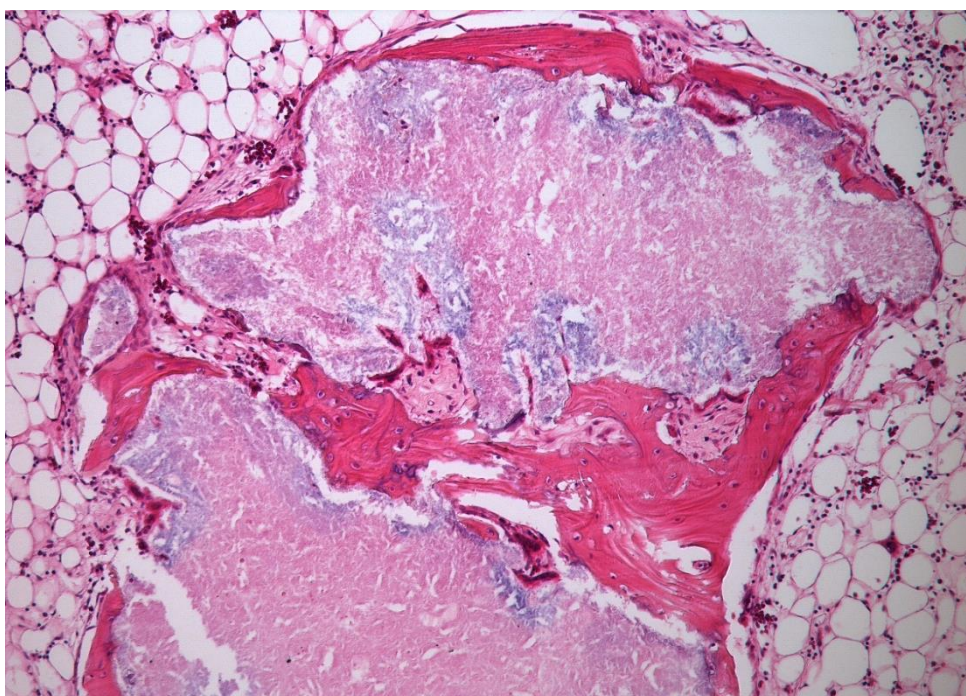
Vislielākais paldies sievai **Elīnai** un dēlam **Miķelim** par atbalstu, pacietību un sapratni. Sīrsnīgs paldies maniem vecākiem **Inārai** un **Arnim**, māsai **Zanei**, krustmātei **Venitai** un vecmammām **Venerandai** un **Lidijai** par neatsveramo atbalstu, ticību un motivāciju.

Pielikumi

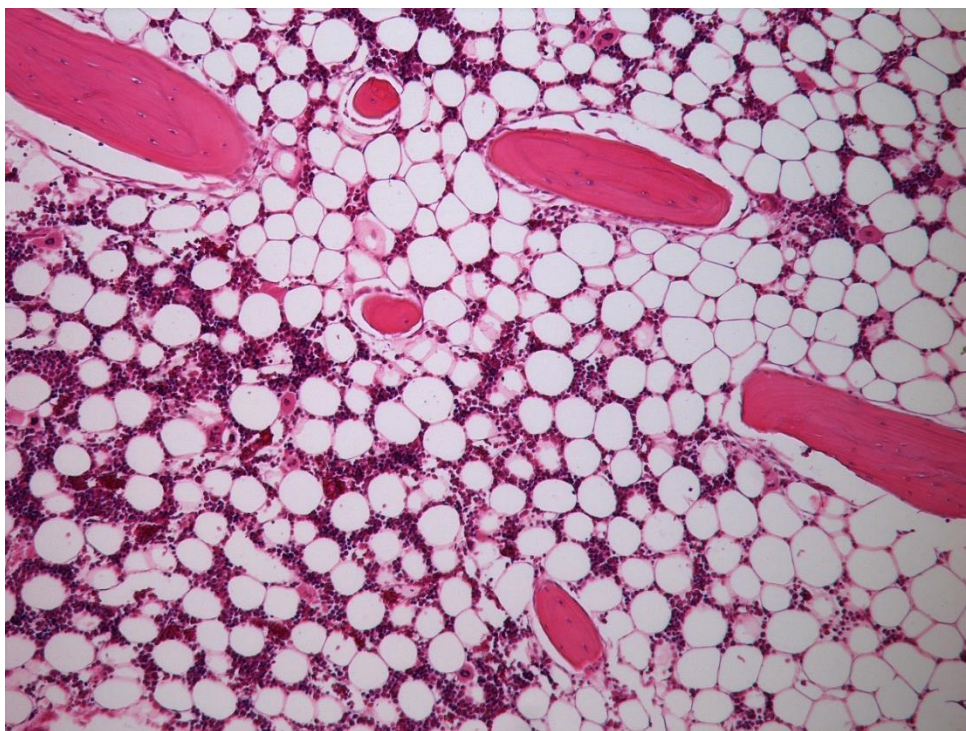
Mikrofotogrāfijas



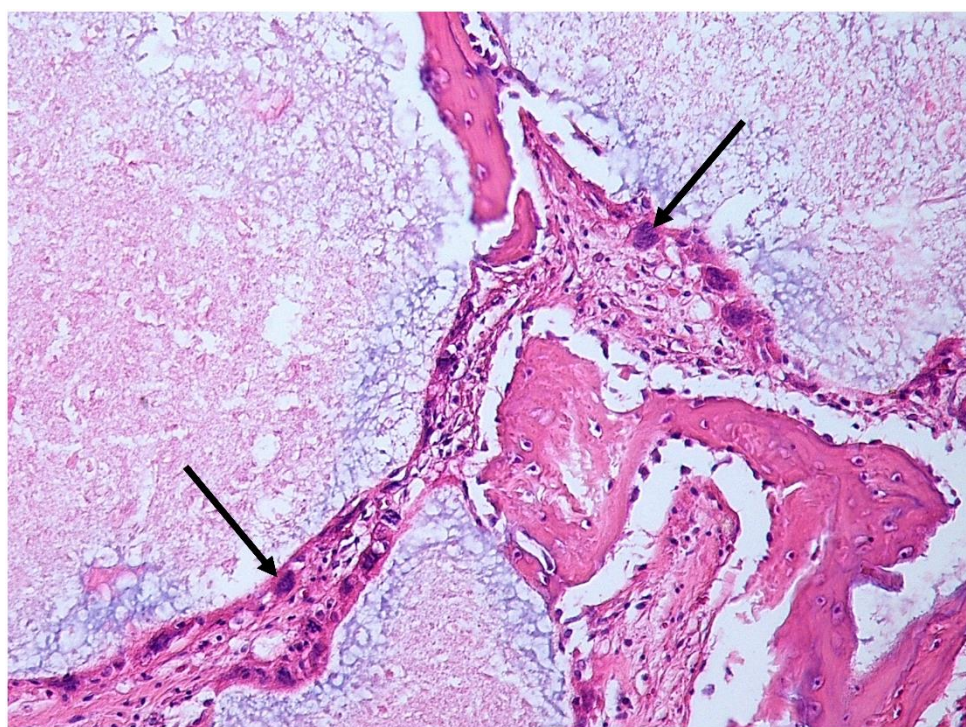
1. mikrofotogrāfija. Kontroles truša kauls ar praktiski neizmainītu kaula kompakto un poraino kaulvielu. *H&E*, $\times 100$



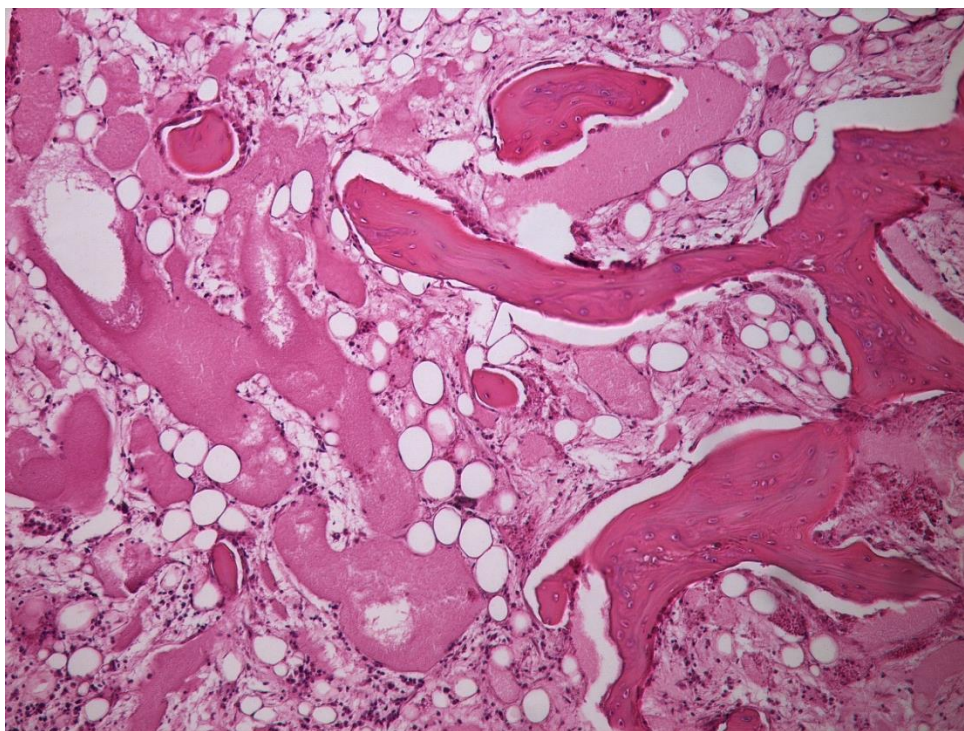
2. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas, kurā redzamas implantētās granulas, plānas kaula trabekulas, perēkļveidīgs saistaudu slānis un sarkanās kaula smadzenes ar taukšūnām. *H&E*, $\times 100$



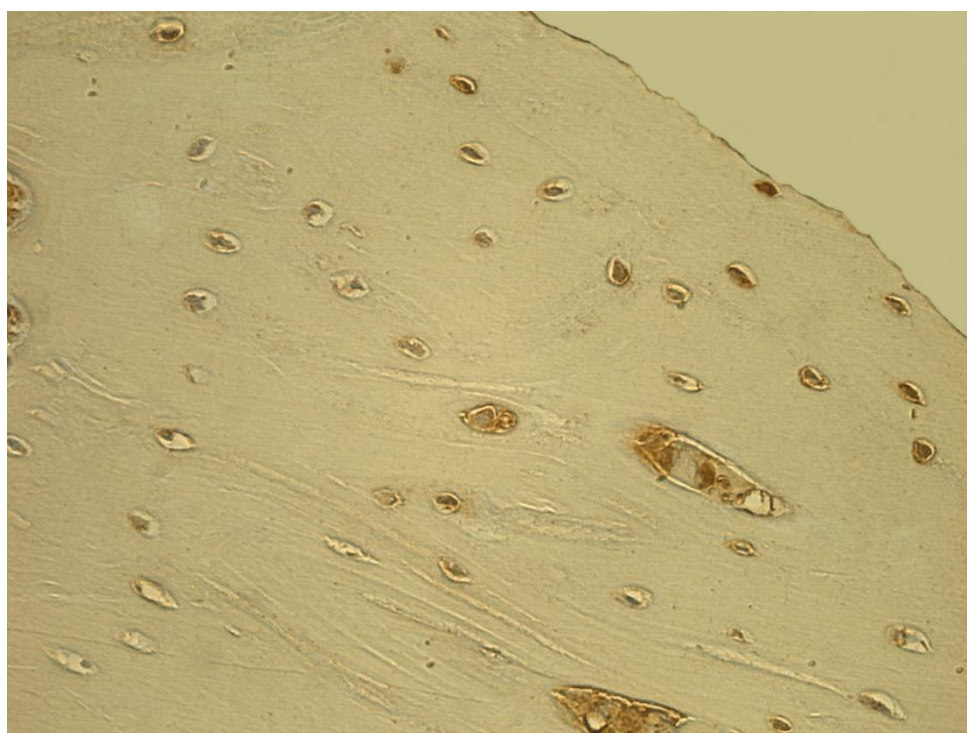
3. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša $Sr-HA_{70}/TCP_{30}$ neoperētās kājas, kur kaula porainā viela sastāv no dažām plānām kaula trabekulām un sarkanām kaula smadzenēm ar taukšūnām.
H&E, $\times 100$



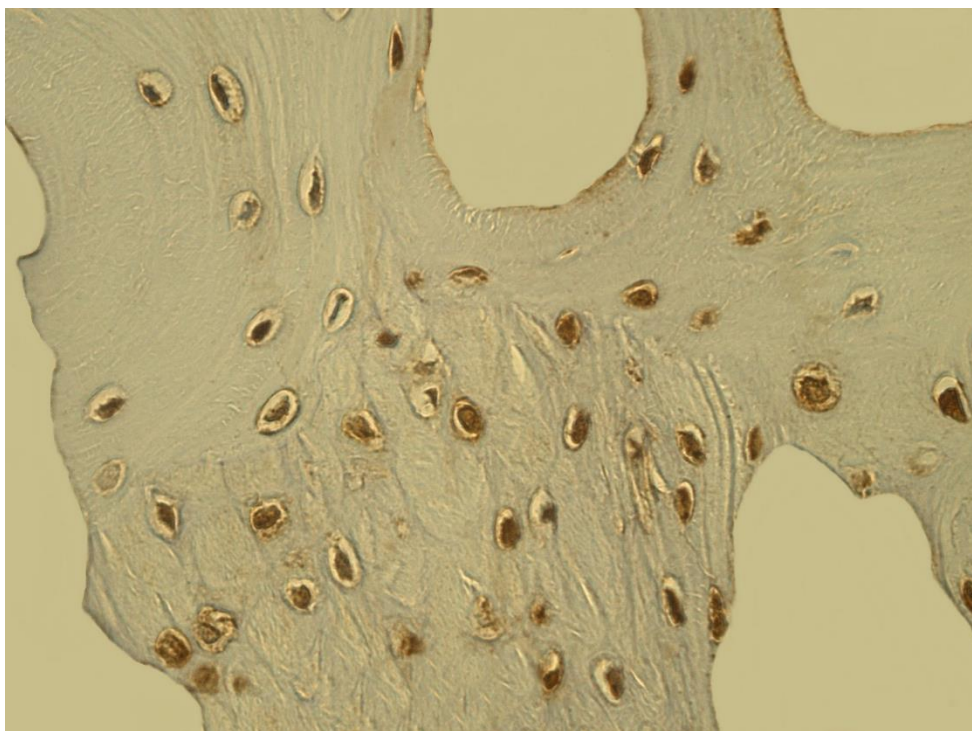
4. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša $Sr-HA_{30}/TCP_{70}$ operētās kājas, kurā redzamas implanta granulas, plānas kaula trabekulas, un periimplantācijas zona ar osteoklastiem (bultiņas). *H&E*, $\times 100$



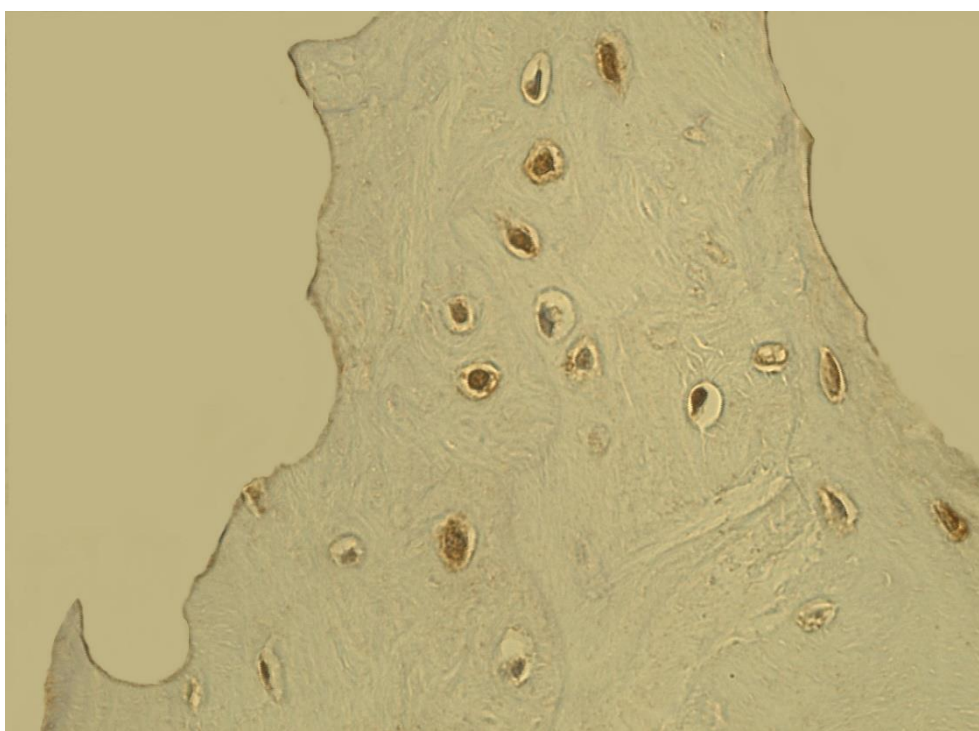
5. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *sham* operētās kājas, kurā redzamas dažāda diametra kaula trabekulas, jaunveidots kauls, izteikts saistaudu slānis un retākas taukšūnas sarkanajās kaula smadzenēs. *H&E*, $\times 100$



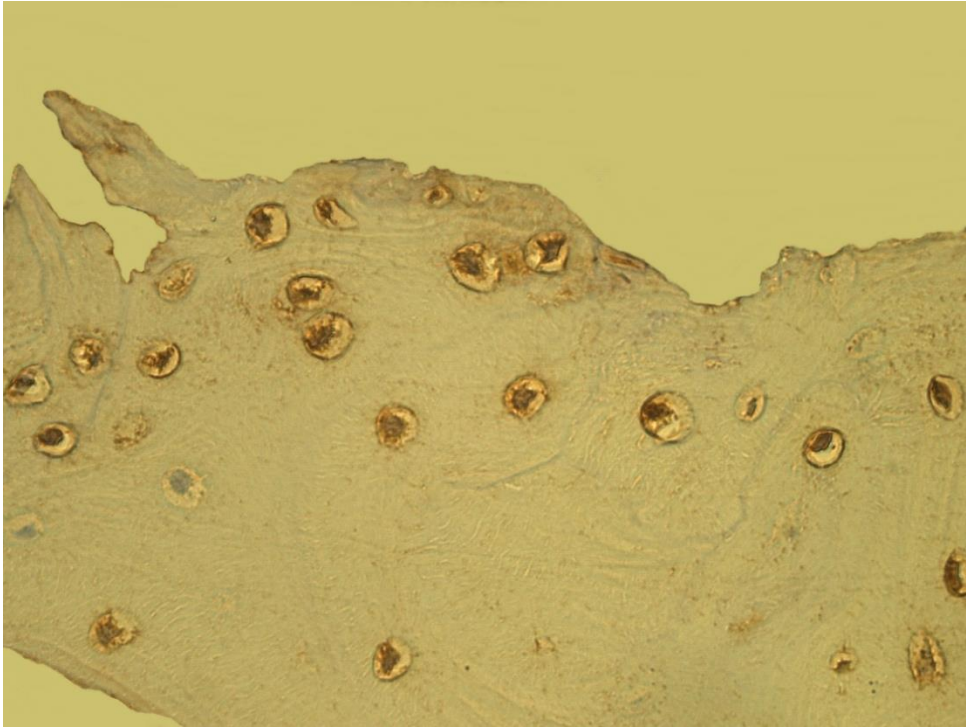
6. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no vesela truša augšstilba kaula, kurā redzams vidēji daudz (++) *Col-1α* saturošu imūnpozitīvo šūnu skaits. *Col-1α IMH*, $\times 400$



7. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* operētās kājas, kurā redzams daudz (+++) *Col-1α* pozitīvu osteocītu.
Col-1α IMH, × 400



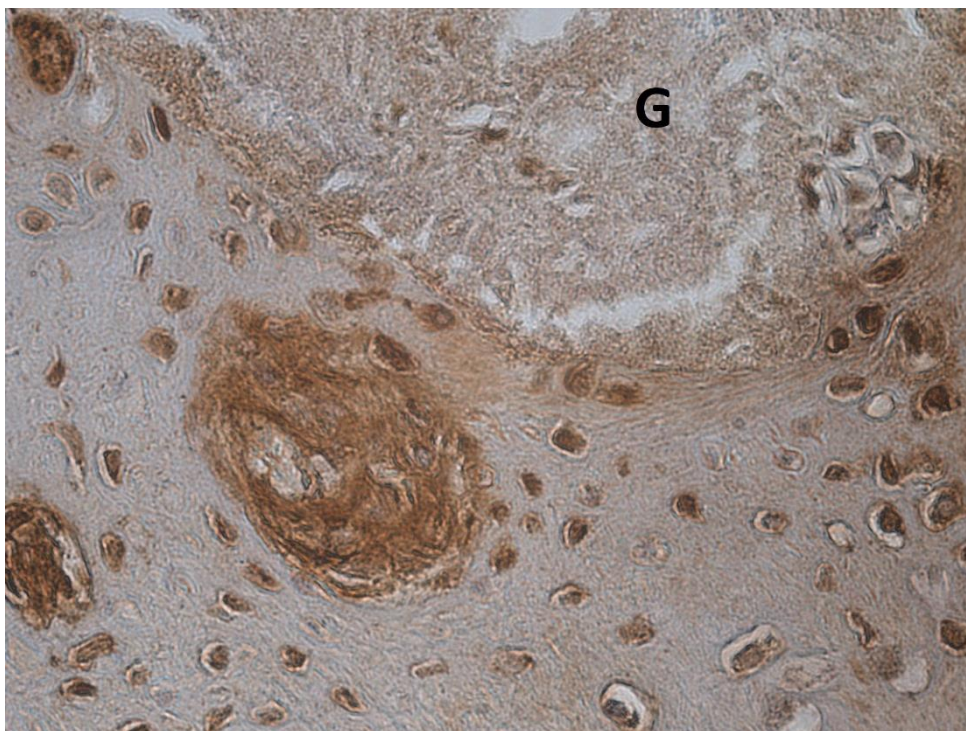
8. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *Col-1α* pozitīvu kaula šūnu.
Col-1α IMH, × 400



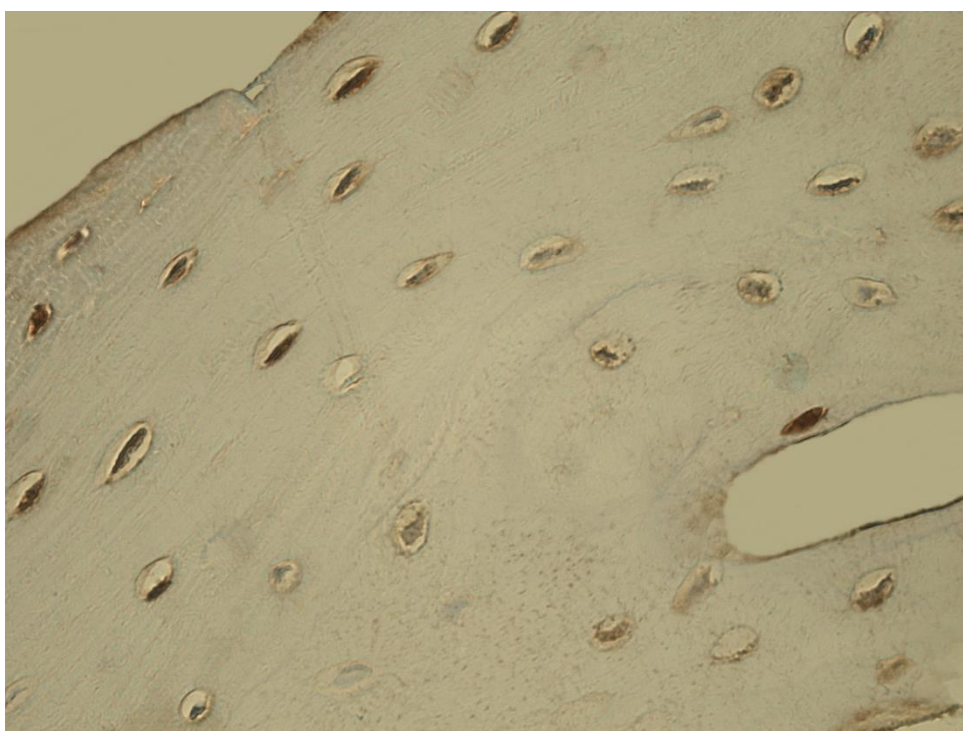
9. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{30}/TCP_{70} operētās kājas, kurā redzams daudz (+++) *Col-1α* pozitīvu osteocītu.
Col-1α IMH, $\times 400$



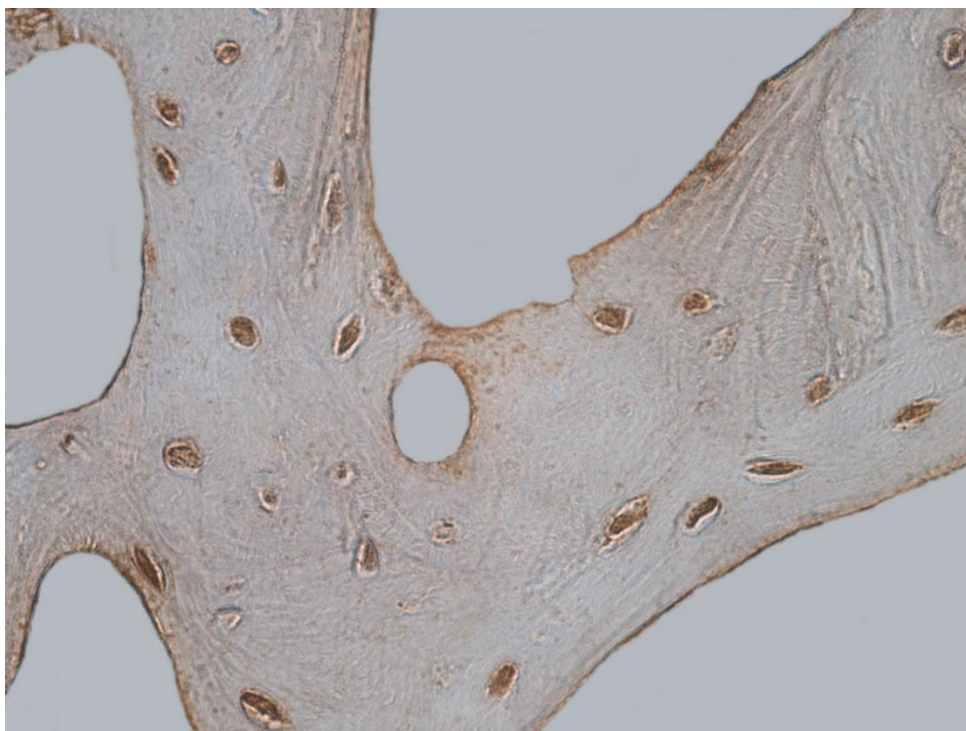
10. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{30}/TCP_{70} neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz līdz daudz (++/+++) *Col-1α* pozitīvu kaula šūnu. *Col-1α IMH*, $\times 400$



11. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas, kurā redzams daudz (+++) *Col-1α* pozitīvu kaula šūnu. G – granula. *Col-1α* IMH, × 400



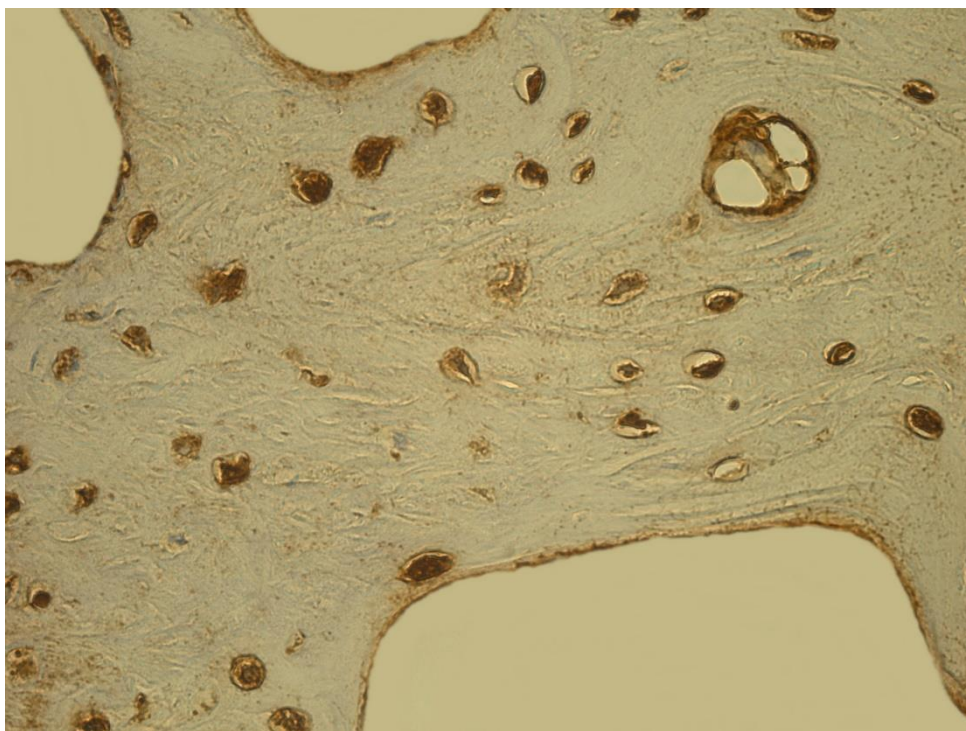
12. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *Col-1α* pozitīvu kaula šūnu. *Col-1α* IMH, × 400



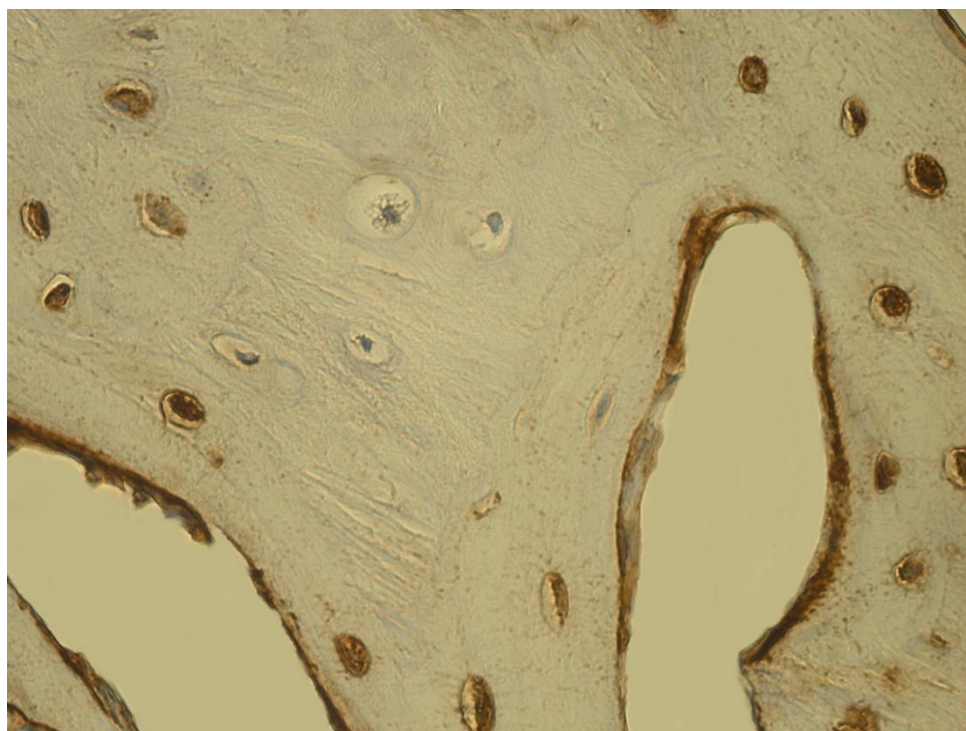
13. mikrofotogrāfija. Adu paraugs no truša HA_{70}/TCP_{30} operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) $Col-1\alpha$ pozitīvu kaula šūnu.
Col-1 α IMH, $\times 400$



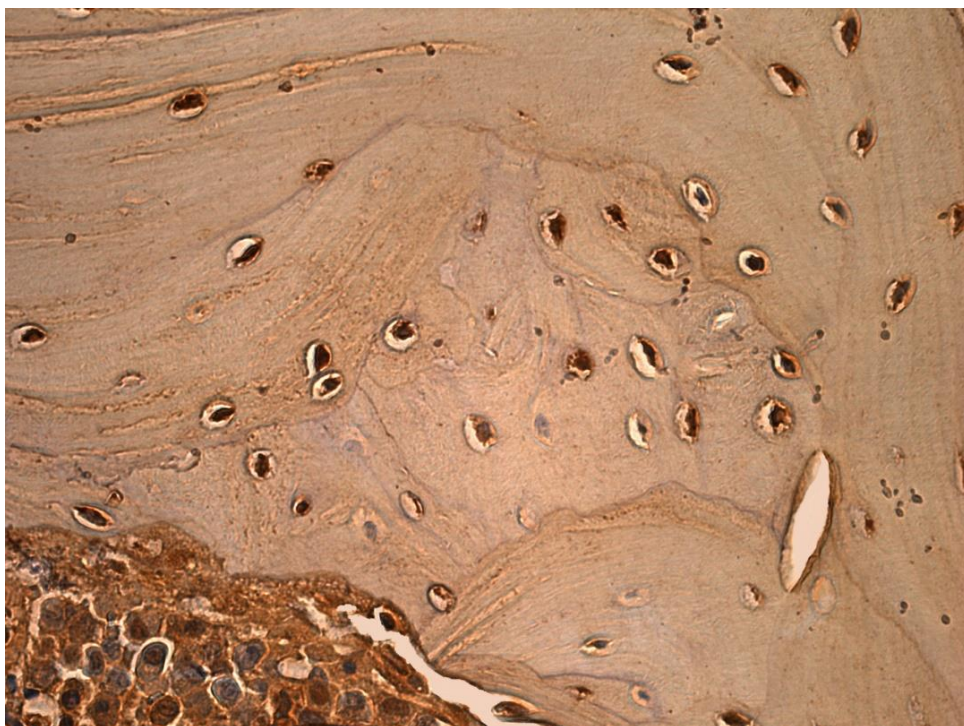
14. mikrofotogrāfija. Adu paraugs no kaula HA_{70}/TCP_{30} neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) $Col-1\alpha$ pozitīvu kaula šūnu.
Col-1 α IMH, $\times 400$



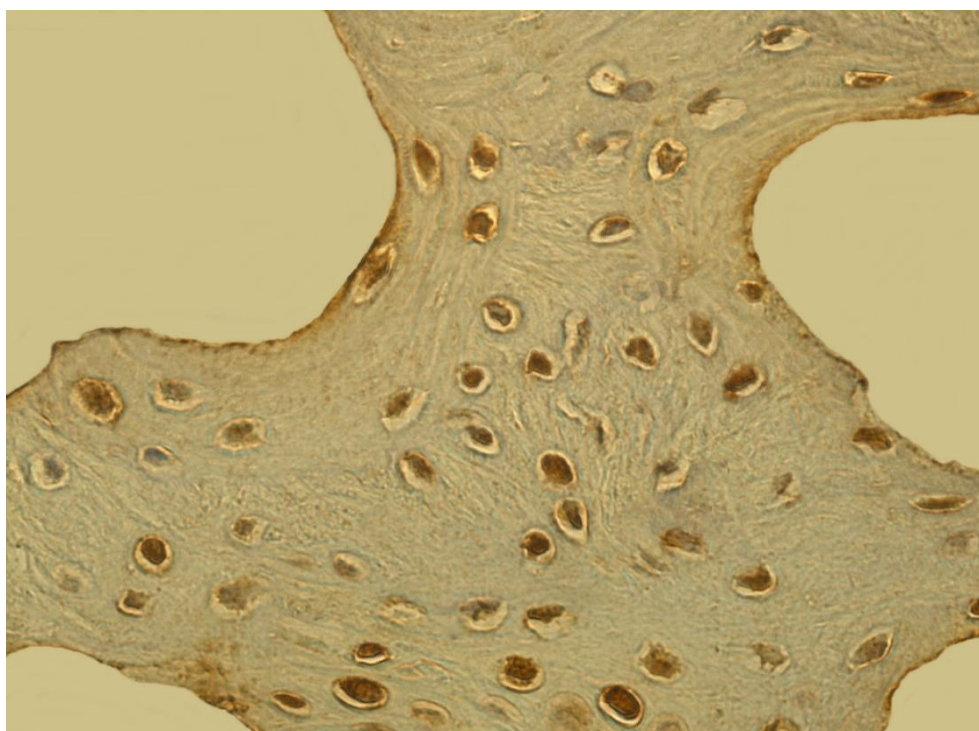
15. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *sham* operētās kājas, kurā redzams daudz (+++) *Col-1α* pozitīvu osteocītu. *Col-1α* IMH, × 400



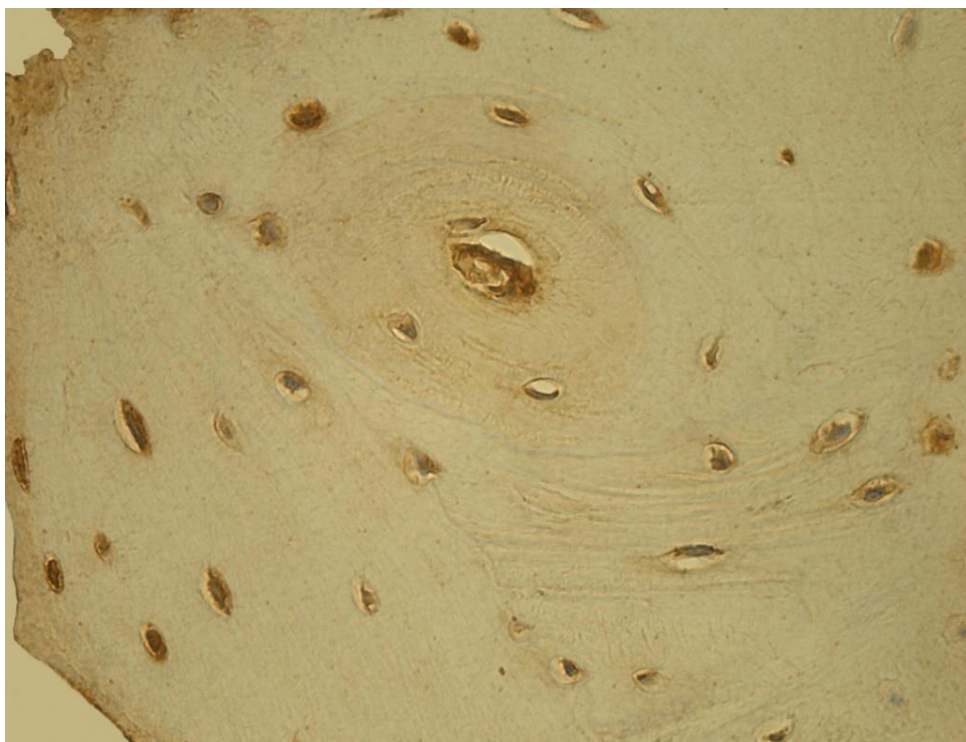
16. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *sham* neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *Col-1α* pozitīvu osteocītu. *Col-1α* IMH, × 400



17. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no vesela truša augšstilba kaula, kurā redzams daudz (+++) OC saturošu pozitīvu struktūru redzes laukā. OC IMH, $\times 400$



18. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša $Sr-HA_{30}/TCP_{70}$ operētās kājas, kurā redzams daudz (+++) OC pozitīvu kaula šūnu. OC IMH, $\times 400$



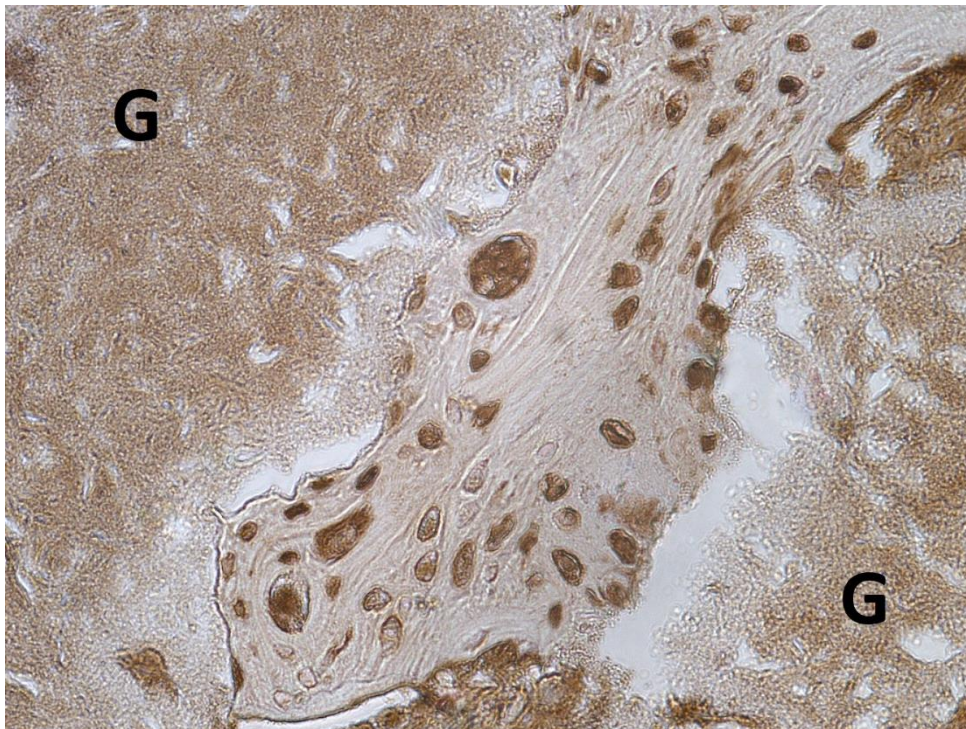
19. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša $Sr-HA_{30}/TCP_{70}$ neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) OC pozitīvu kaula šūnu.
OC IMH, $\times 400$



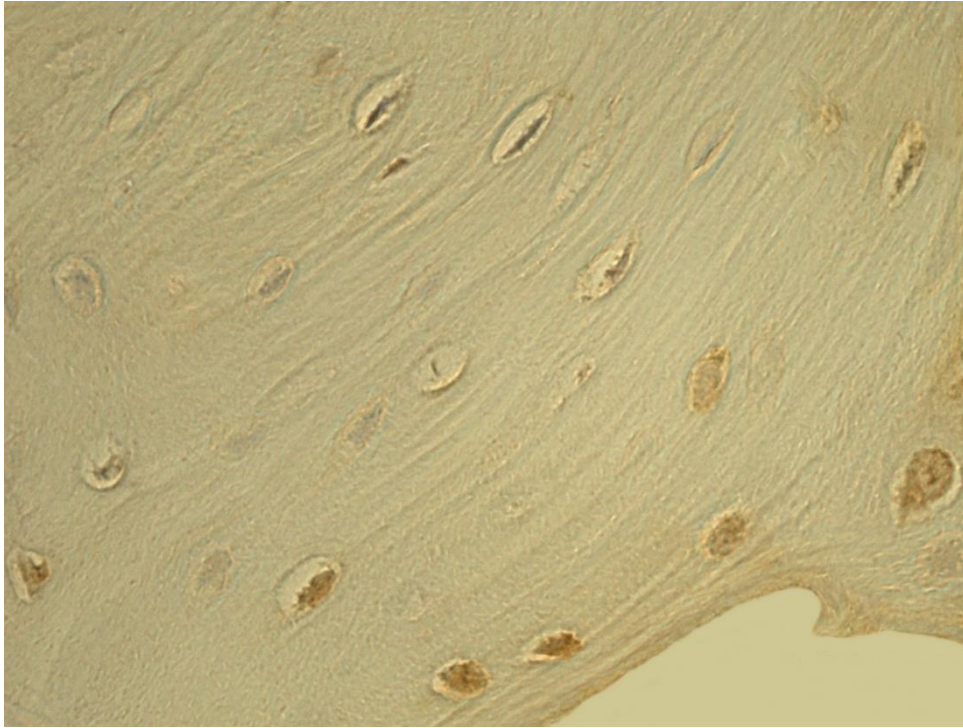
20. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{30}/TCP_{70} operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz līdz daudz (++/+++) OC pozitīvu kaula šūnu. G – granula. OC IMH, $\times 400$



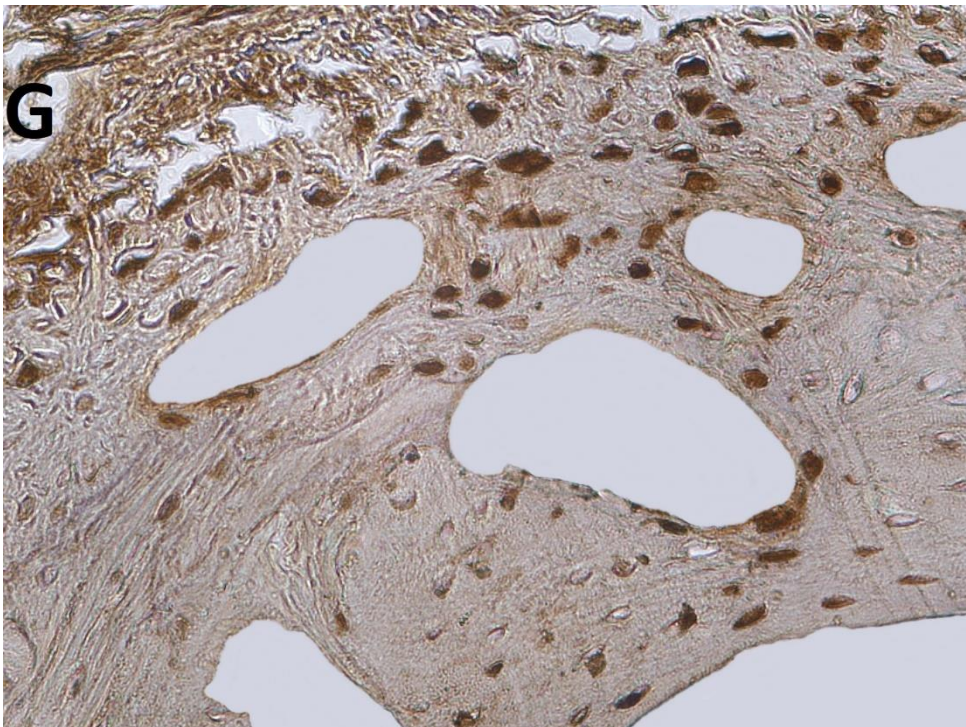
21. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{30}/TCP_{70} neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) OC pozitīvu osteocītu.
OC IMH, $\times 400$



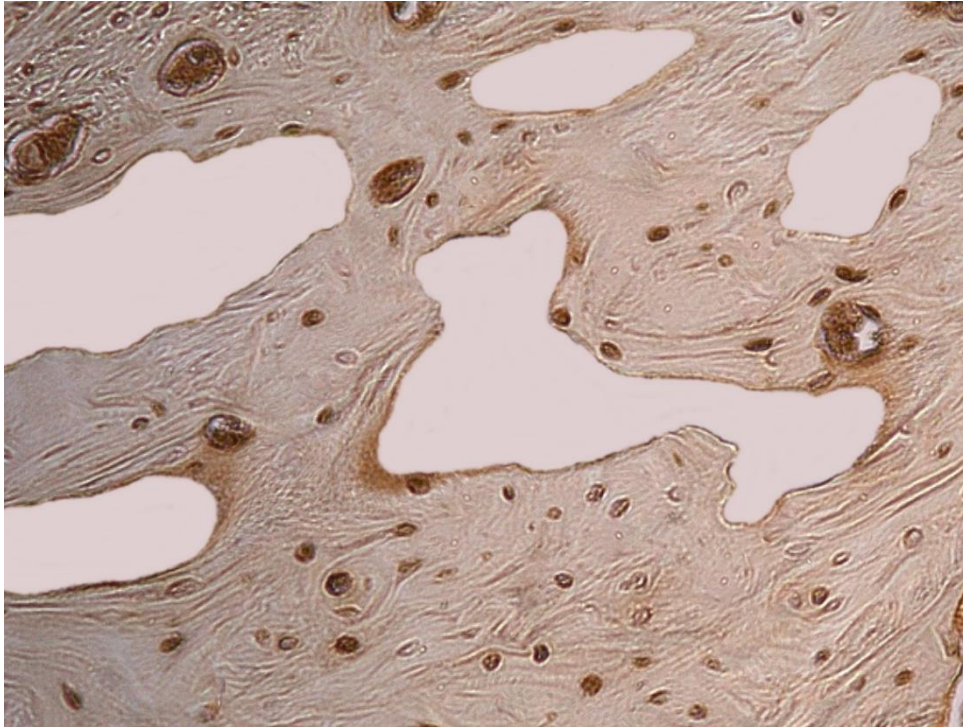
22. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša $Sr-HA_{70}/TCP_{30}$ operētās kājas, kurā redzams daudz līdz ļoti daudz (+++/++++) OC pozitīvu kaula šūnu. G – granula. OC IMH, $\times 250$



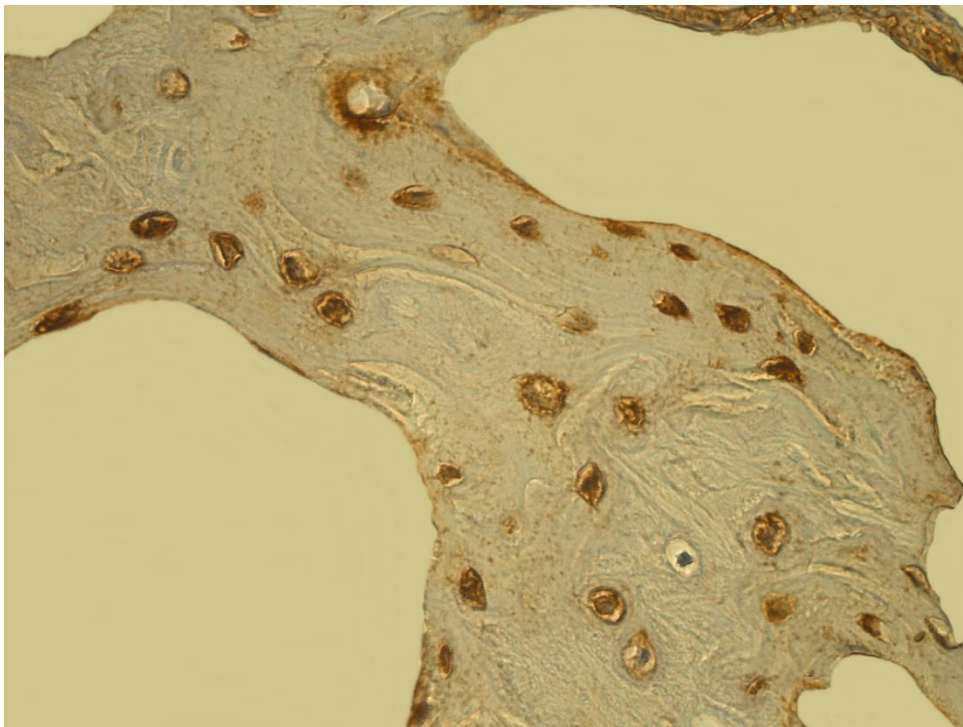
23. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* neoperētās kājas, kurā redzams maz līdz vidēji daudz (+/++) OC pozitīvu kaula šūnu. OC IMH, × 400



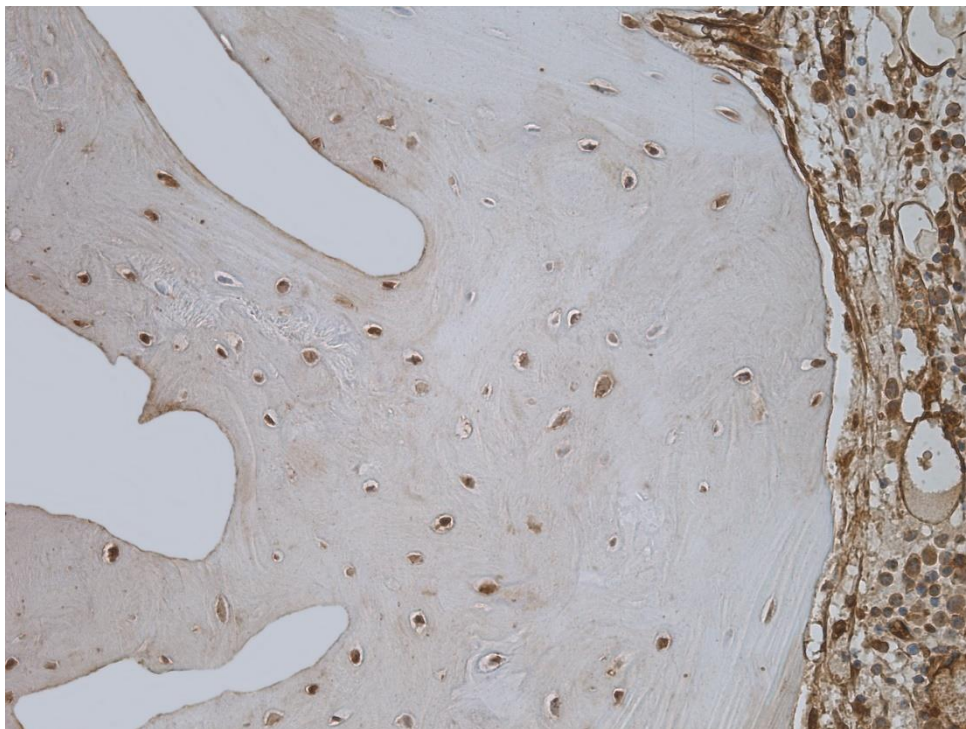
24. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas, kurā redzams daudz (+++) OC pozitīvu kaula šūnu. G – granula. OC IMH, × 250



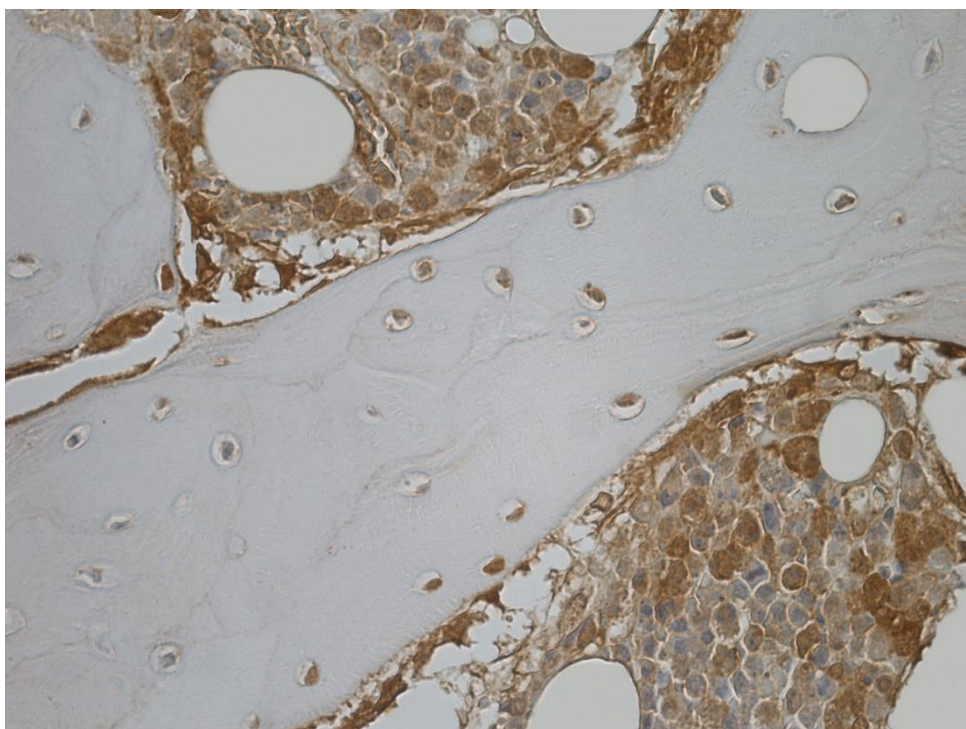
25. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *HA₇₀/TCP₃₀* neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) OC pozitīvu osteocītu.
OC IMH, × 200



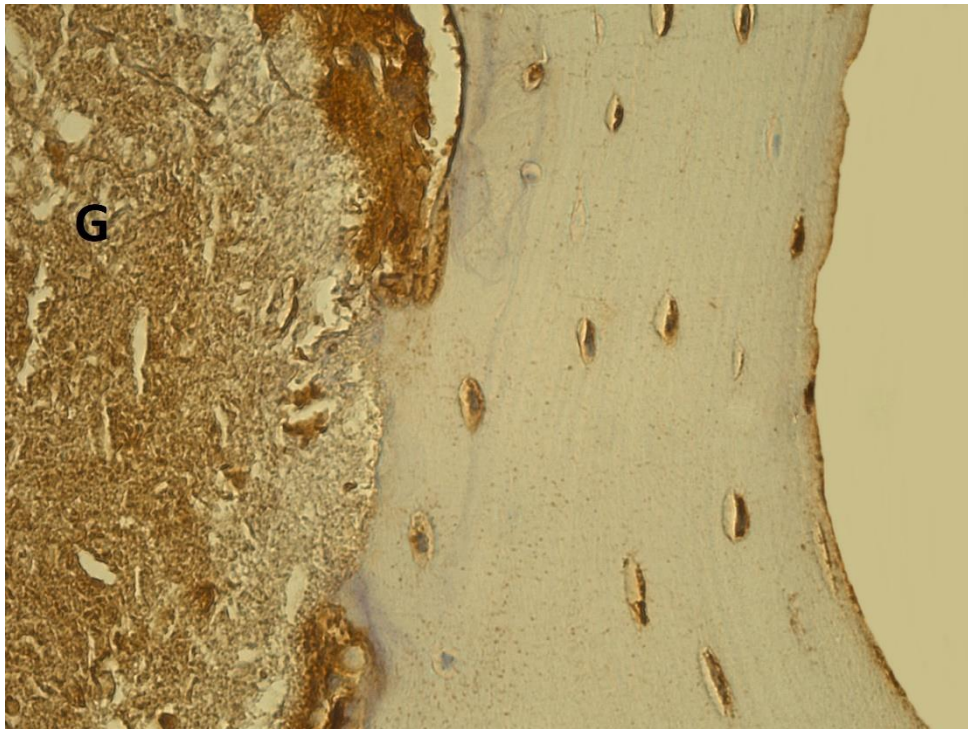
26. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *sham* operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz līdz daudz (++) OC pozitīvu kaula šūnu.
OC IMH, × 400



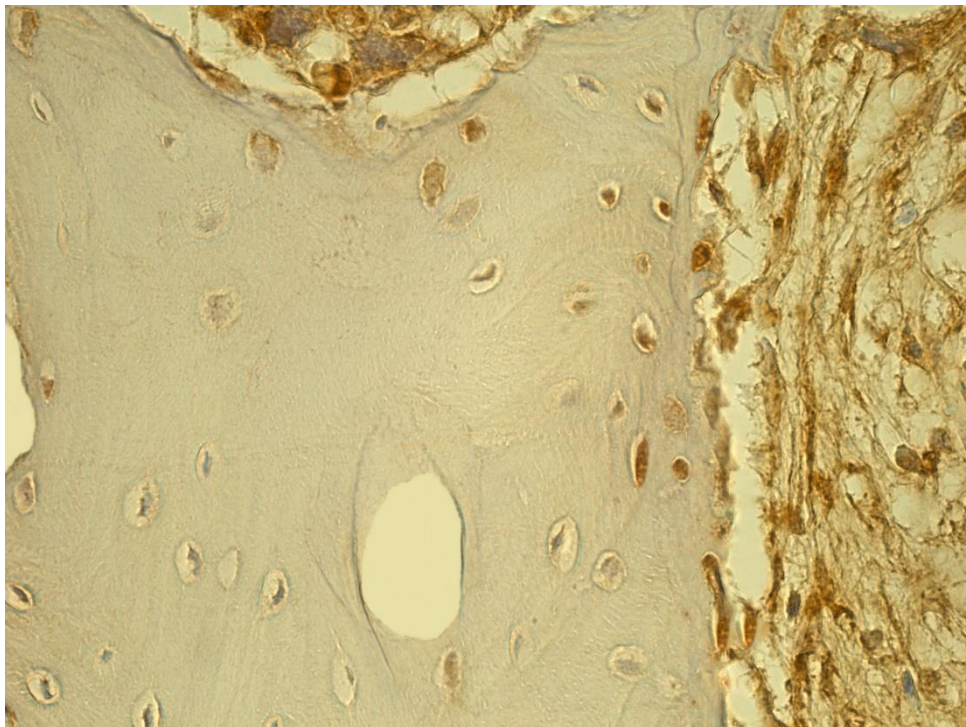
27. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *sham* neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) OC pozitīvu kaula šūnu. OC IMH, × 200



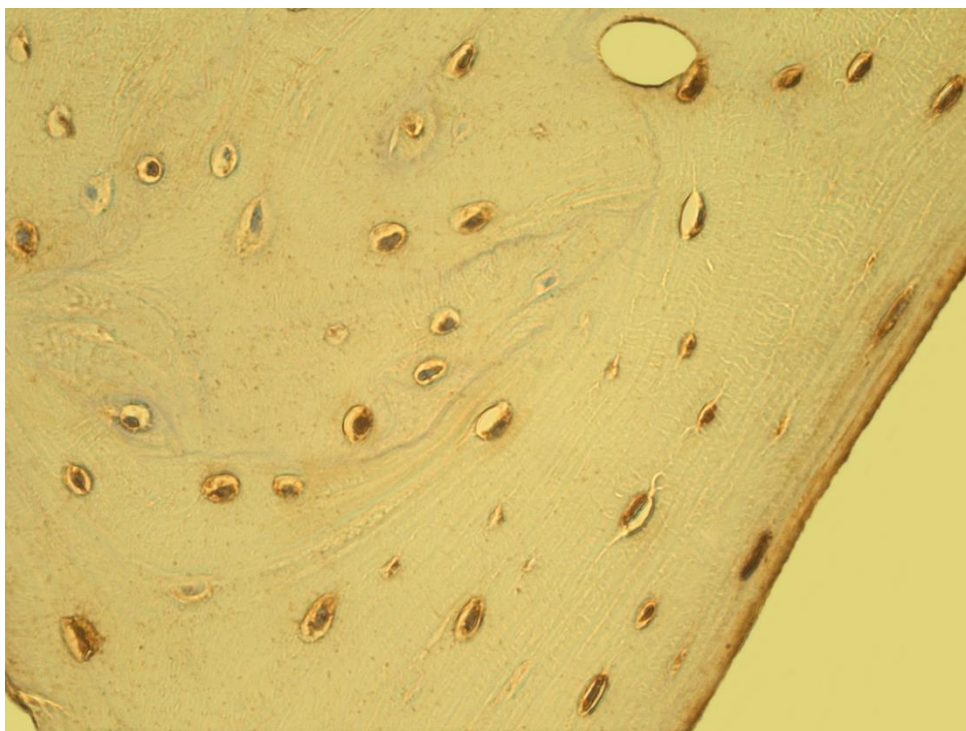
28. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no vesela truša augšstilba kaula, kurā redzams maz līdz vidēji daudz (+/++) BMP-2/4 pozitīvu kaula šūnu. BMP-2/4 IMH, × 400



29. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša $Sr-HA_{30}/TCP_{70}$ operētās kājas, kurā redzams daudz (+++) BMP-2/4 pozitīvu kaula šūnu. G – granula. BMP-2/4 IMH, $\times 400$



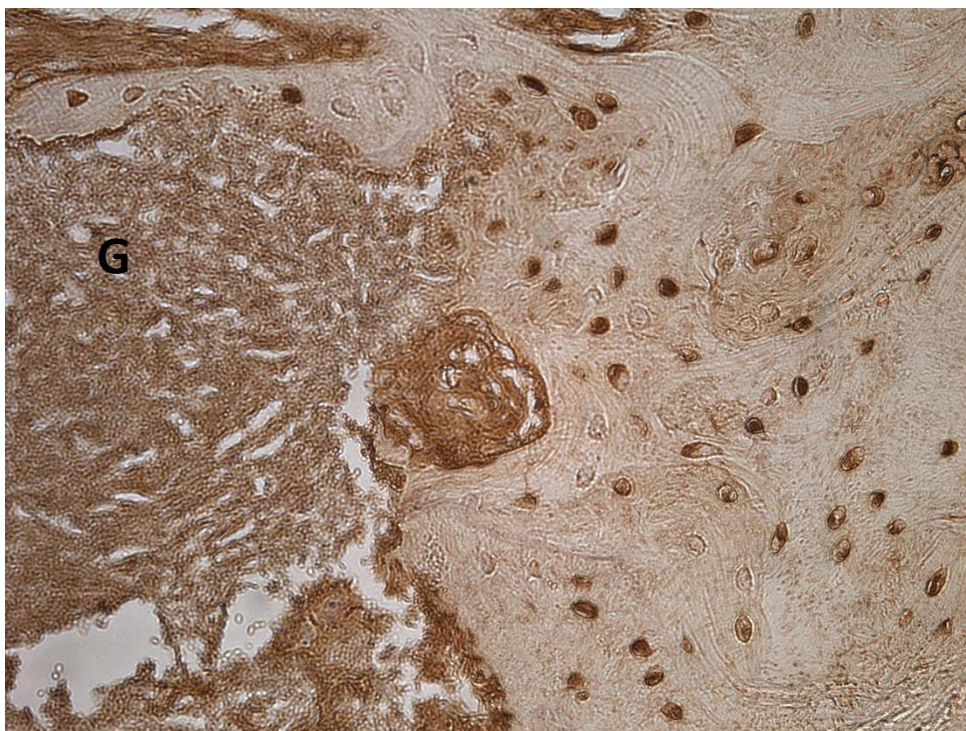
30. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša $Sr-HA_{30}/TCP_{70}$ neoperētās kājas, kurā redzams maz līdz vidēji daudz (+/++) BMP-2/4 pozitīvu kaula šūnu. BMP-2/4 IMH, $\times 400$



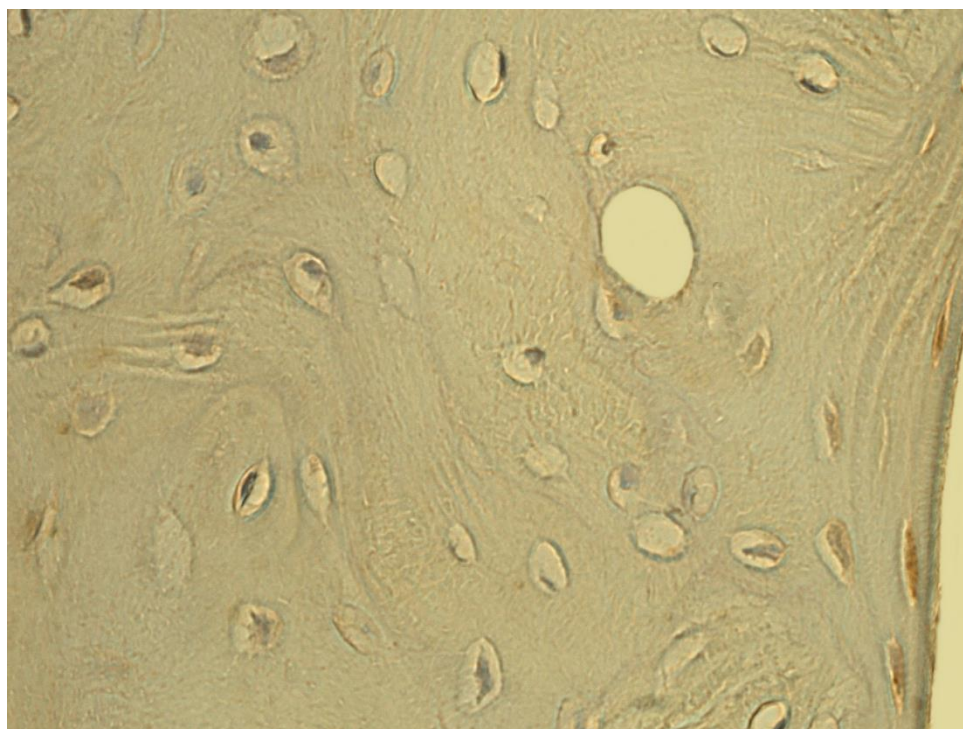
31. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{30}/TCP_{70} operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz līdz daudz (++)/+++ BMP-2/4 pozitīvu kaula šūnu. BMP-2/4 IMH, $\times 400$



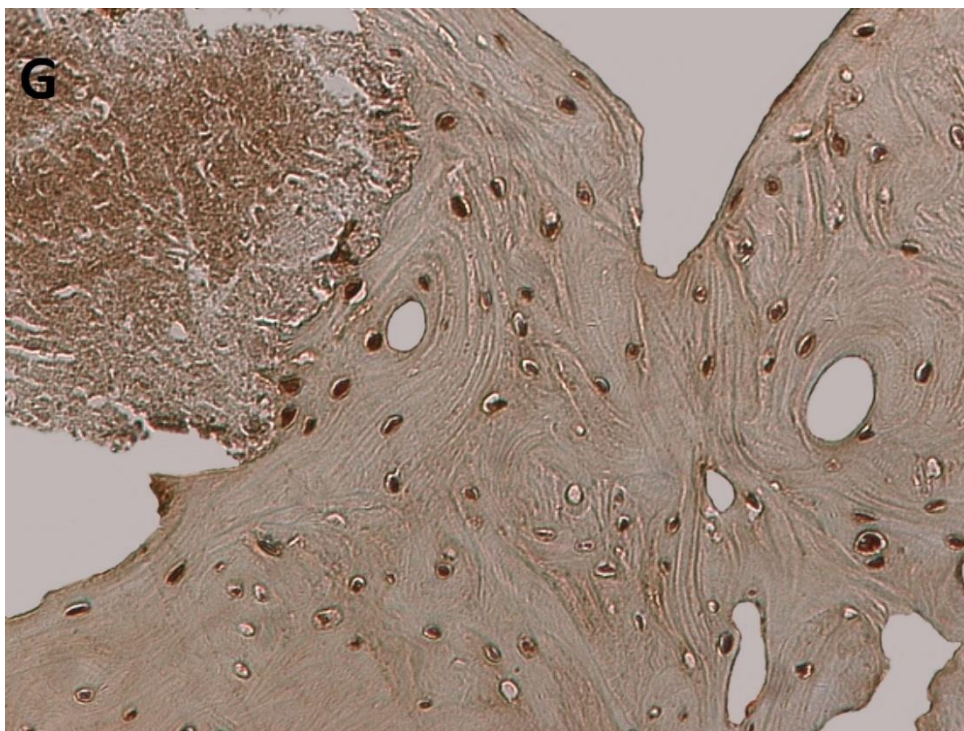
32. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{30}/TCP_{70} neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) BMP-2/4 pozitīvu kaula šūnu. BMP-2/4 IMH, $\times 400$



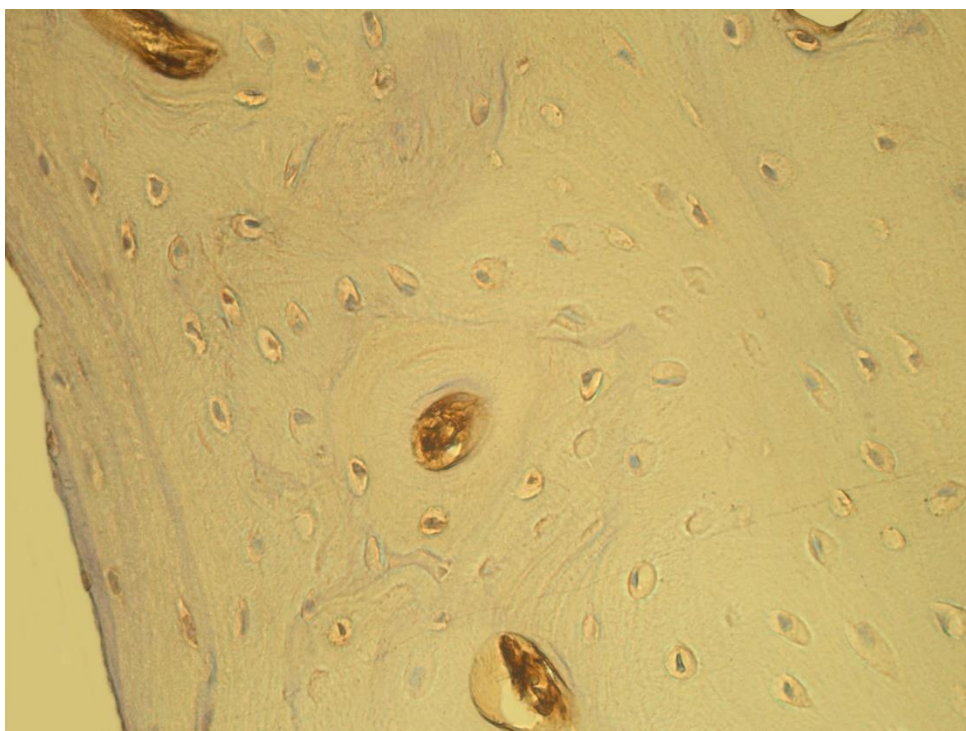
33. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz līdz daudz (++)/+++ BMP-2/4 pozitīvu kaula šūnu. G – granula. *BMP-2/4 IMH*, × 250



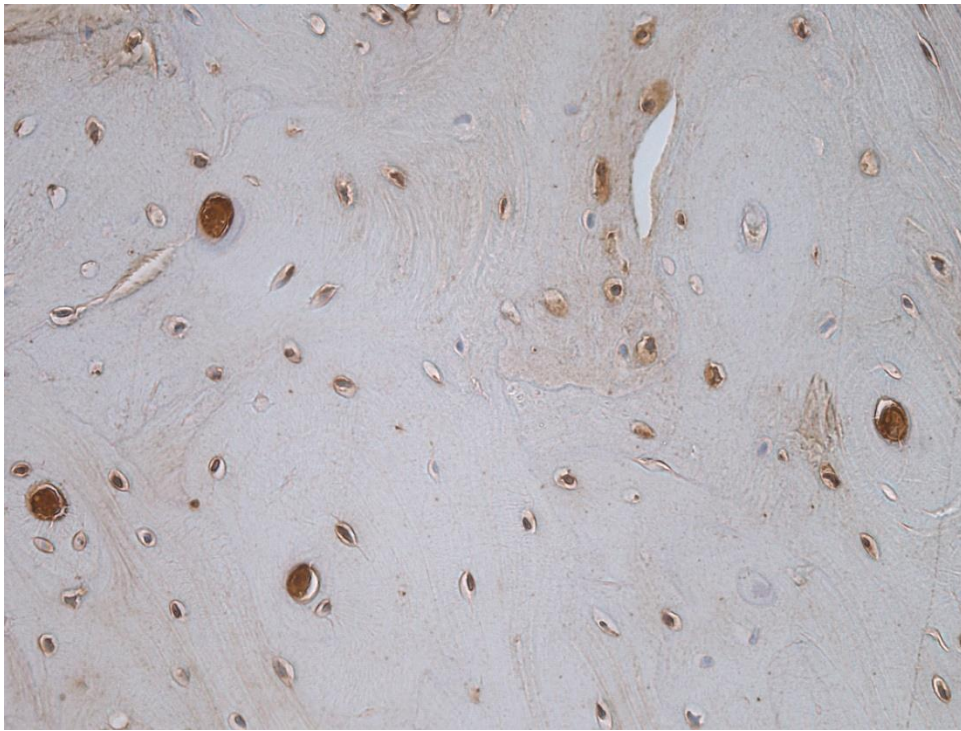
34. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* neoperētās kājas, kurā redzamas tikai dažas (0/+) BMP-2/4 pozitīvas kaula šūnas. *BMP-2/4 IMH*, × 400



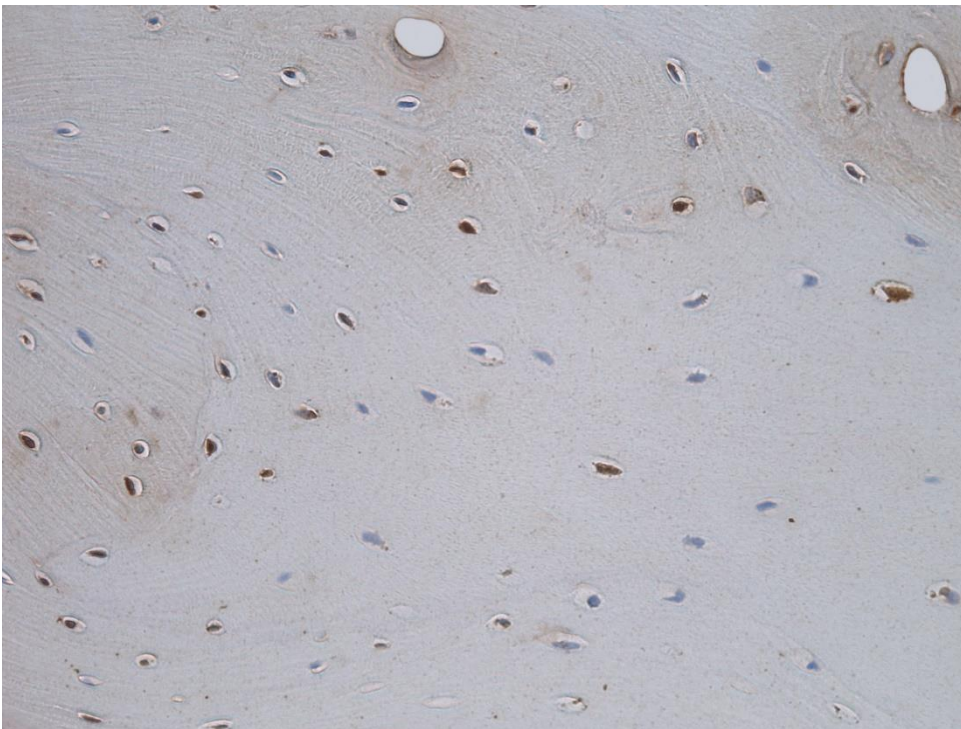
35. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{70}/TCP_{30} operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) $BMP-2/4$ pozitīvu kaula šūnu.
G – granula. $BMP-2/4$ IMH, $\times 200$



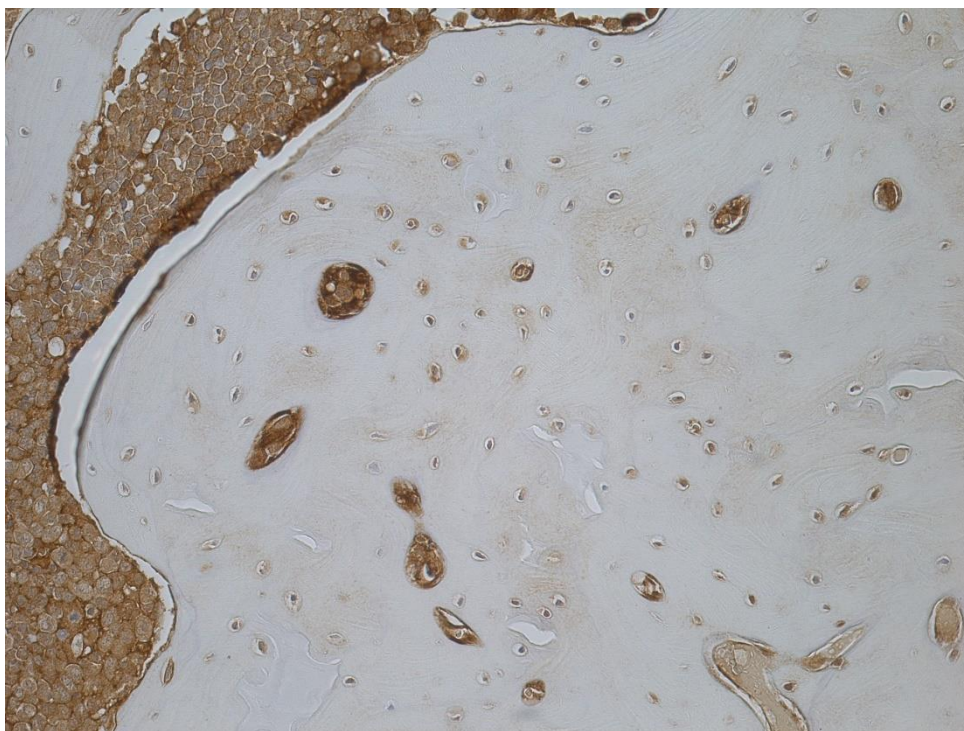
36. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{70}/TCP_{30} neoperētās kājas, kurā redzamas tikai dažas (0/+) $BMP-2/4$ pozitīvas kaula šūnas.
 $BMP-2/4$ IMH, $\times 400$



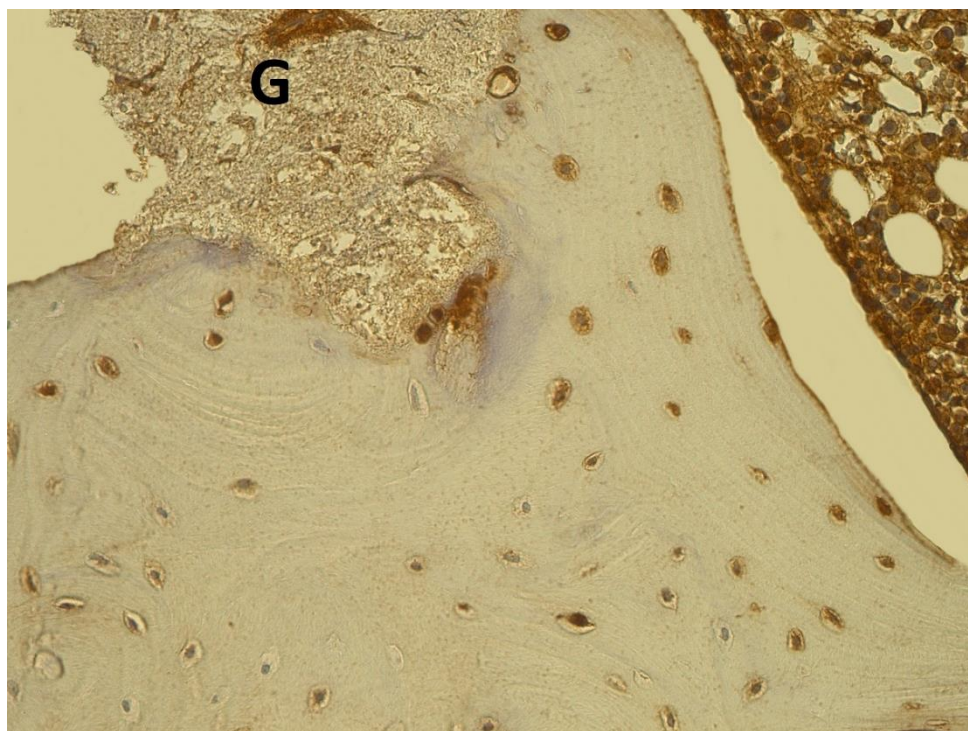
37. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *sham* operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *BMP-2/4* pozitīvu kaula šūnu.
BMP-2/4 IMH, × 200



38. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *sham* neoperētās kājas, kurā redzams maz līdz vidēji daudz (+/++) *BMP-2/4* pozitīvu kaula šūnu.
BMP-2/4 IMH, × 200



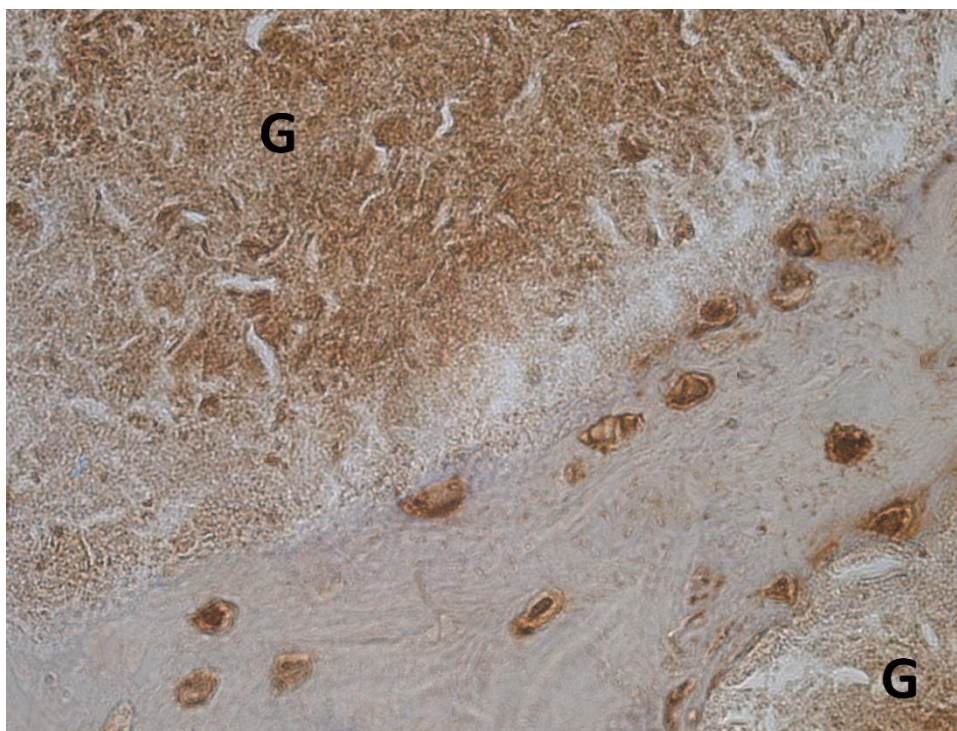
39. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no vesela truša augšstilba kaula, kurā redzams vidēji daudz (++) *NFkB-105* pozitīvu šūnu.
NFkB-105 IMH, × 200



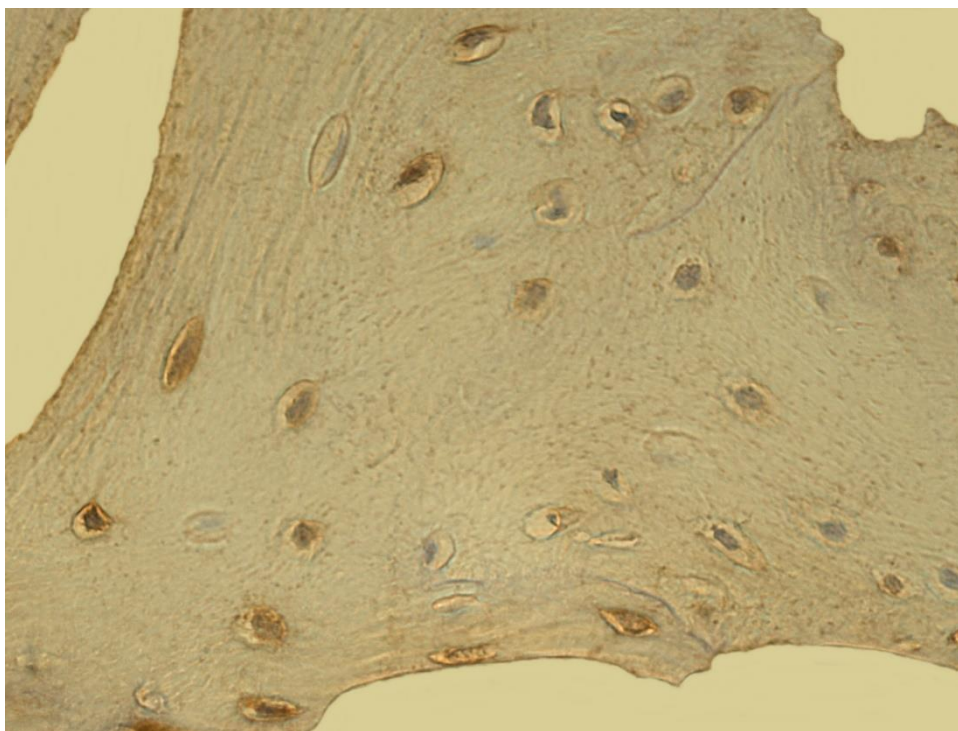
40. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *NFkB-105* pozitīvu kaula šūnu.
G – granula. *NFkB-105 IMH, × 250*



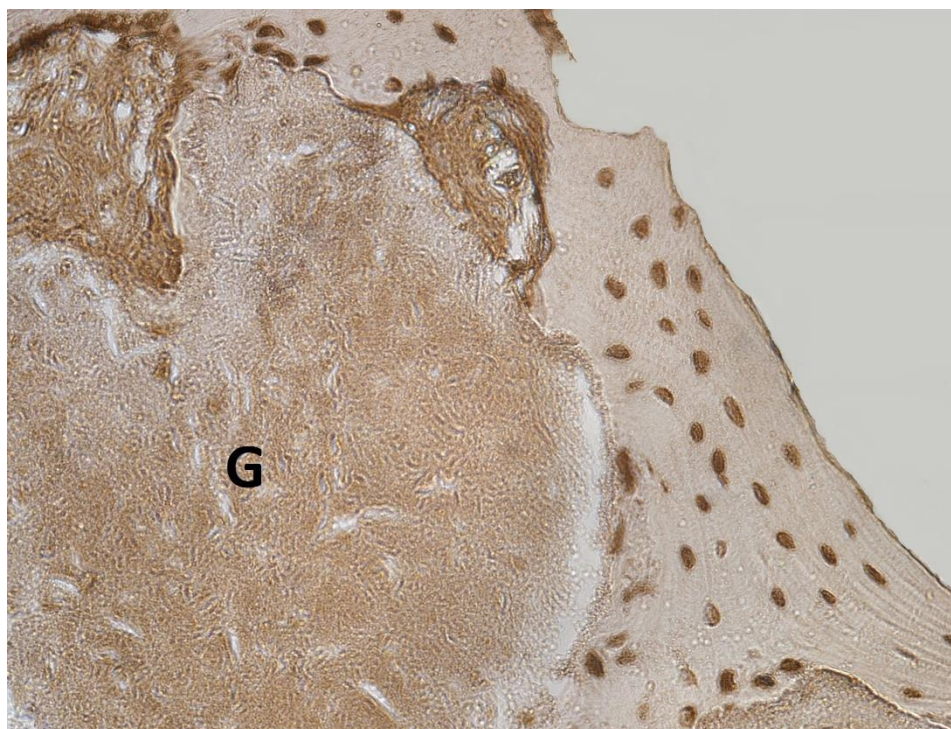
41. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša $Sr-HA_{30}/TCP_{70}$ neoperētās kājas, kurā redzams maz (+) *NFκB-105* pozitīvu kaula šūnu.
NFκB-105 IMH, × 400



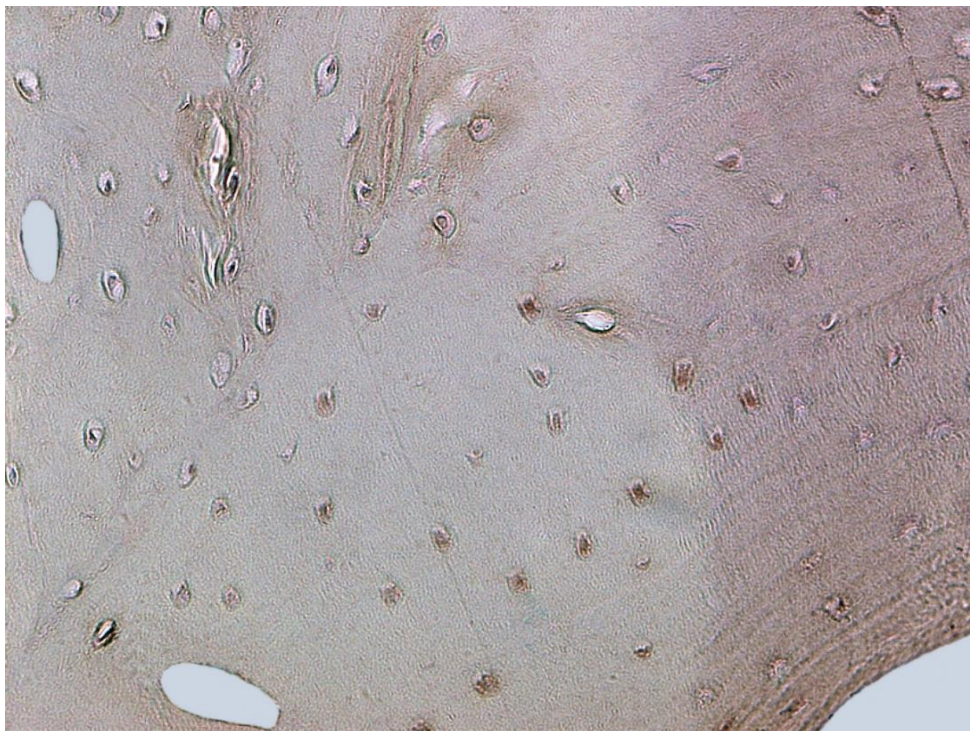
42. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{30}/TCP_{70} operētās kājas, kurā redzams maz līdz vidēji daudz (+/++) *NFκB-105* pozitīvu kaula šūnu. G – granula. *NFκB-105 IMH, × 400*



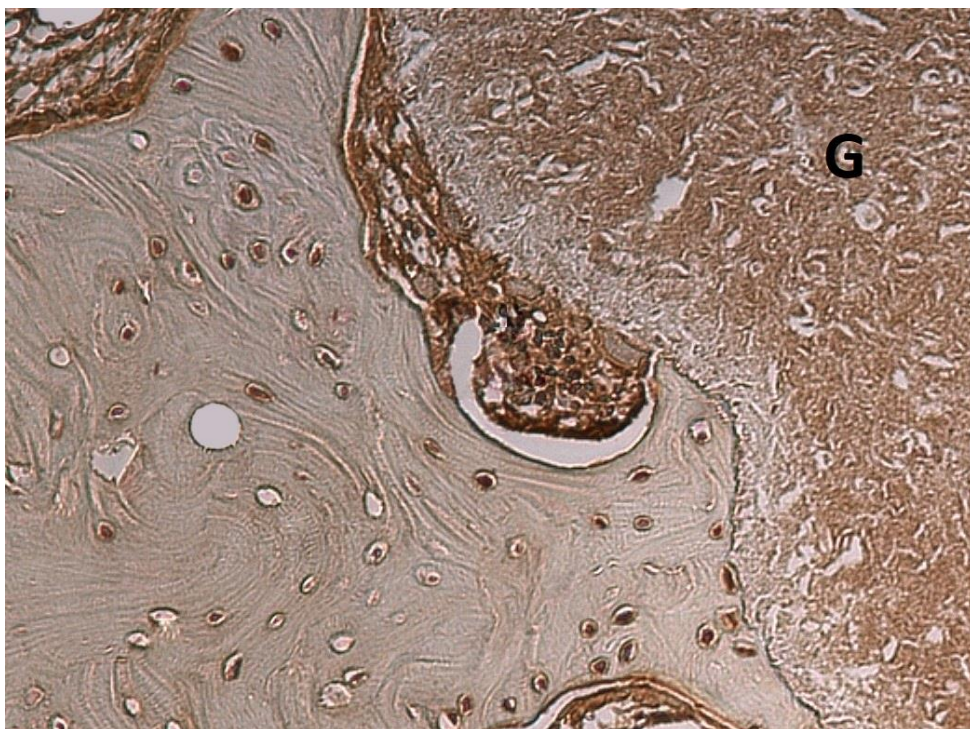
43. mikrofotogrāfija. Adu paraugs no truša HA_{30}/TCP_{70} neoperētās kājas, kurā redzams maz (+) *NFκB-105* saturošu kaula šūnu.
NFκB-105 IMH, × 400



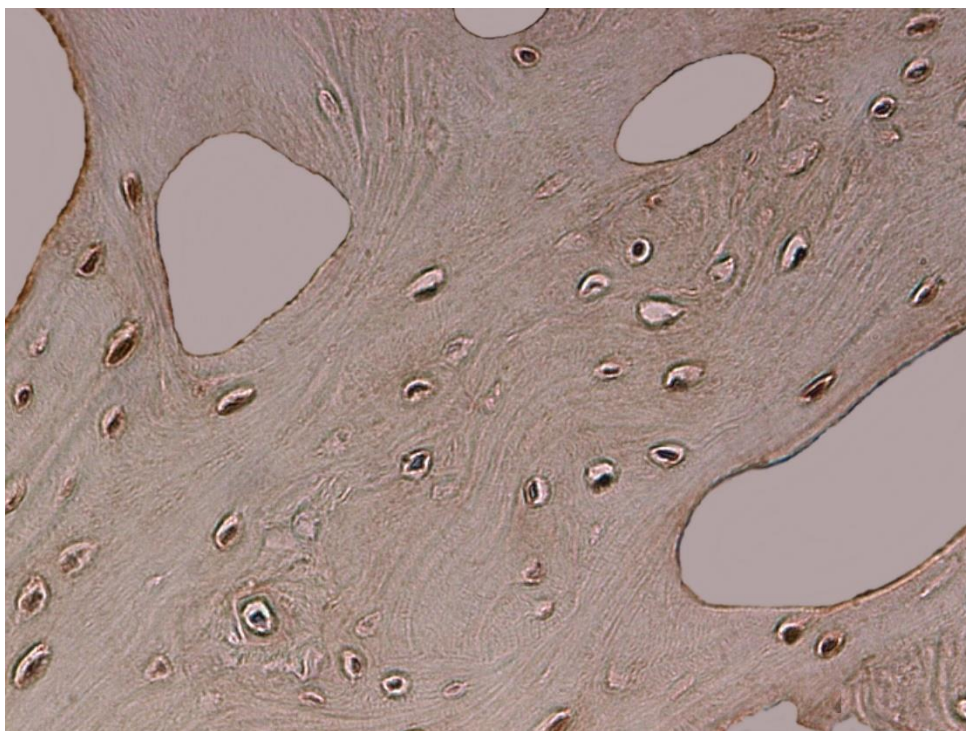
44. mikrofotogrāfija. Adu paraugs no truša $Sr-HA_{70}/TCP_{30}$ operētās kājas, kurā redzams daudz (+++) *NFκB-105* pozitīvu kaula šūnu.
G – granula. *NFκB-105* IMH, × 250



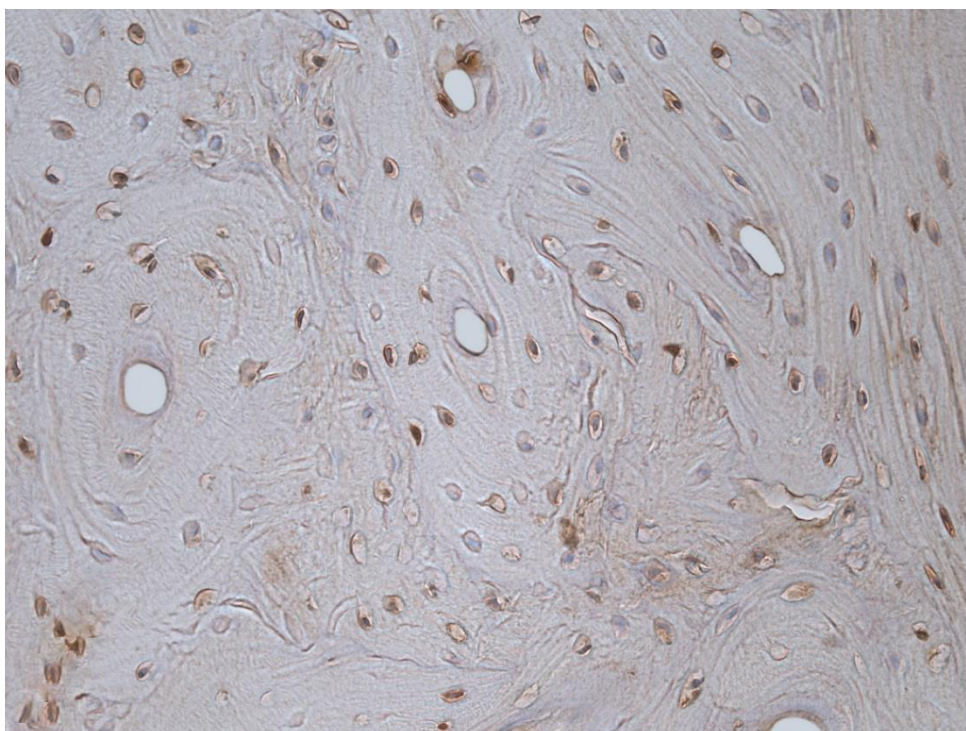
45. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *NFkB-105* pozitīvu kaula šūnu.
NFkB-105 IMH, × 400



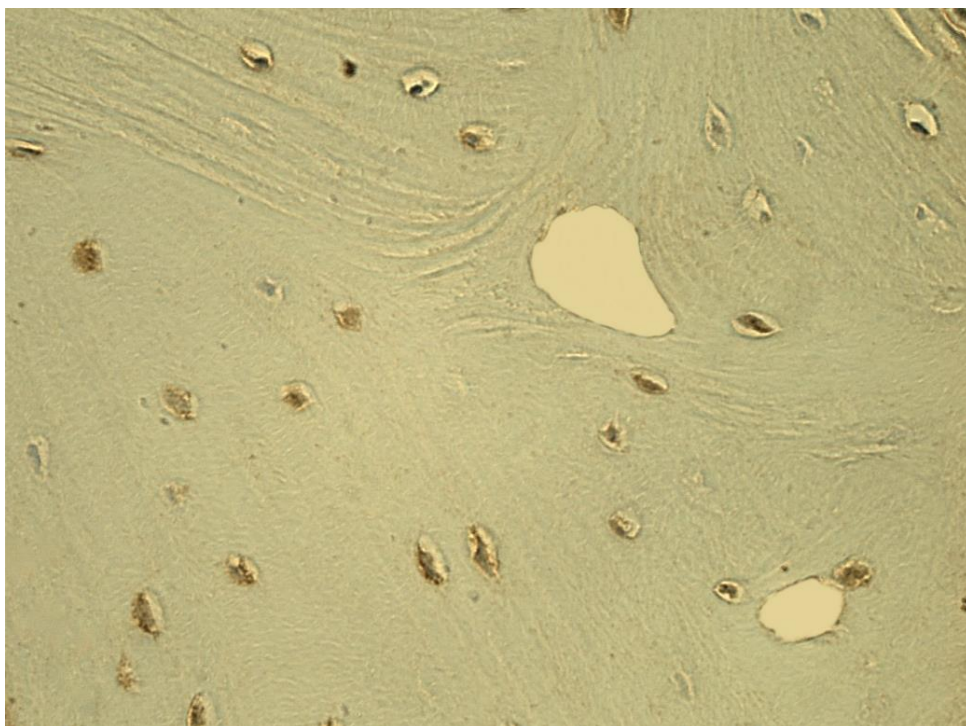
46. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *NFkB-105* pozitīvu osteocītu.
G – granula. NFkB-105 IMH, × 250



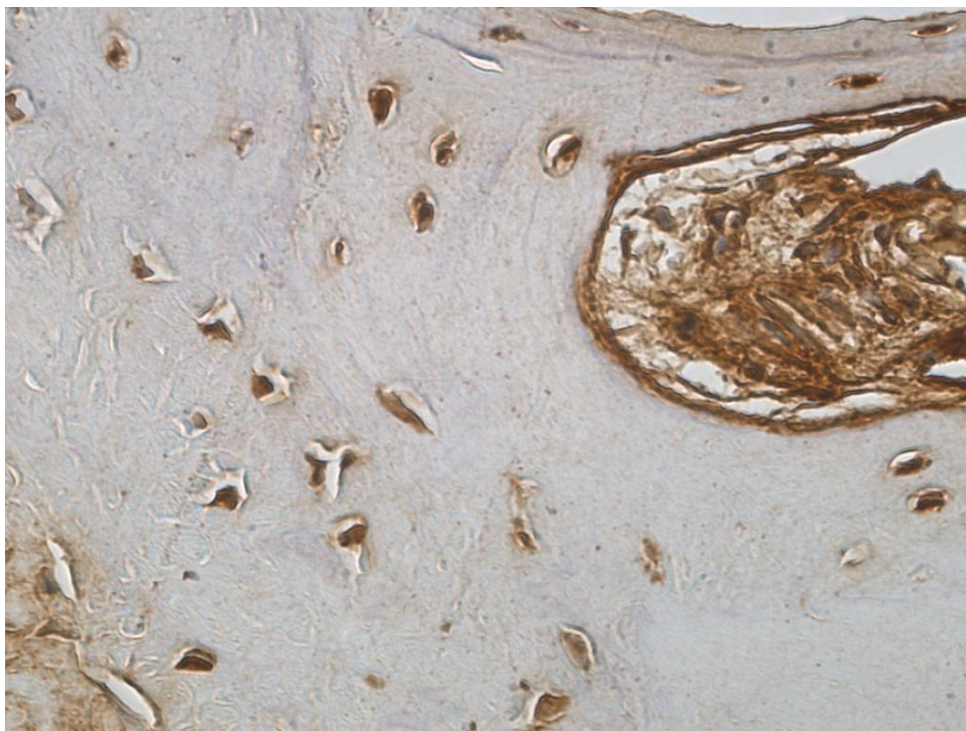
47. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *HA₇₀/TCP₃₀* neoperētās kājas, kurā redzams maz līdz vidēji daudz (+/++) *NFkB-105* pozitīvu kaula šūnu. *NFkB-105 IMH*, × 250



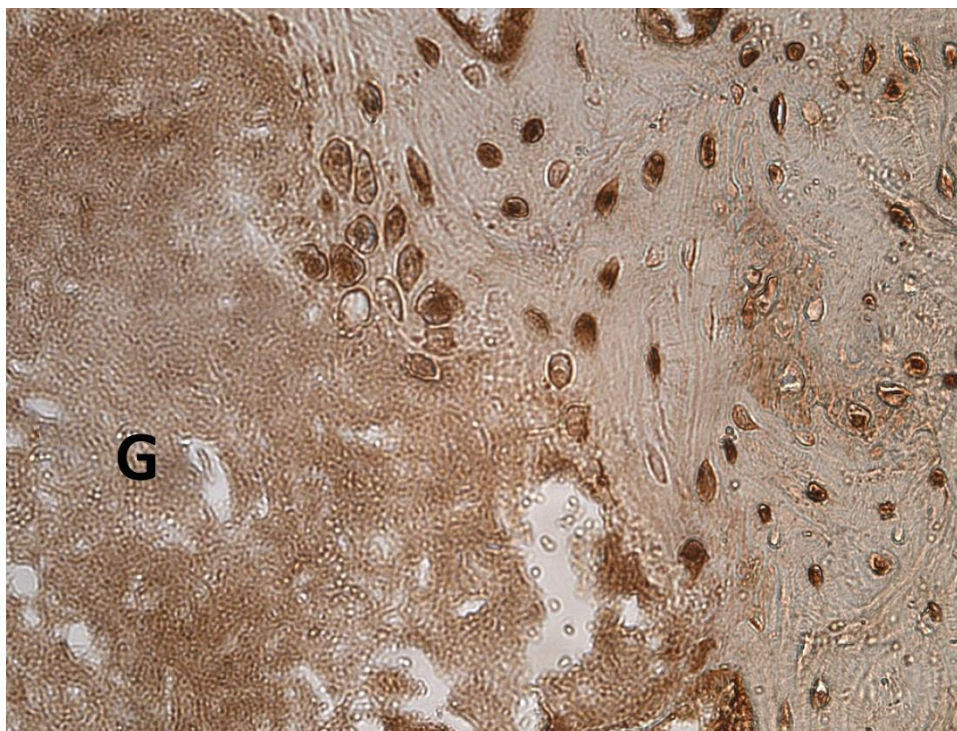
48. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *sham* operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *NFkB-105* pozitīvu kaula šūnu. *NFkB-105 IMH*, × 200



49. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *sham* neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *NFκB-105* pozitīvu kaula šūnu.
NFκB-105 IMH, × 400



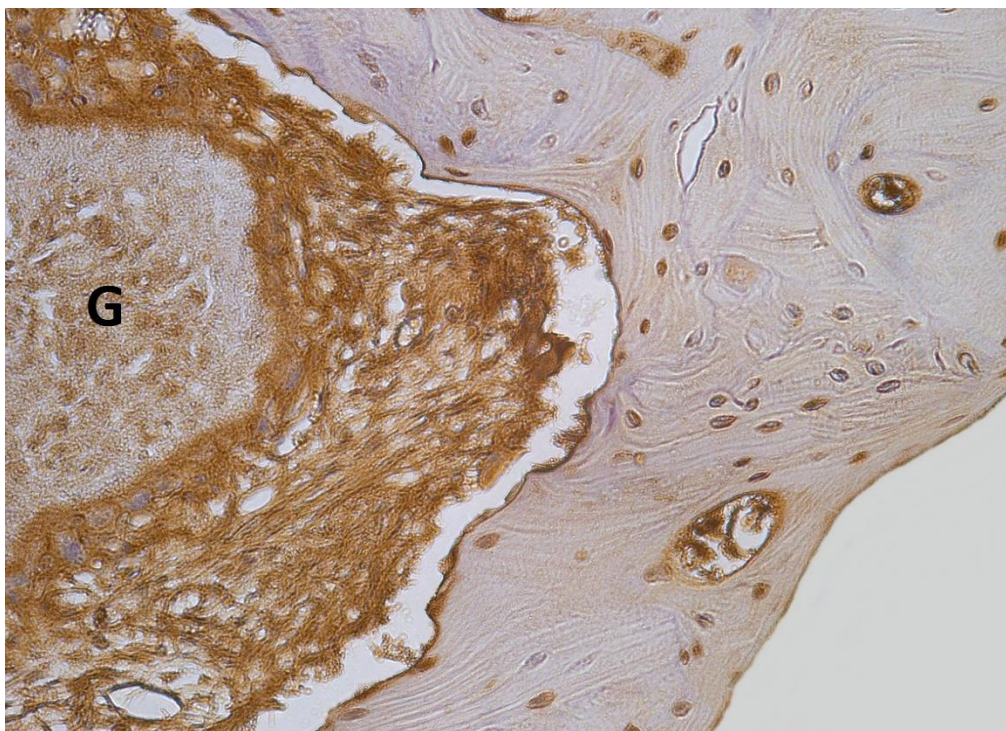
50. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no vesela truša augšstilba kaula, kurā redzams vidēji daudz līdz daudz (++)/+++ *OPG* saturošu šūnu.
OPG IMH, × 400



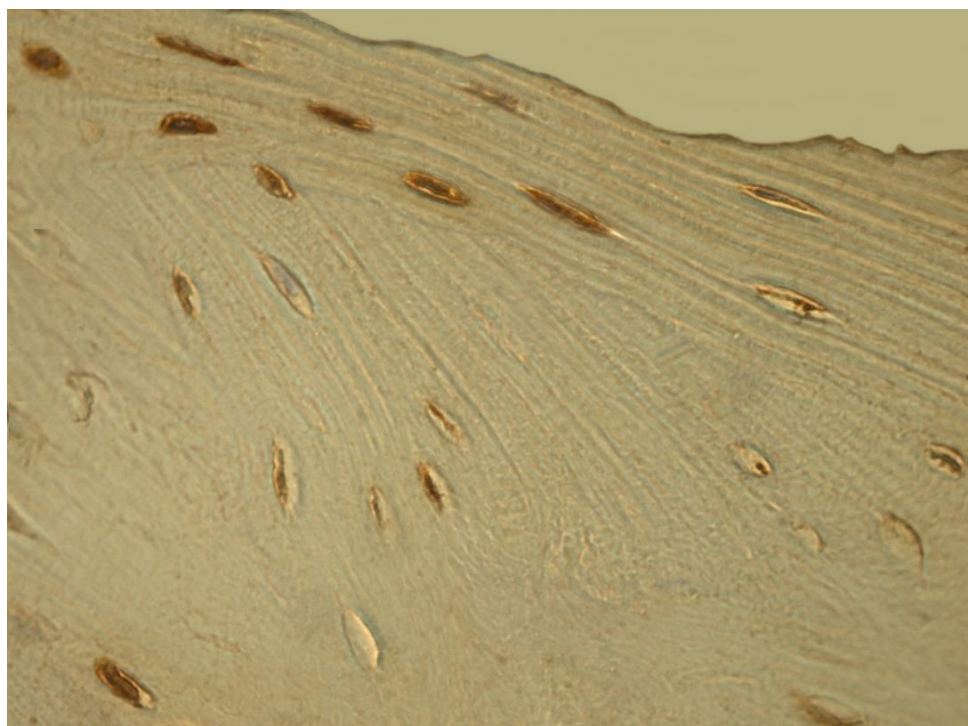
51. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša $Sr-HA_{30}/TCP_{70}$ operētās kājas, kurā redzams daudz (+++) OPG pozitīvu kaula šūnu. G – granula. OPG IMH, $\times 250$



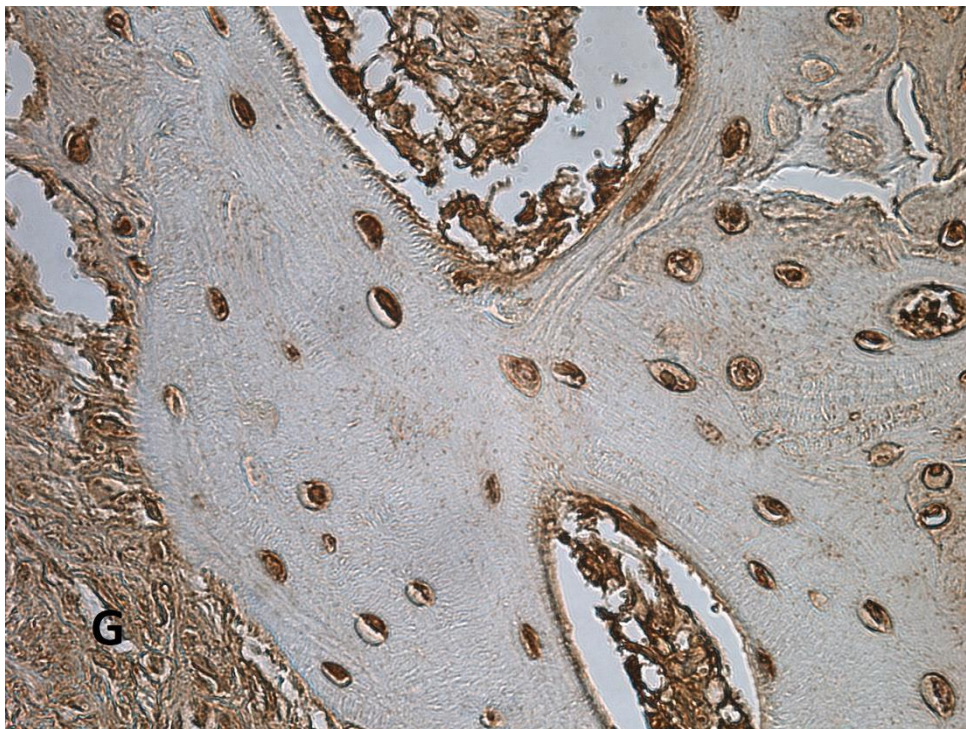
52. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša $Sr-HA_{30}/TCP_{70}$ neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) OPG pozitīvu osteocītu. OPG IMH, $\times 400$



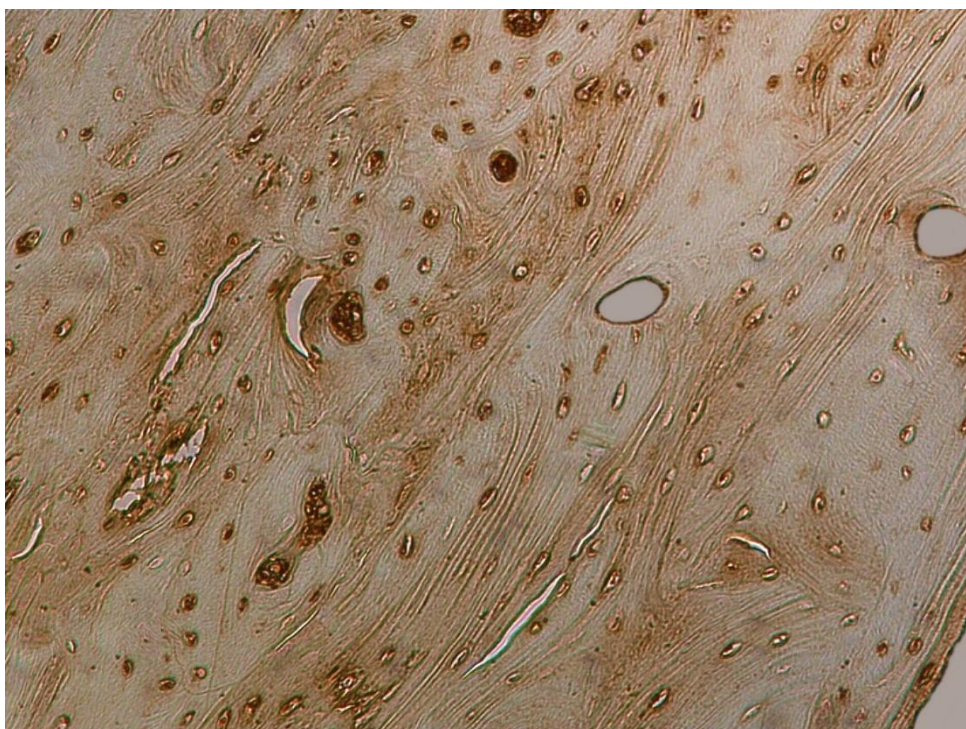
53. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{30}/TCP_{70} operētās kājas, kurā redzamas vidēji daudz (++) OPG pozitīvu kaula šūnu. G – granula. OPG IMH, $\times 250$



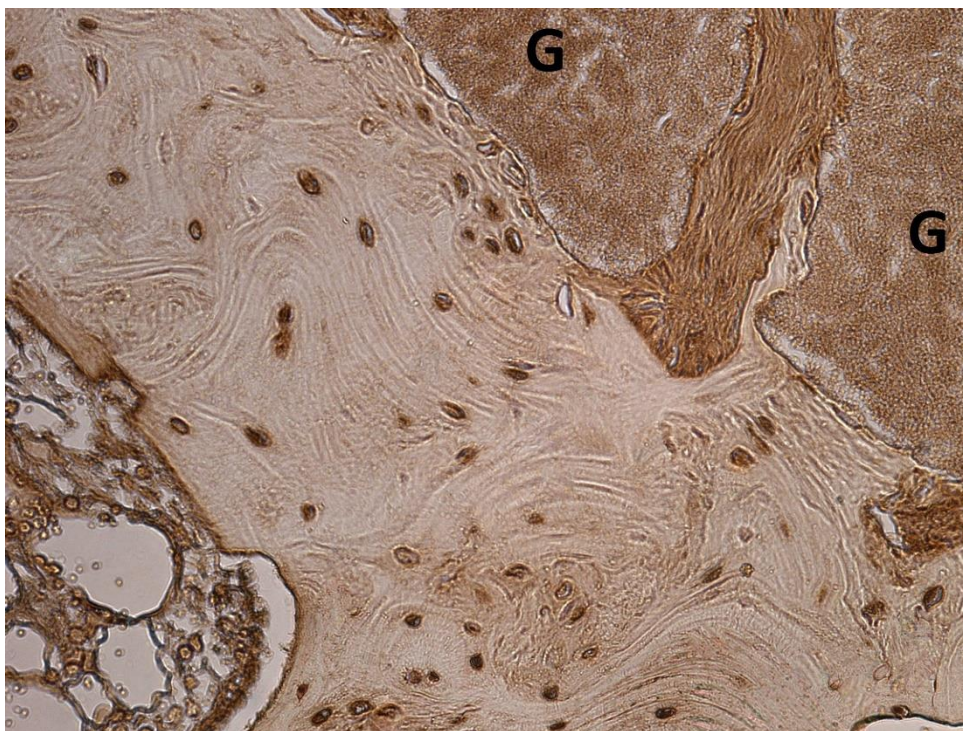
54. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{30}/TCP_{70} neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) OPG pozitīvu kaula šūnu. OPG IMH, $\times 400$



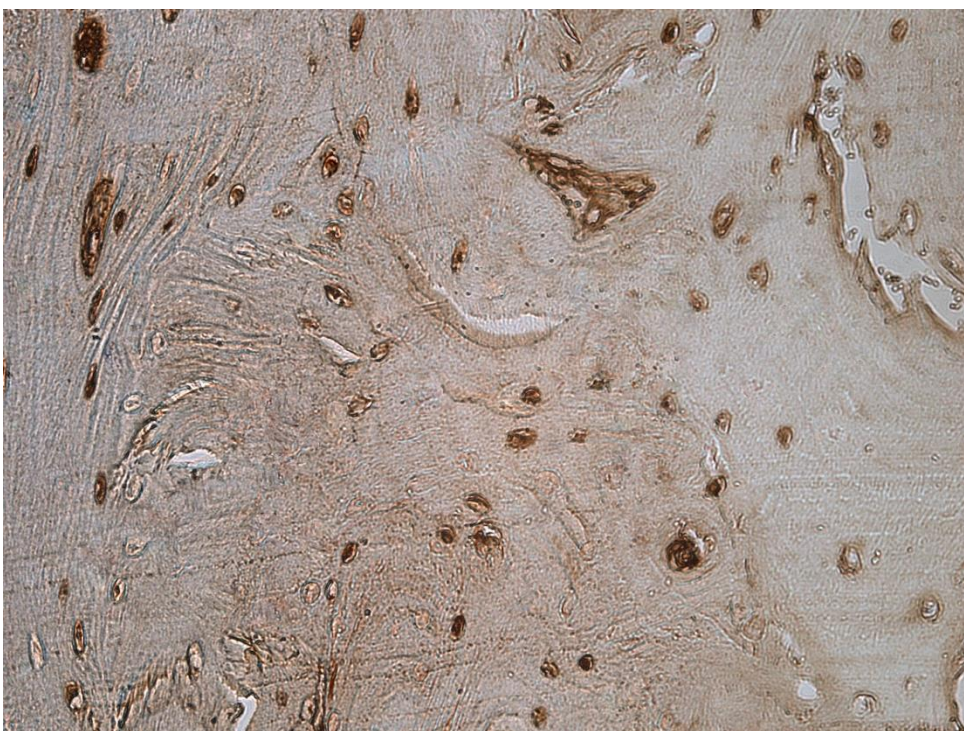
55. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas, kurā redzams daudz (+++) OPG pozitīvu kaula šūnu. G – granula. OPG IMH, × 400



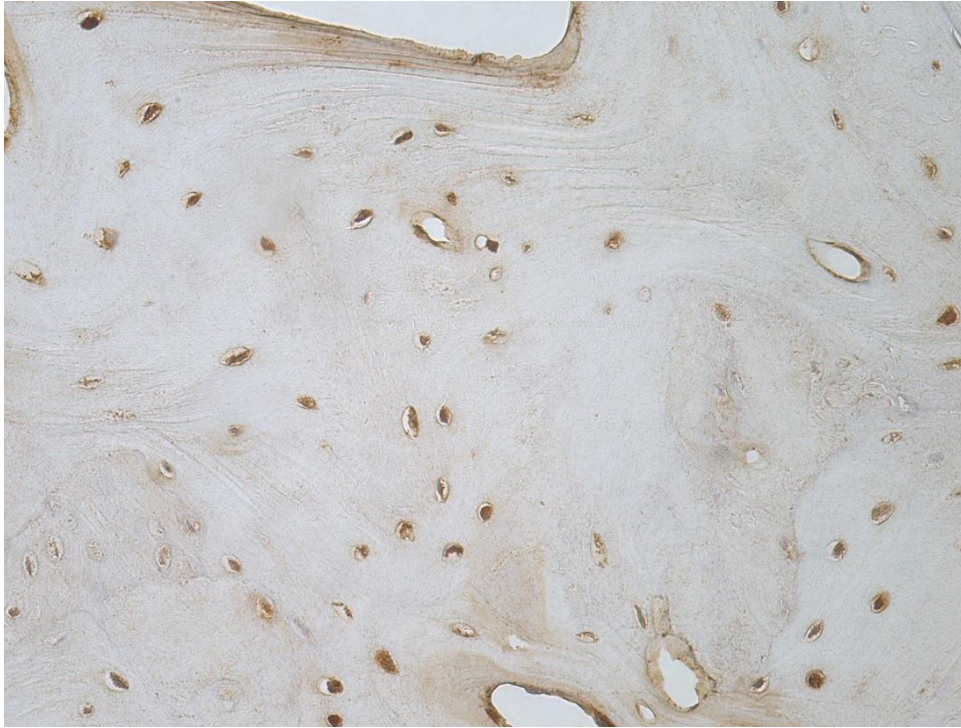
56. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) OPG pozitīvu kaula šūnu. OPG, IMH, × 100



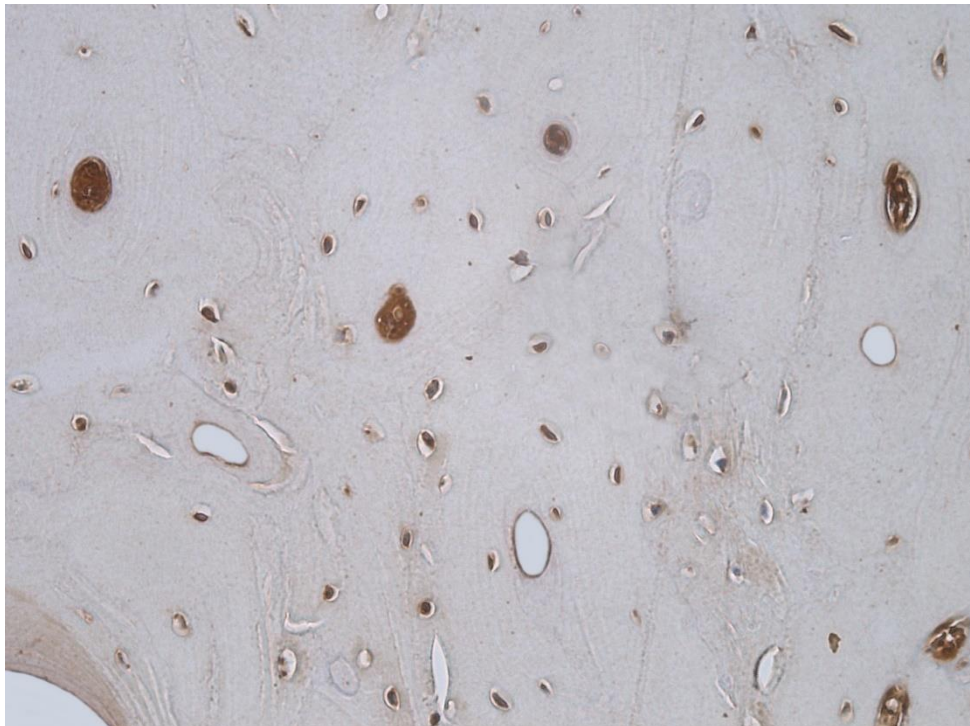
57. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{70}/TCP_{30} operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) OPG pozitīvu kaula šūnu. G – granula. OPG IMH, $\times 200$



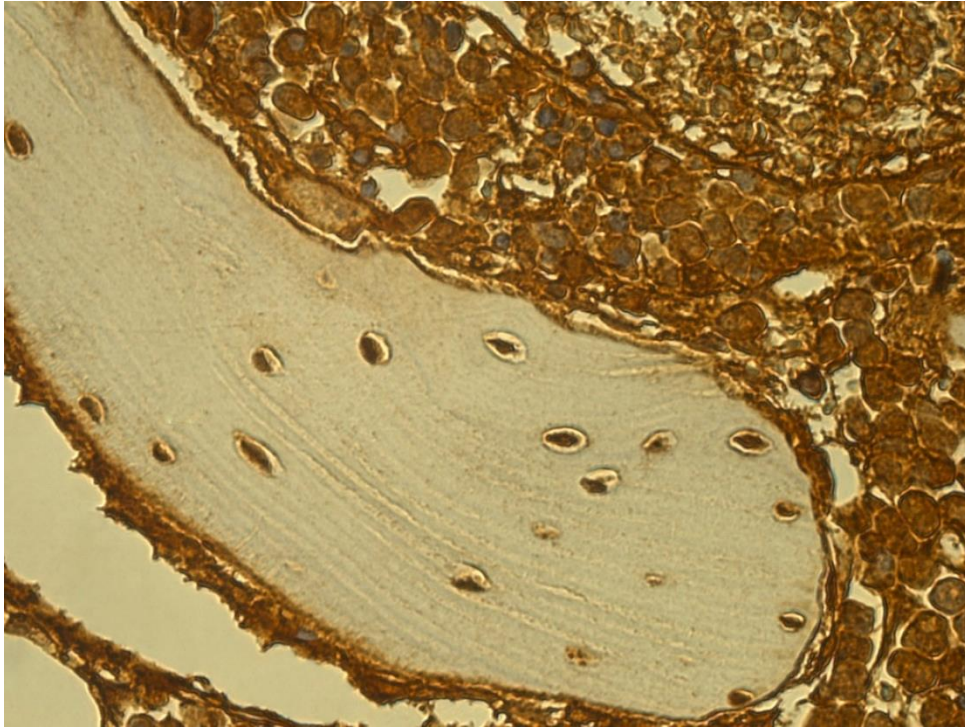
58. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{70}/TCP_{30} neoperētās kājas, kurā redzams maz līdz vidēji daudz (+/++) OPG pozitīvu kaula šūnu. OPG IMH, $\times 200$



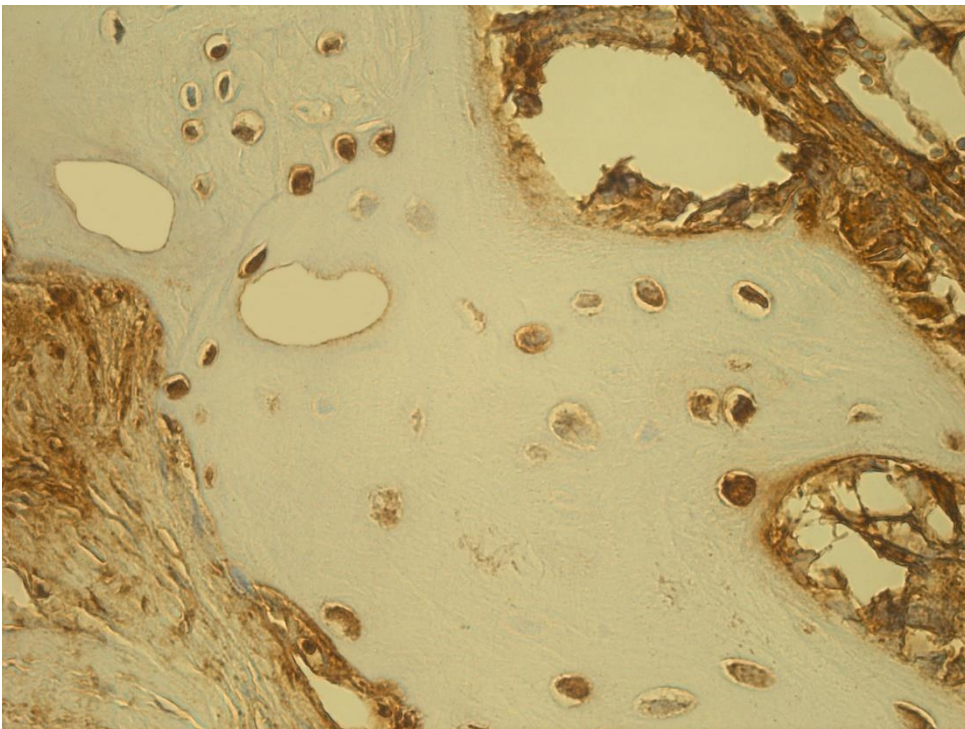
59. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no *sham* operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) OPG pozitīvu kaula šūnu. OPG IMH, × 200



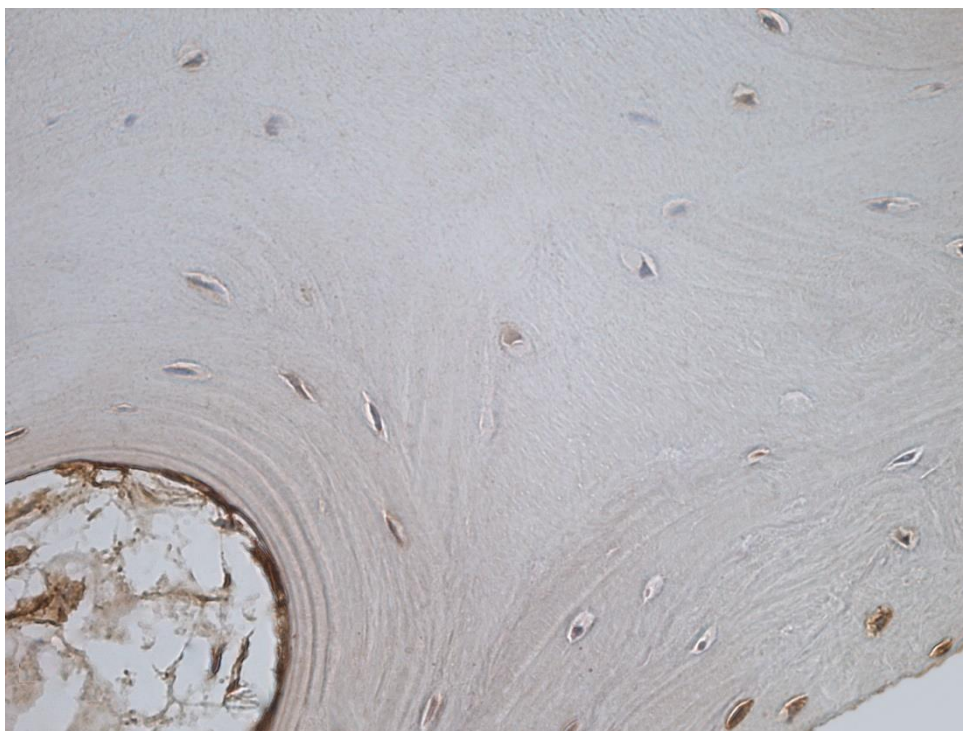
60. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no *sham* neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) OPG saturošu osteocītu. OPG IMH, × 200



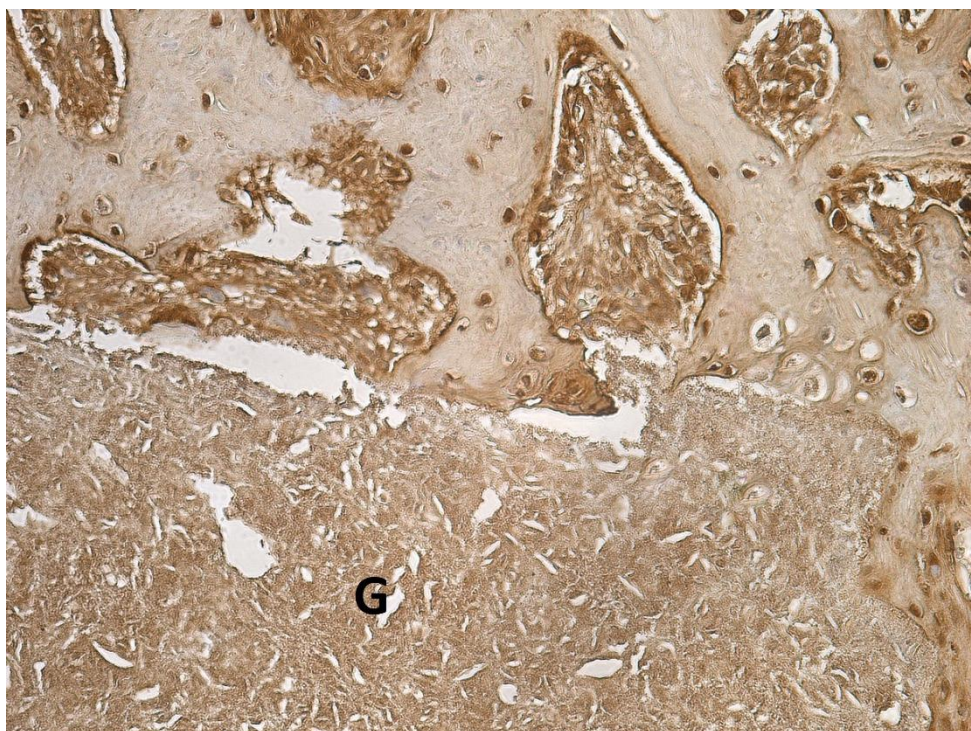
61. mikrofotogrāfija. Adu paraugs no vesela truša augšstilba kaula, kurā redzams vidēji daudz (++) *MMP-2* saturošu šūnu.
MMP-2 IMH, × 400



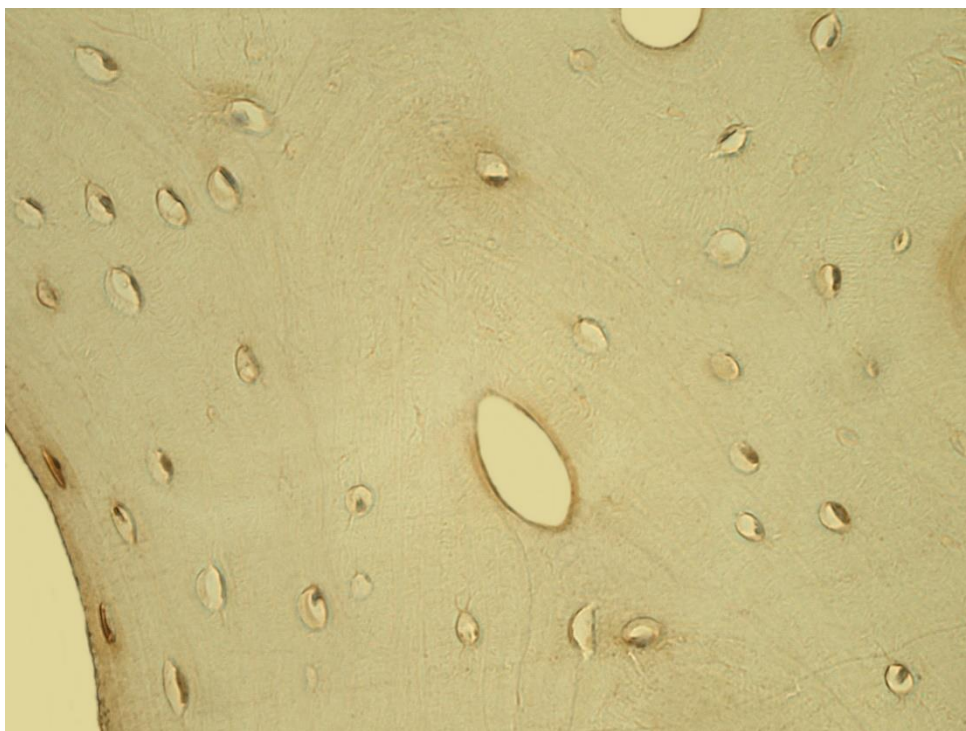
62. mikrofotogrāfija. Adu paraugs no truša *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *MMP-2* pozitīvu kaula šūnu.
MMP-2 IMH, × 400



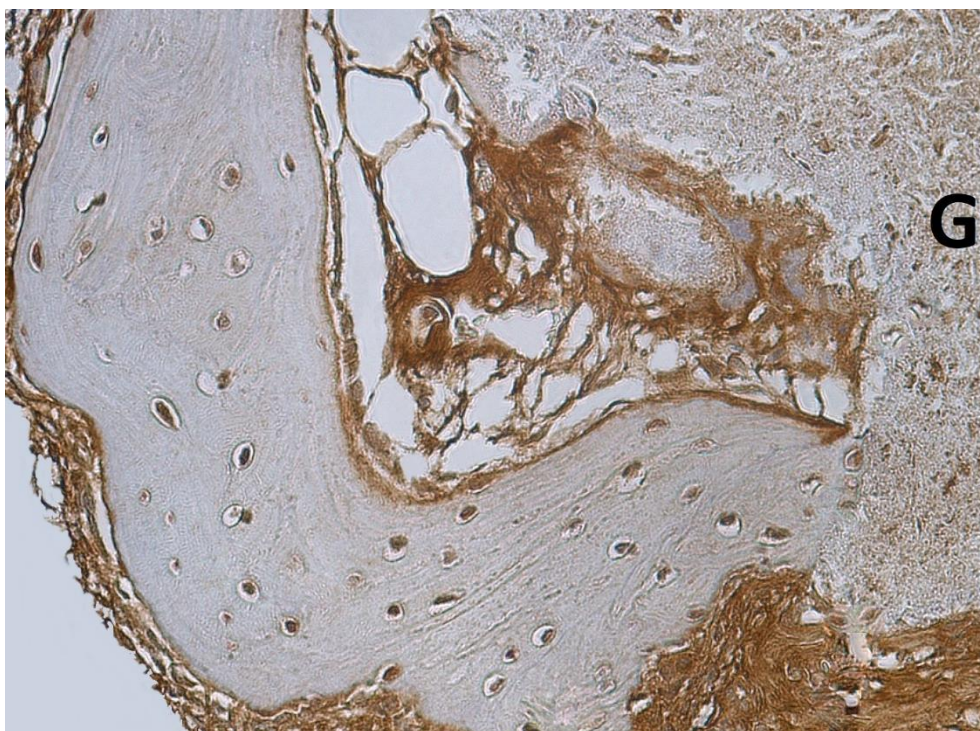
63. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* neoperētās kājas, kurā redzams maz (+) *MMP-2* pozitīvu kaula šūnu.
MMP-2 IMH, × 400



64. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *HA₃₀/TCP₇₀* operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *MMP-2* pozitīvu osteocītu. G – granula. *MMP-2 IMH, × 200*



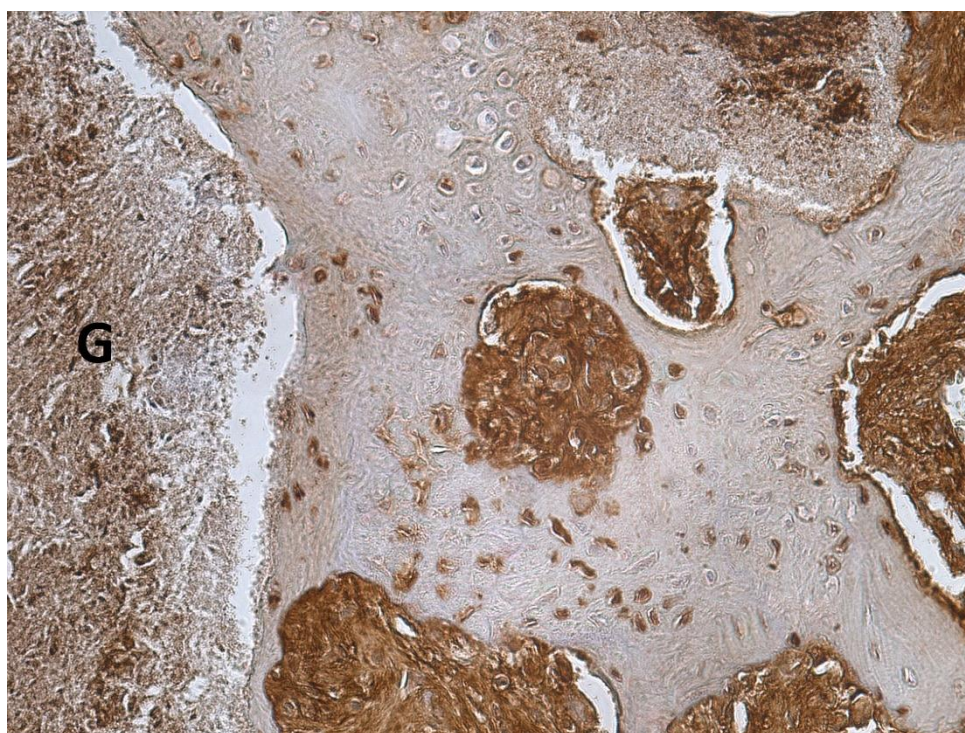
65. mikrofotogrāfija. Adu paraugs no truša HA_{30}/TCP_{70} neoperētās kājas, kurā redzams maz līdz vidēji daudz (+/++) *MMP-2* pozitīvu osteocītu. *MMP-2* IMH, $\times 400$



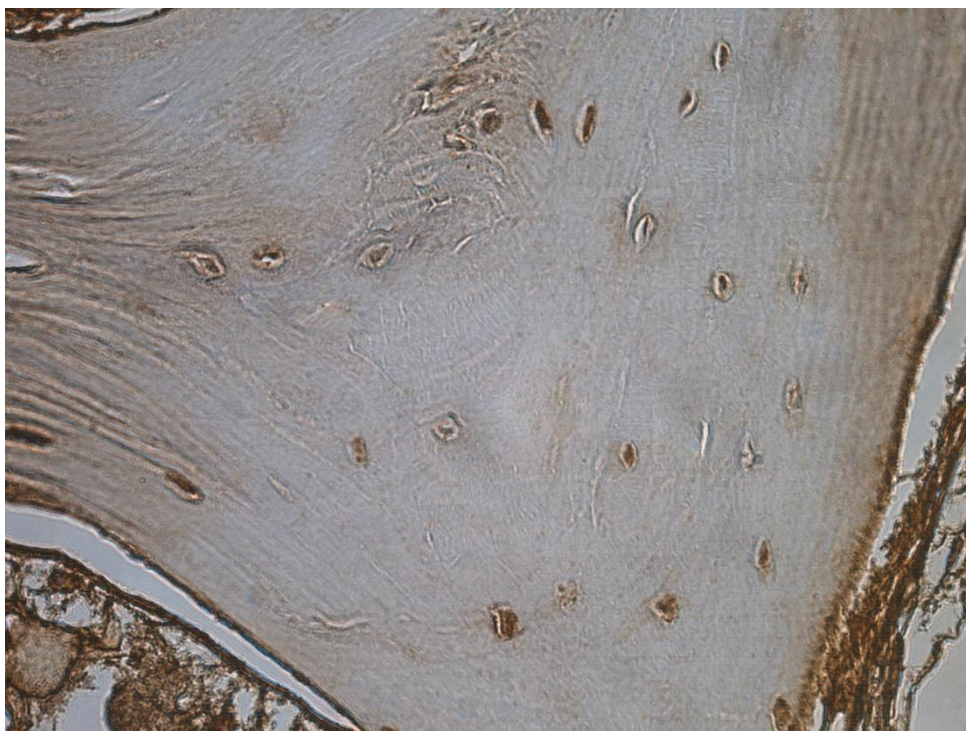
66. mikrofotogrāfija. Adu paraugs no truša $Sr-HA_{70}/TCP_{30}$ operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz līdz daudz (++/++) *MMP-2* pozitīvu kaula šūnu. G – granula. *MMP-2* IMH, $\times 200$



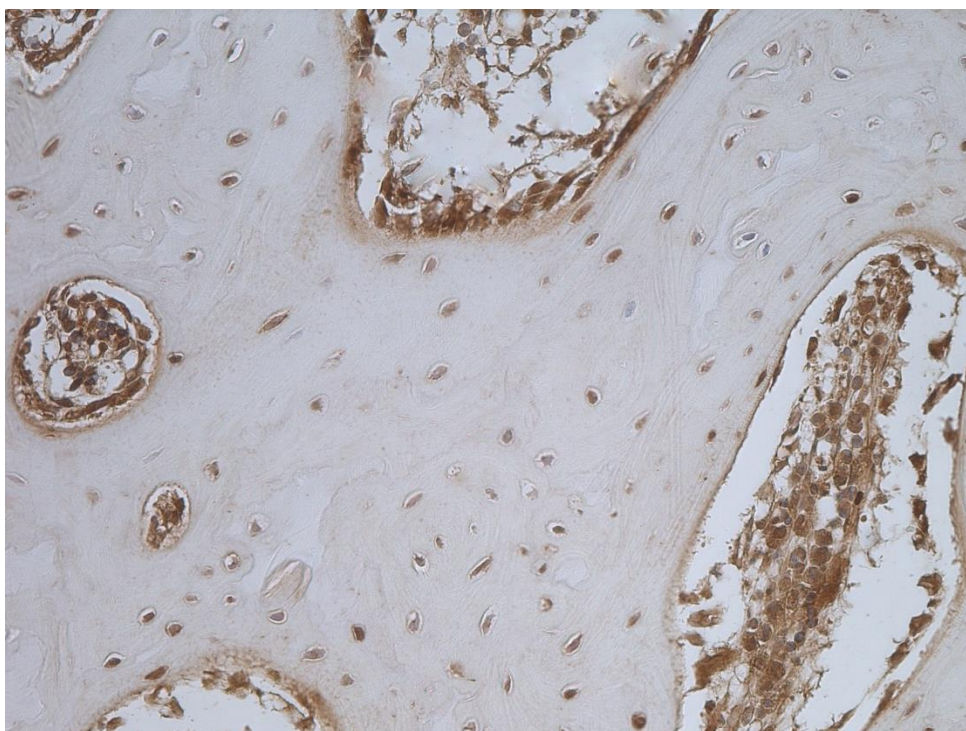
67. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša $Sr-HA_{70}/TCP_{30}$ neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *MMP-2* pozitīvu kaula šūnu. *MMP-2* IMH, $\times 400$



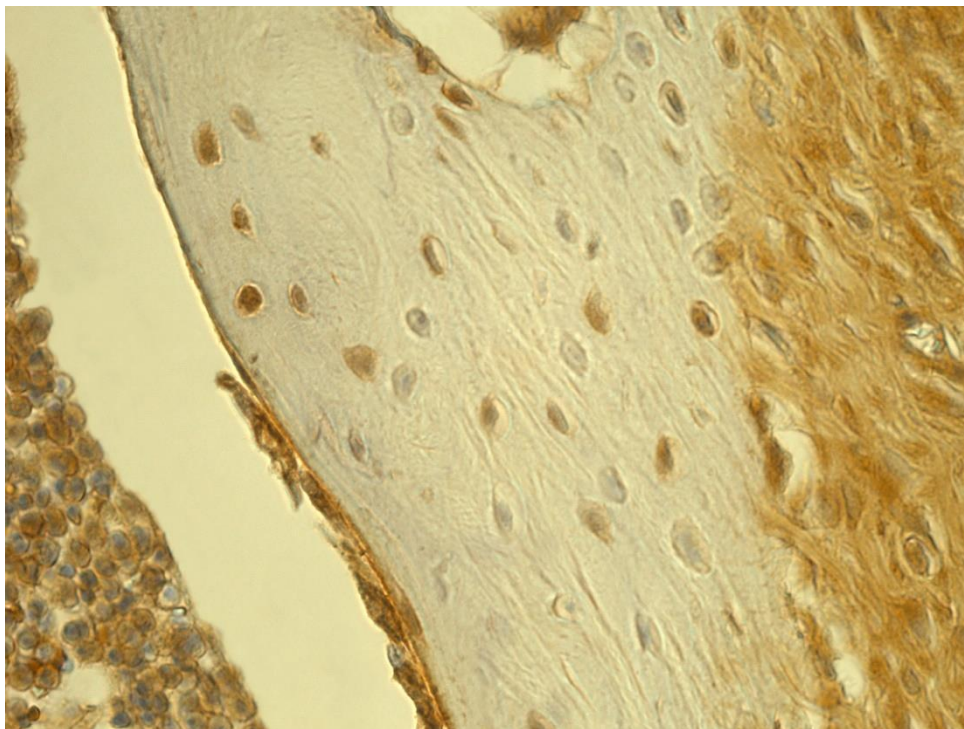
68. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{70}/TCP_{30} operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *MMP-2* pozitīvu osteocītu. G – granula. *MMP-2* IMH, $\times 200$



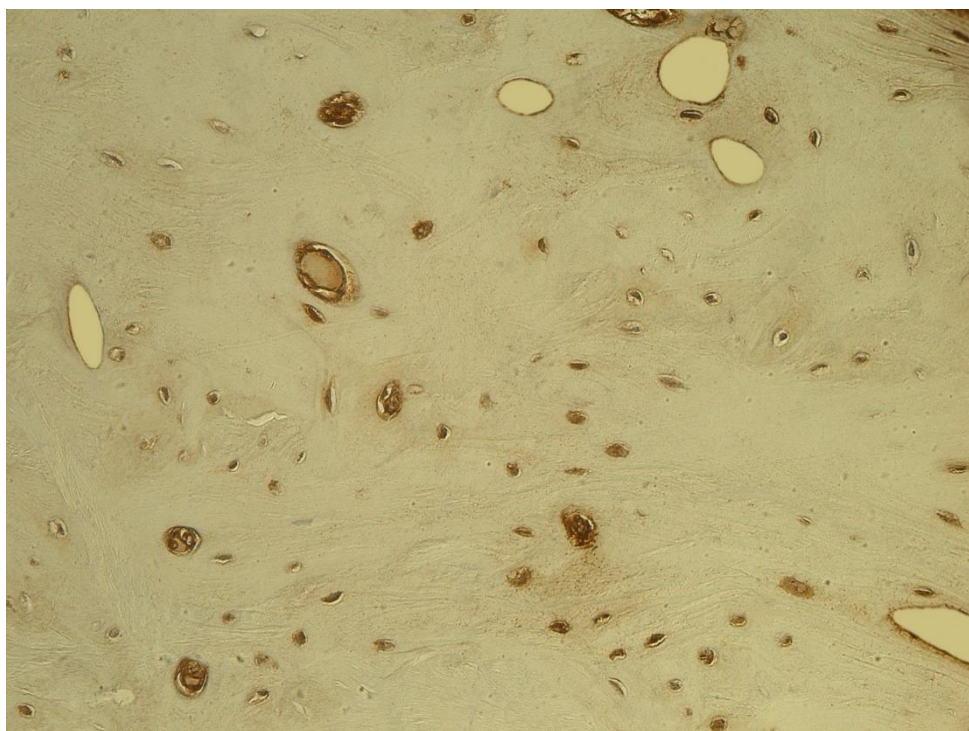
69. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *HA₇₀/TCP₃₀* neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *MMP-2* pozitīvu osteocītu.
MMP-2 IMH, × 400



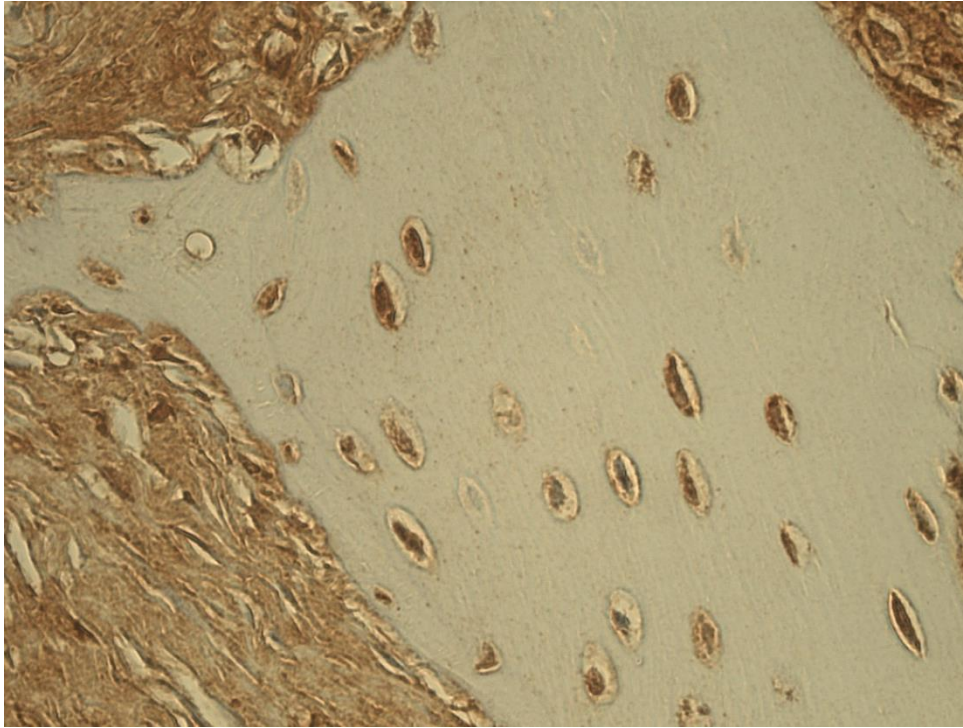
70. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *sham* operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *MMP-2* pozitīvu kaula šūnu.
MMP-2 IMH, × 200



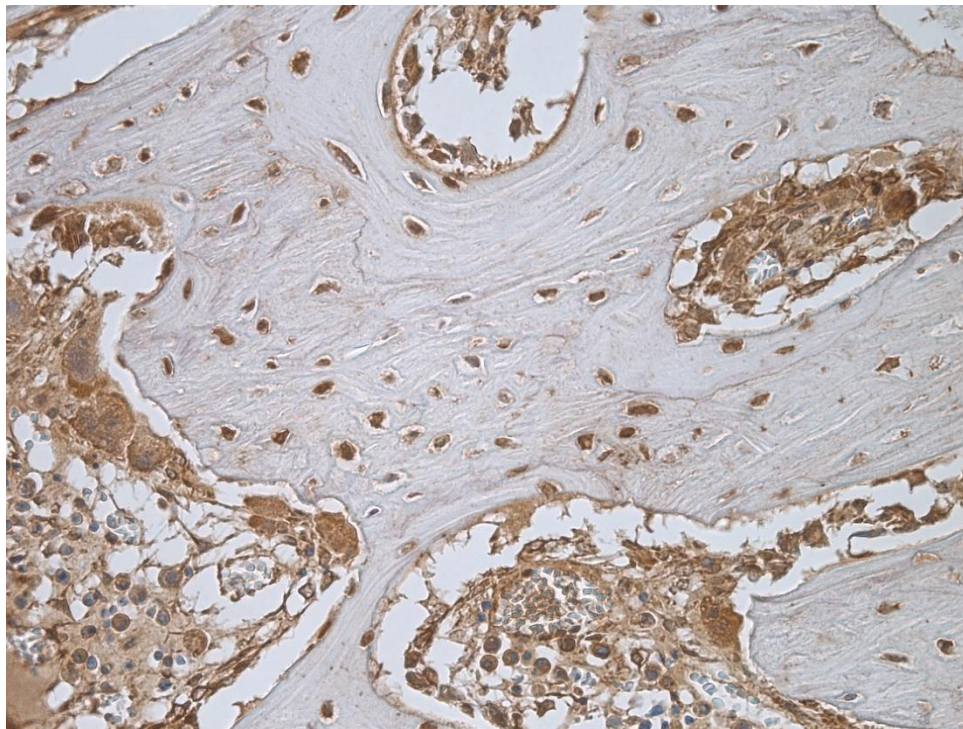
71. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *sham* neoperētās kājas, kurā redzams maz līdz vidēji daudz (+/++) *MMP-2* saturošu osteocītu.
MMP-2 IMH, × 400



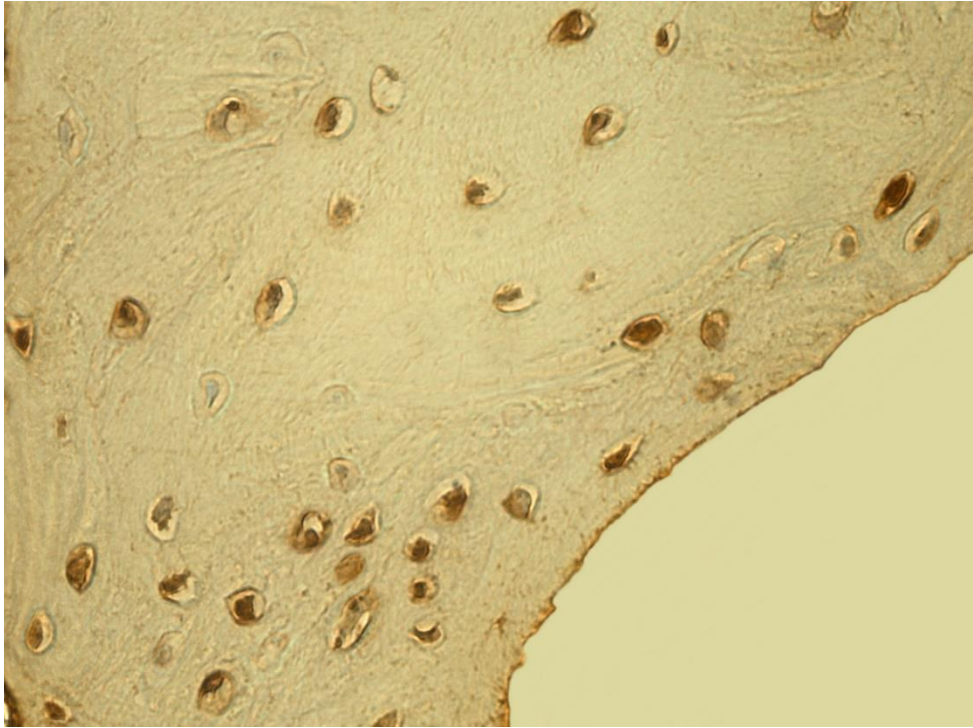
72. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no vesela truša augšstilba kaula, kurā redzams vidēji daudz (++) *TIMP-2* saturošu šūnu. *TIMP-2 IMH, × 400*



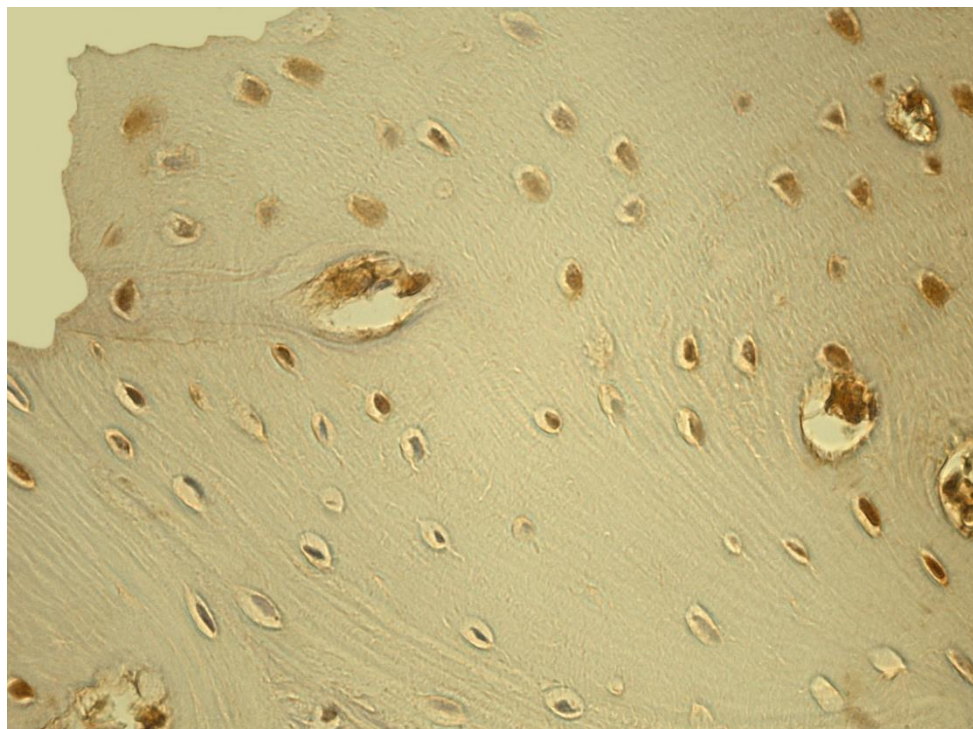
73. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša $Sr-HA_{30}/TCP_{70}$ operētās kājas, kurā redzams daudz (+++) *TIMP-2* pozitīvu osteocītu.
TIMP-2 IMH, $\times 400$



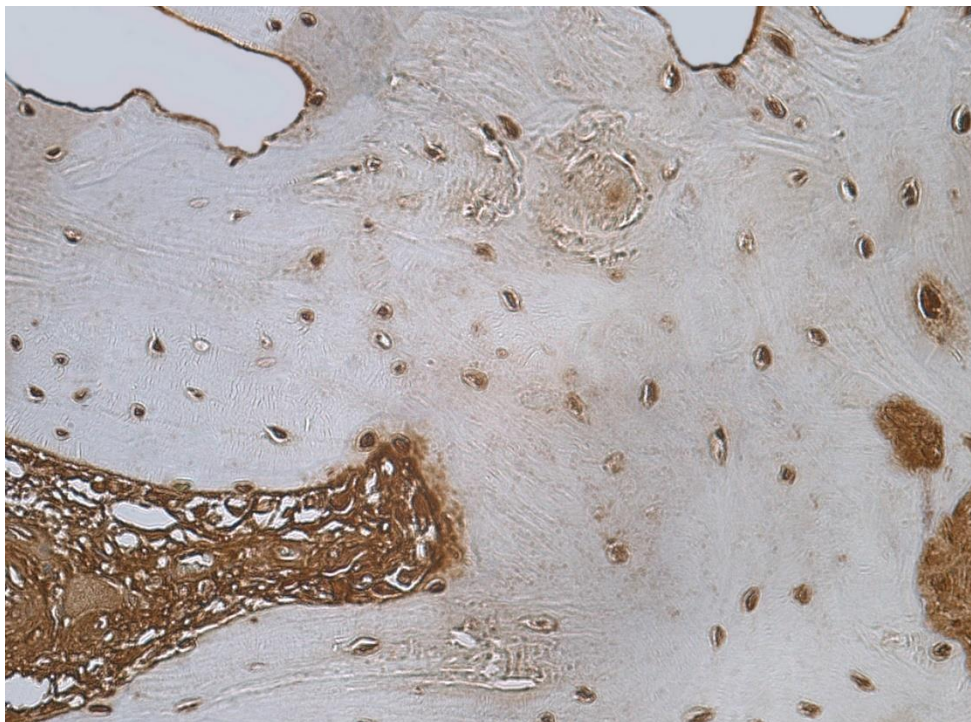
74. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša $Sr-HA_{30}/TCP_{70}$ neoperētās kājas, kurā redzams daudz (+++) *TIMP-2* pozitīvu kaula šūnu.
TIMP-2 IMH, $\times 250$



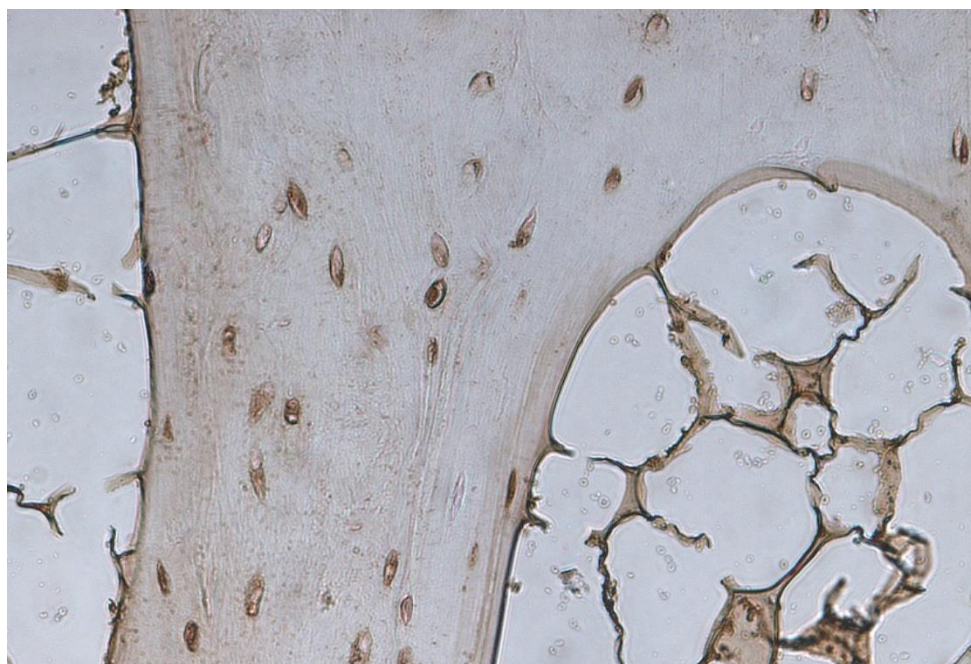
75. mikrofotogrāfija. Adu paraugs no truša HA_{30}/TCP_{70} operētās kājas, kurā redzams daudz (+++) *TIMP-2* pozitīvu kaula šūnu. *TIMP-2 IMH*, $\times 400$



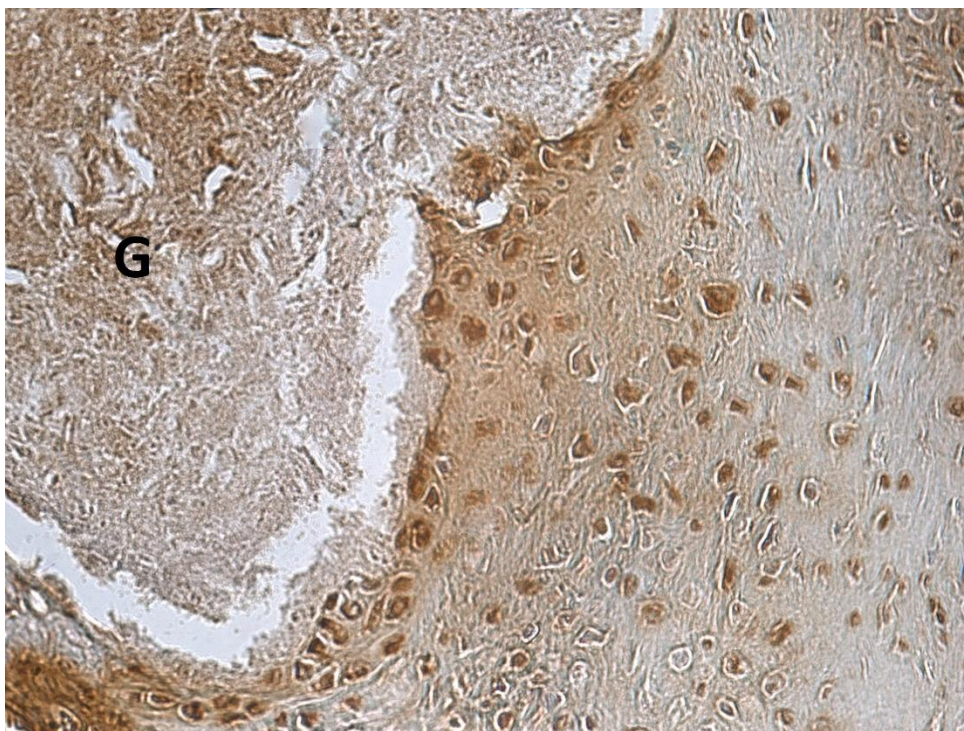
76. mikrofotogrāfija. Adu paraugs no truša HA_{30}/TCP_{70} neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz līdz daudz (++/+++) *TIMP-2* saturošu osteocītu. *TIMP-2 IMH*, $\times 400$



77. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša $Sr-HA_{70}/TCP_{30}$ operētās kājas, kurā redzams daudz (+++) *TIMP-2* pozitīvu šūnu.
TIMP-2 IMH, × 200



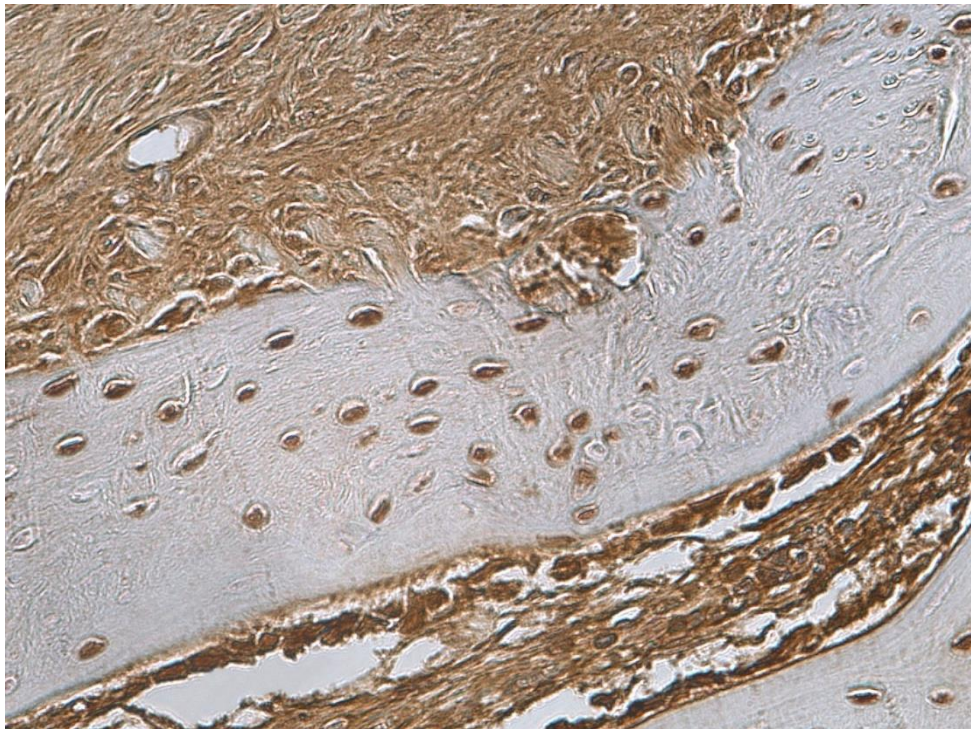
78. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša $Sr-HA_{70}/TCP_{30}$ neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *TIMP-2* pozitīvu kaula šūnu.
TIMP-2 IMH, × 250



79. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{70}/TCP_{30} operētās kājas, kurā redzams daudz (+++) *TIMP-2* pozitīvu kaula šūnu. G – granula. *TIMP-2* IMH, $\times 200$



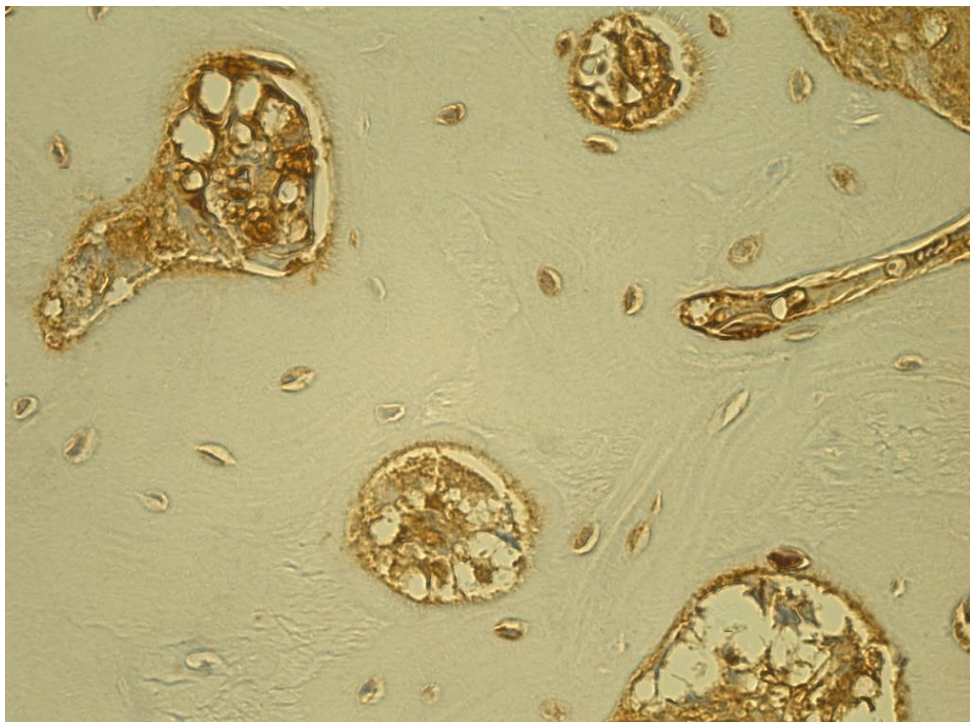
80. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{70}/TCP_{30} neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *TIMP-2* saturošu osteocītu. *TIMP-2* IMH, $\times 250$



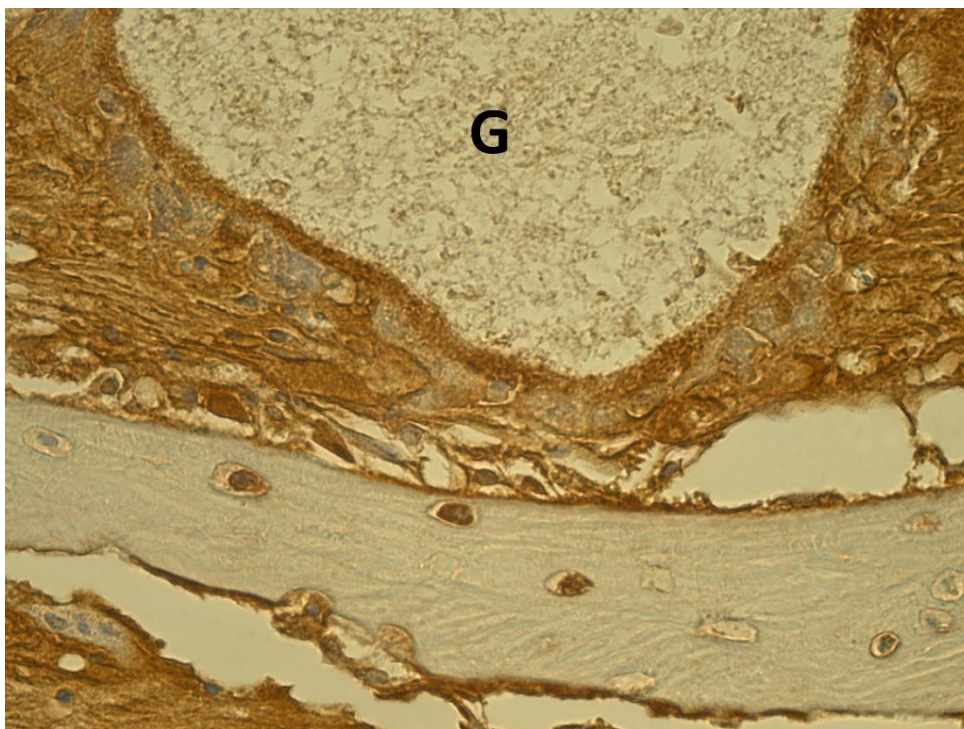
81. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *sham* operētās kājas, kurā redzams daudz (+++) *TIMP-2* pozitīvu kaula šūnu.
TIMP-2 IMH, × 250



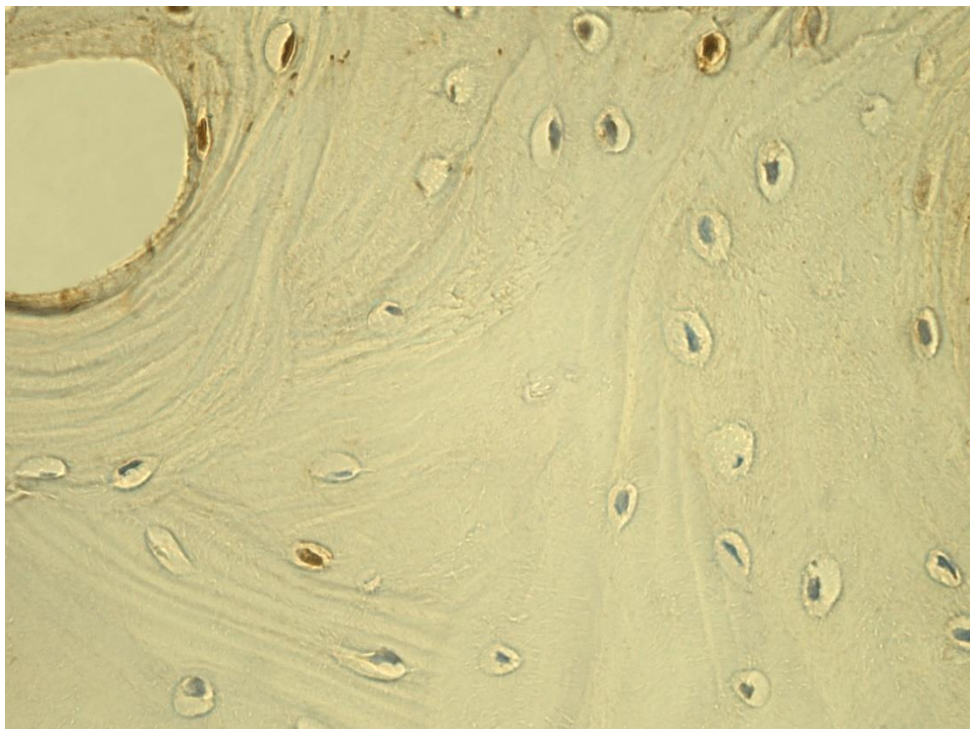
82. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *sham* neoperētās kājas, kurā redzams daudz (+++) *TIMP-2* pozitīvu kaula šūnu.
TIMP-2 IMH, × 400



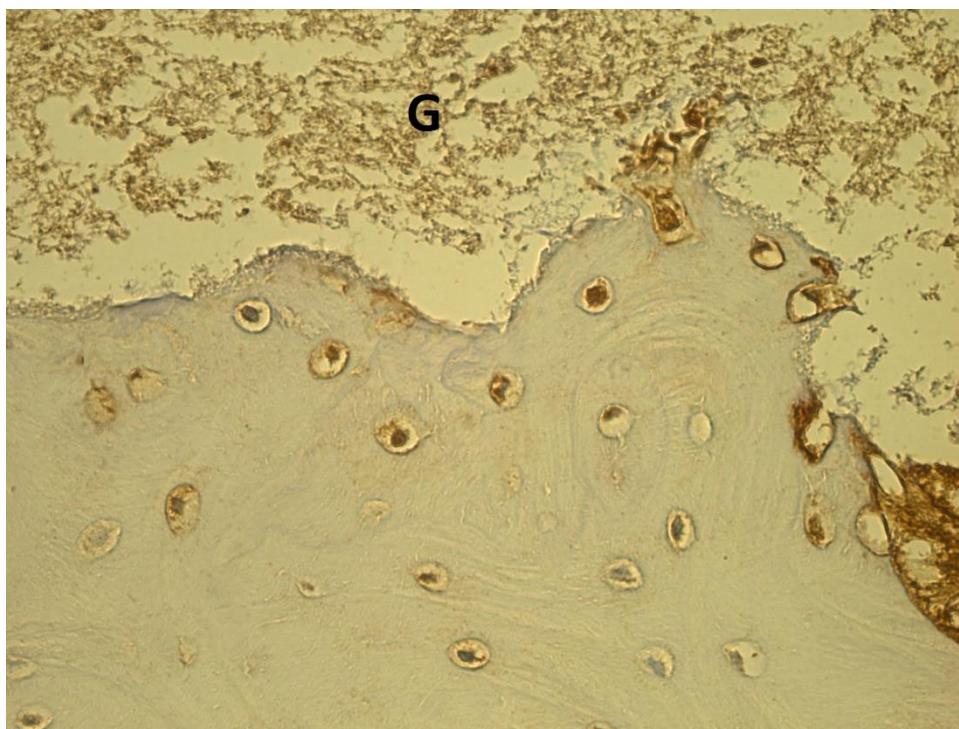
83. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no vesela truša augšstilba kaula, kurā redzamas dažas pozitīvas (0/+) *Il-1* saturošas šūnas. *Il-1* IMH, × 400



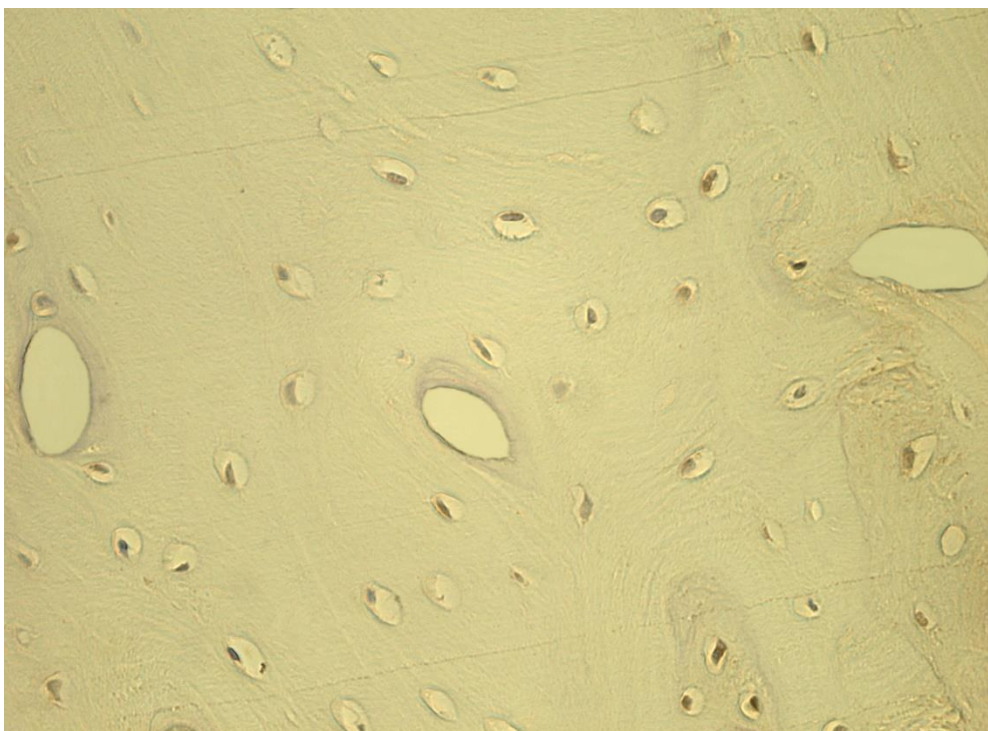
84. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* operētās kājas, kurā redzams maz (+) *Il-1* pozitīvu kaula šūnu. G – granula. *Il-1* IMH, × 400



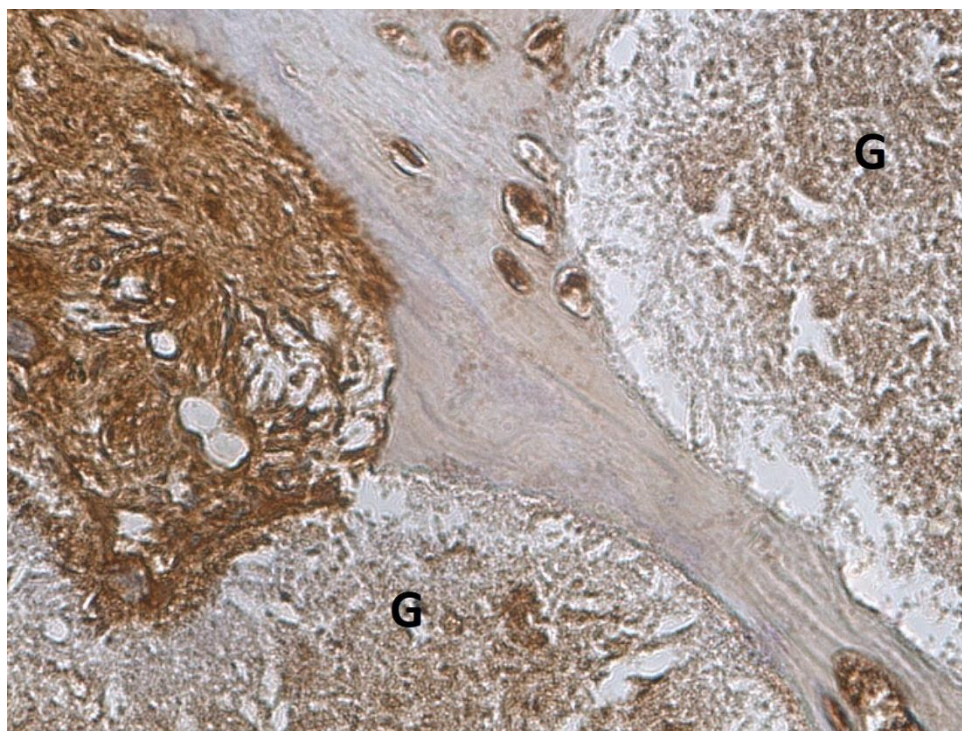
85. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša $Sr-HA_{30}/TCP_{70}$ neoperētās kājas, kurā redzamas tikai dažas (0/+) *IL-1* pozitīvas kaula šūnas.
IL-1 IMH, × 400



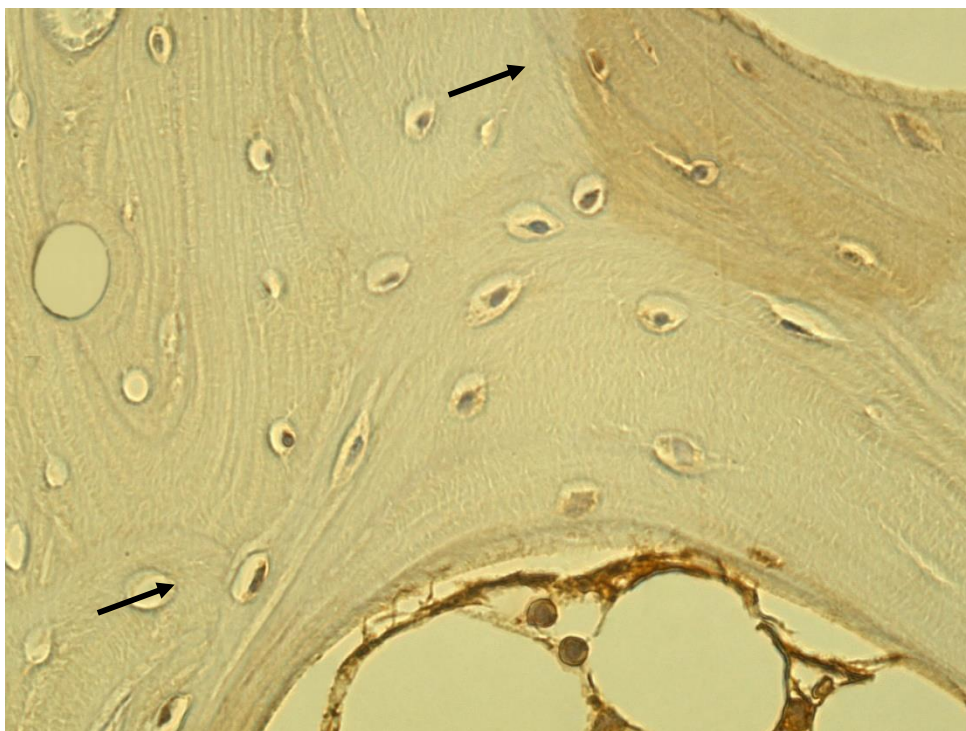
86. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{30}/TCP_{70} operētās kājas, kurā redzams maz (+) *IL-1* pozitīvu kaula šūnu. G – granula.
IL-1 IMH, × 400



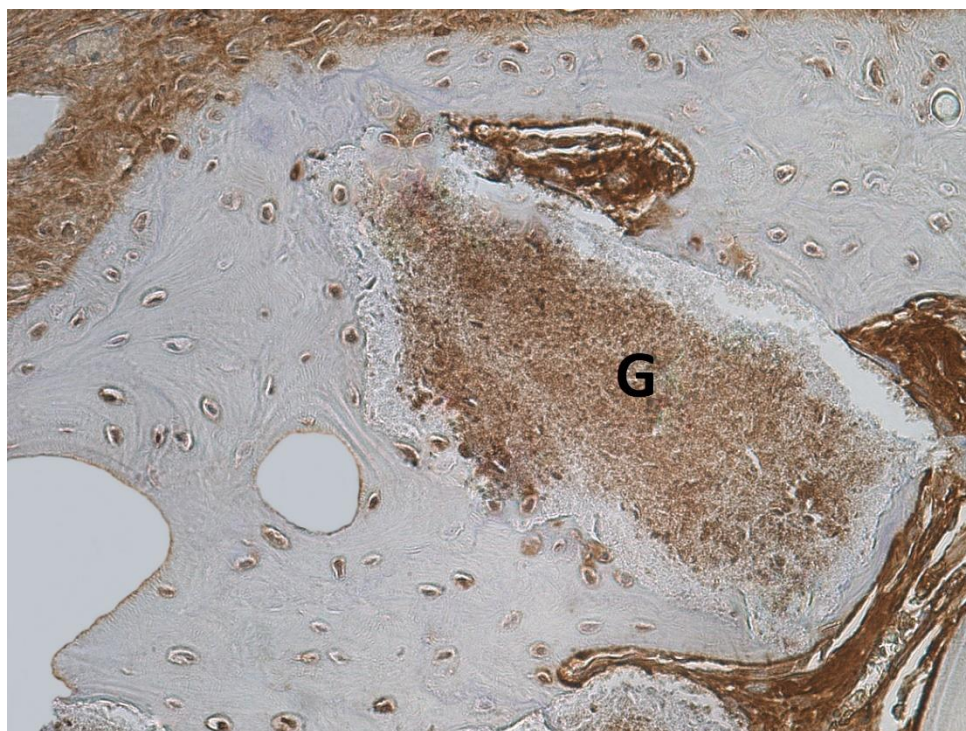
87. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{30}/TCP_{70} neoperētās kājas, kurā redzamas tikai dažas (0/+) *Il-1* pozitīvas kaula šūnas. *Il-1 IMH*, $\times 400$



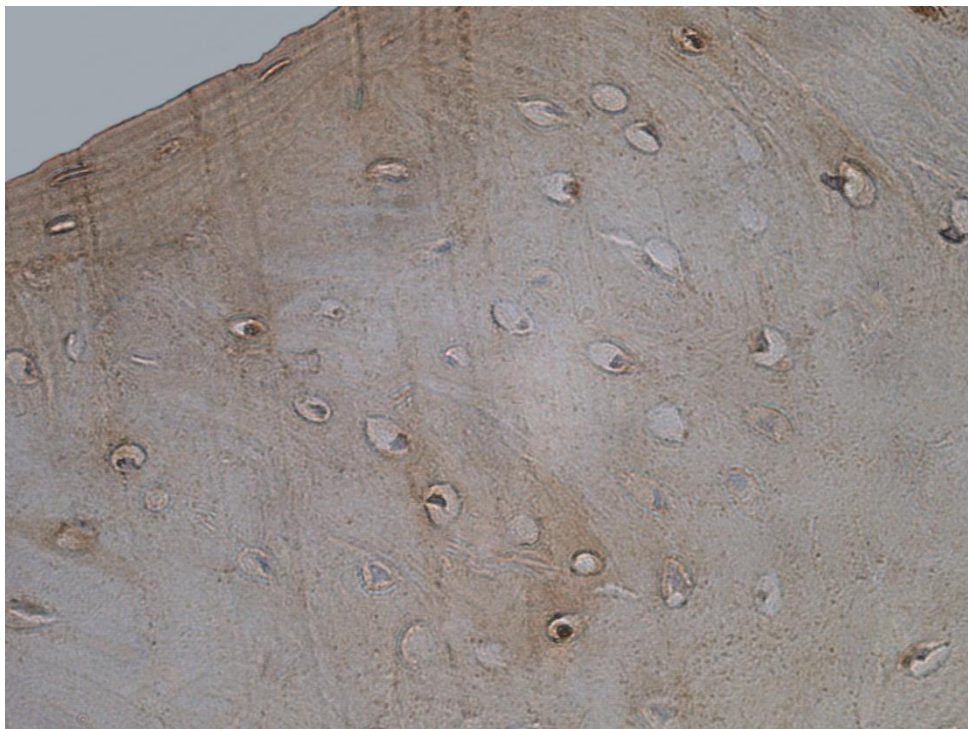
88. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša $Sr-HA_{70}/TCP_{30}$ operētās kājas, kurā redzams maz līdz vidēji daudz (+/++) *Il-1* pozitīvu kaula šūnu. G – granula. *Il-1 IMH*, $\times 400$



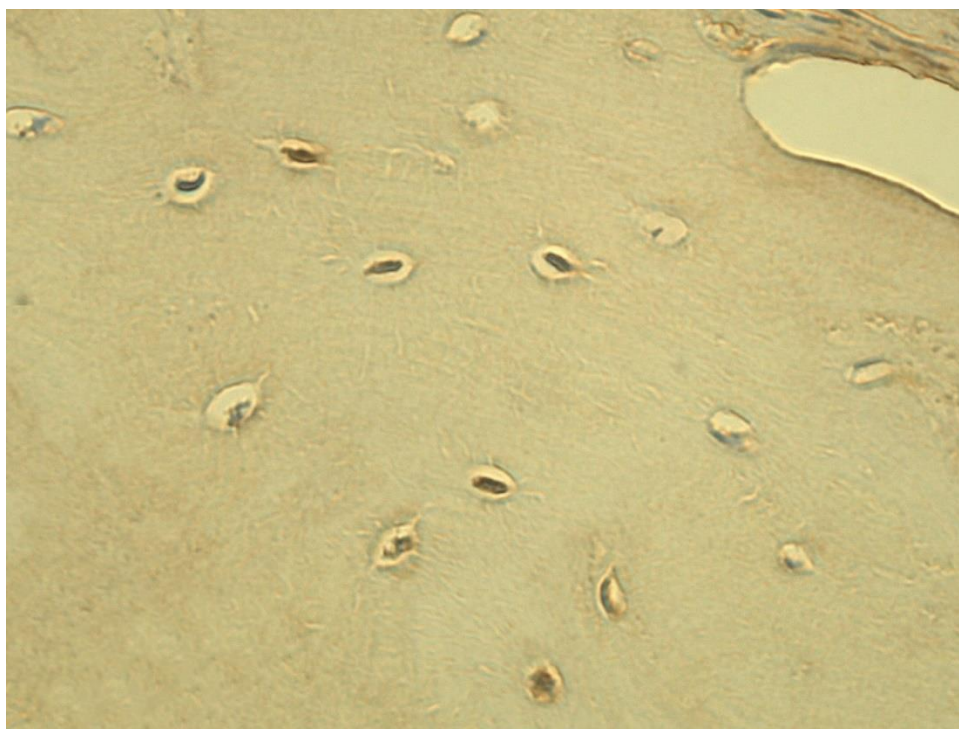
89. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša $Sr-HA_{70}/TCP_{30}$ neoperētās kājas, kurā redzamas tikai dažas (0/+) *IL-1* pozitīvas kaula šūnas (bultiņas). *IL-1* IMH, $\times 400$



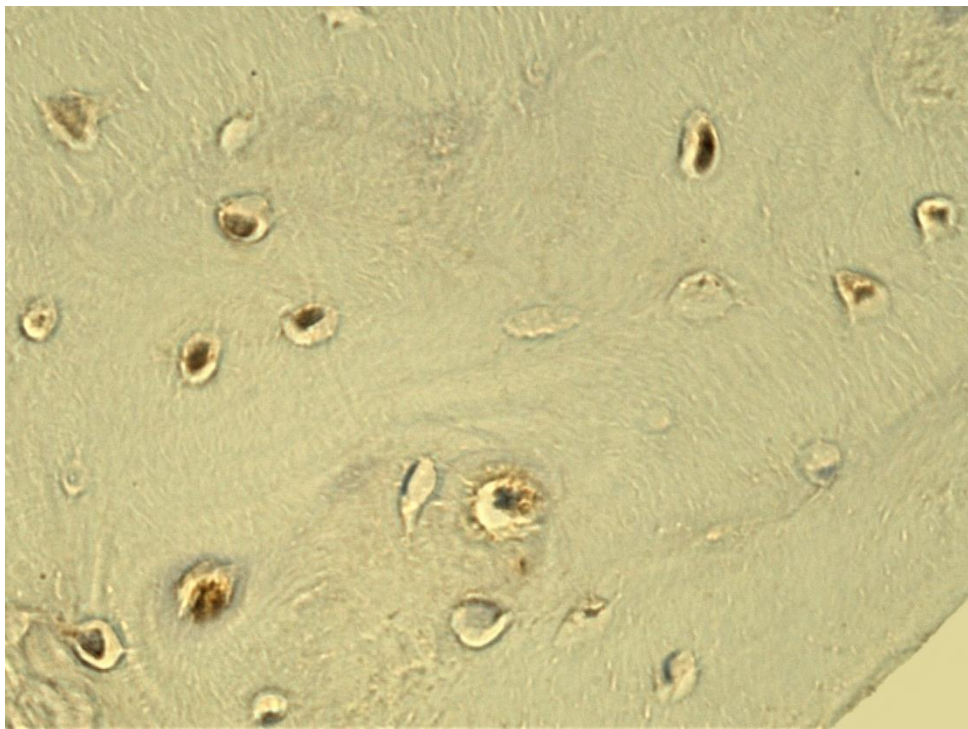
90. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{70}/TCP_{30} operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *IL-1* pozitīvu kaula šūnu. G – granula. *IL-1* IMH, $\times 250$



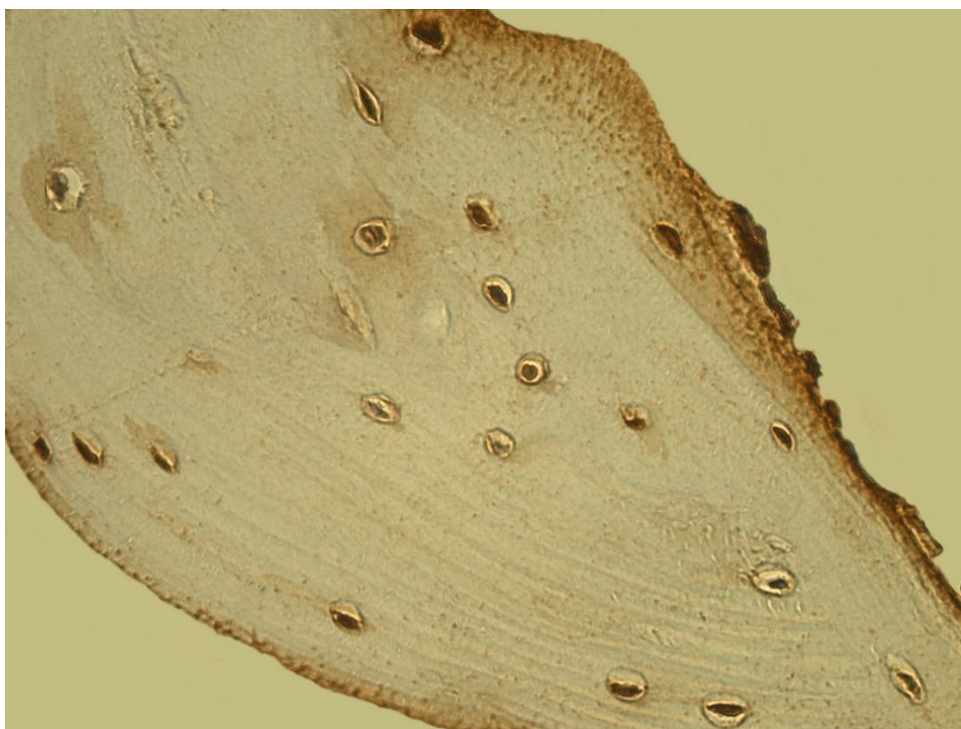
91. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *HA₇₀/TCP₃₀* neoperētās kājas, kurā redzamas tikai dažas (0/+) *IL-1* pozitīvas kaula šūnas. *IL-1 IMH, × 400*



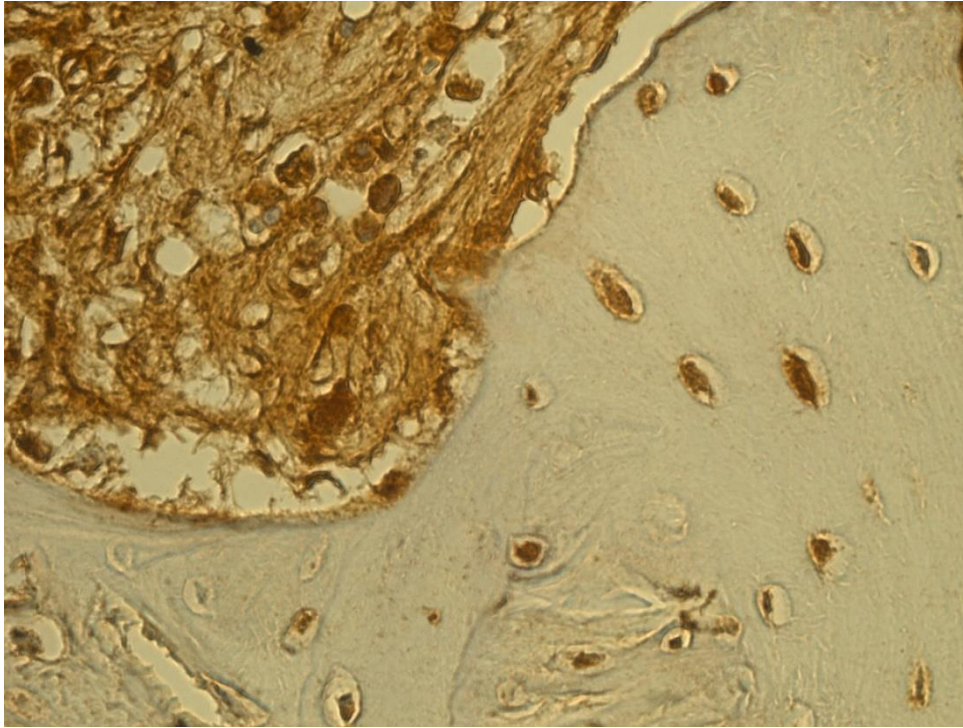
92. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *sham* operētās kājas, kurā redzams maz (+) *IL-1* pozitīvu kaula šūnu. *IL-1 IMH, × 400*



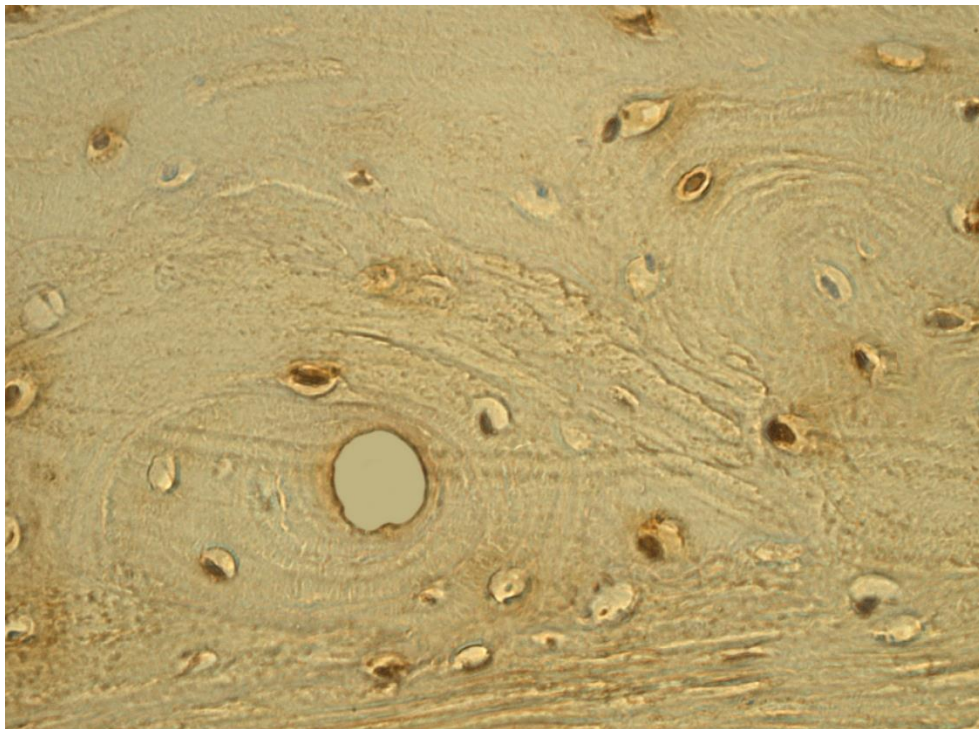
93. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *sham* neoperētās kājas, kurā redzams maz (+) *IL-1* pozitīvu kaula šūnu. *IL-1 IMH*, × 400



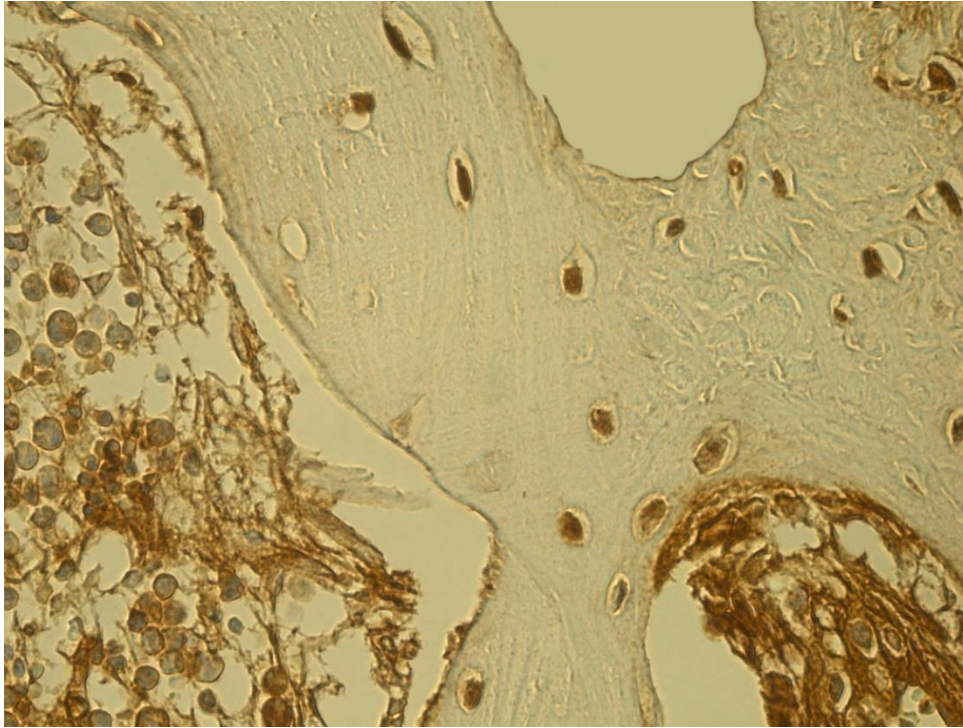
94. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no vesela truša augšstilba kaula, kurā redzams vidēji daudz (++) *IL-10* saturošu kaula šūnu. *IL-10 IMH*, × 400



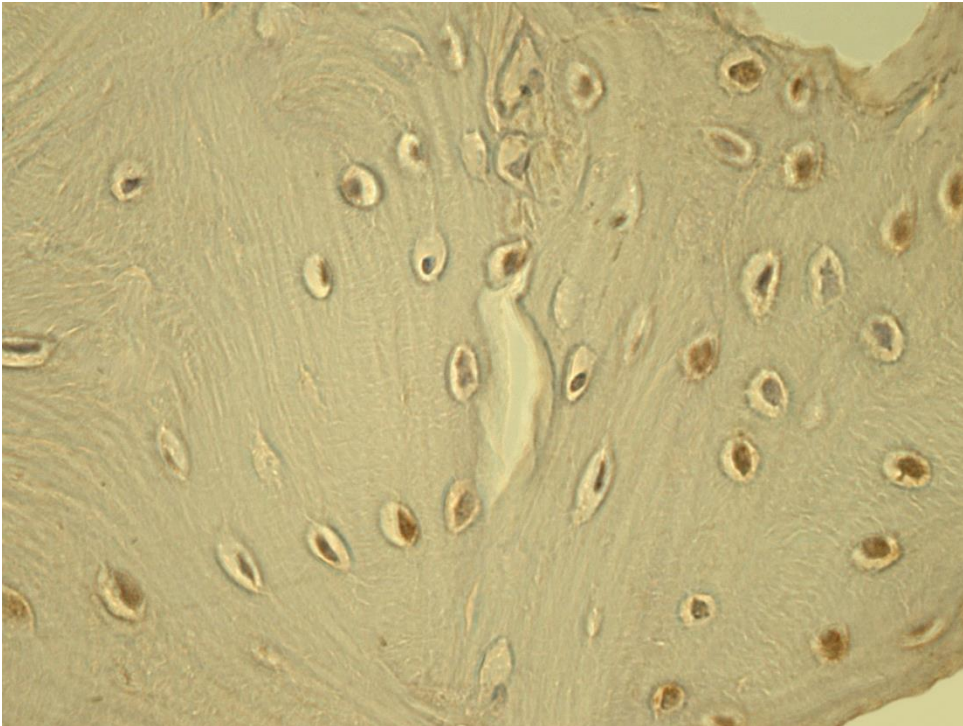
95. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *IL-10* pozitīvu kaula šūnu. *IL-10 IMH, × 400*



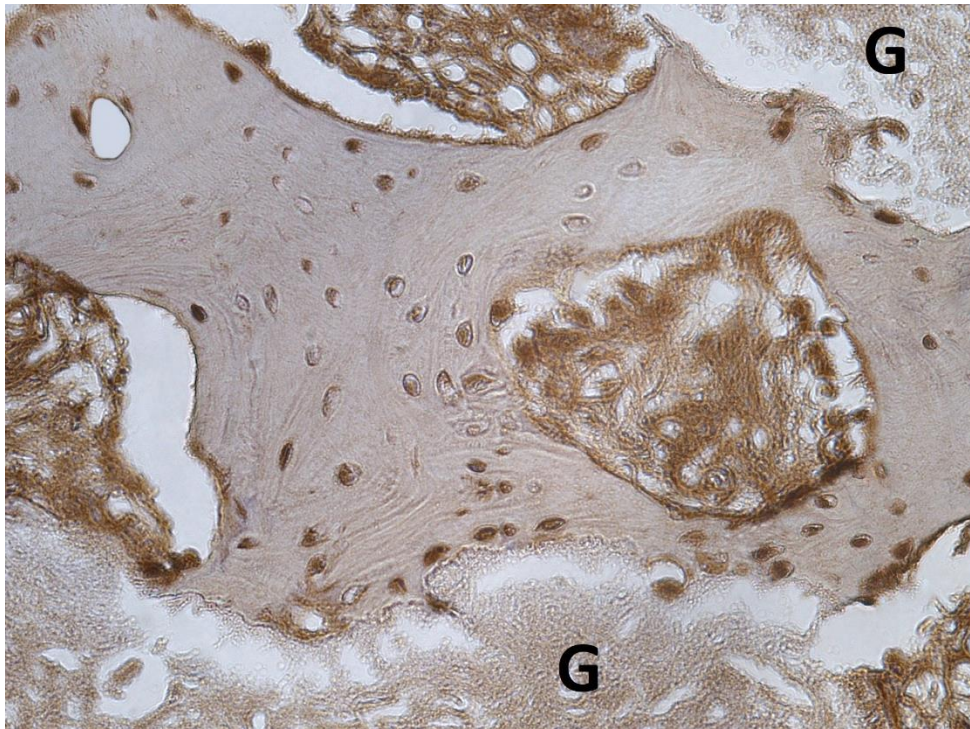
96. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *Sr-HA₃₀/TCP₇₀* neoperētās kājas, kurā redzams maz līdz vidēji daudz (+/++) *IL-10* pozitīvu kaula šūnu. *IL-10 IMH, × 400*



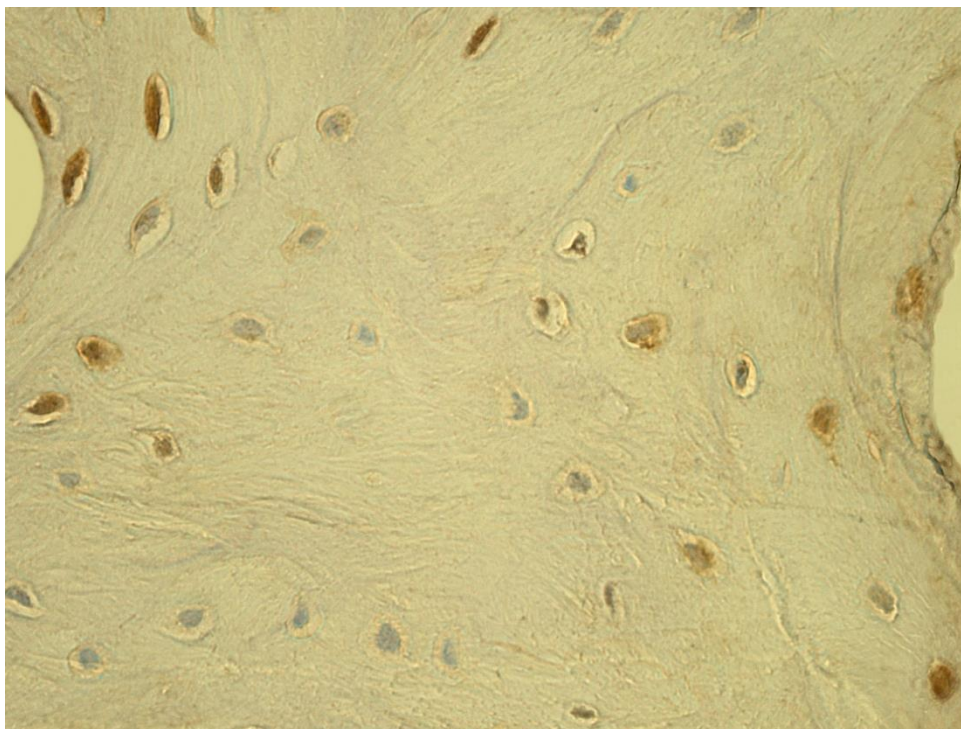
97. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{30}/TCP_{70} operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *IL-10* pozitīvu kaula šūnu.
IL-10 IMH, × 400



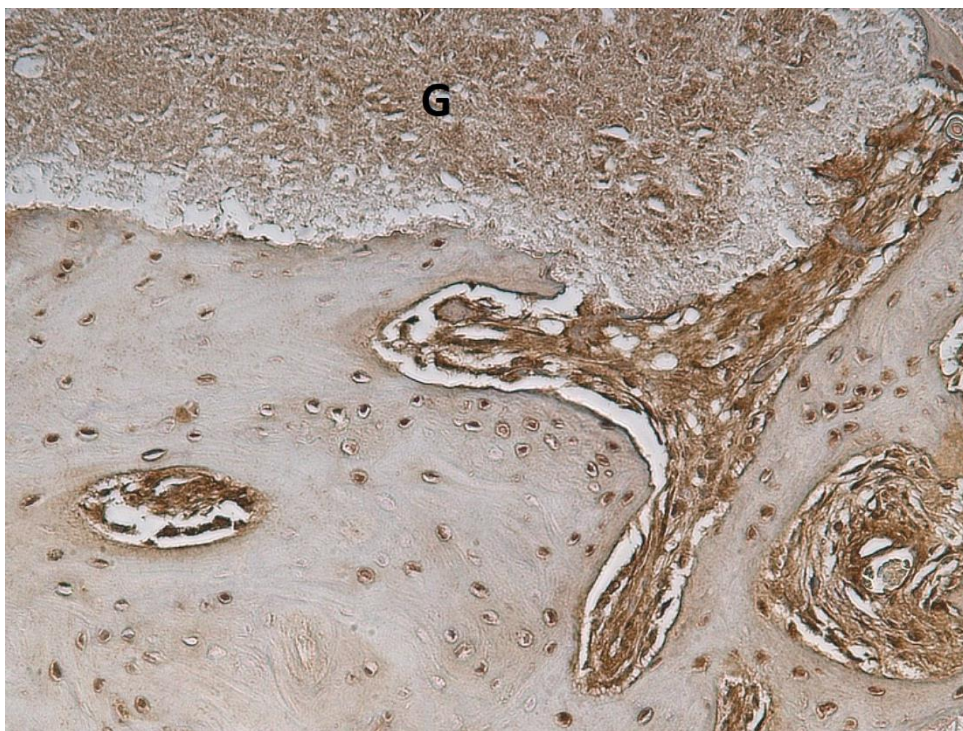
98. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{30}/TCP_{70} neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *IL-10* pozitīvu osteocītu.
IL-10 IMH, × 400



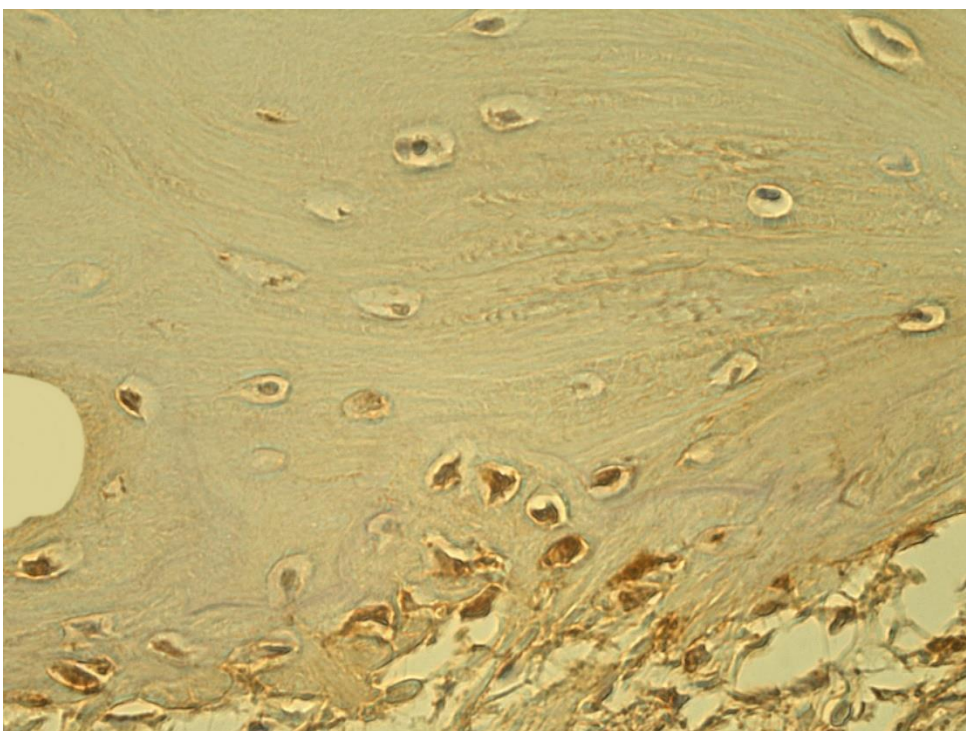
99. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *IL-10* pozitīvu osteocītu. G – granulas. *IL-10 IMH*, × 200



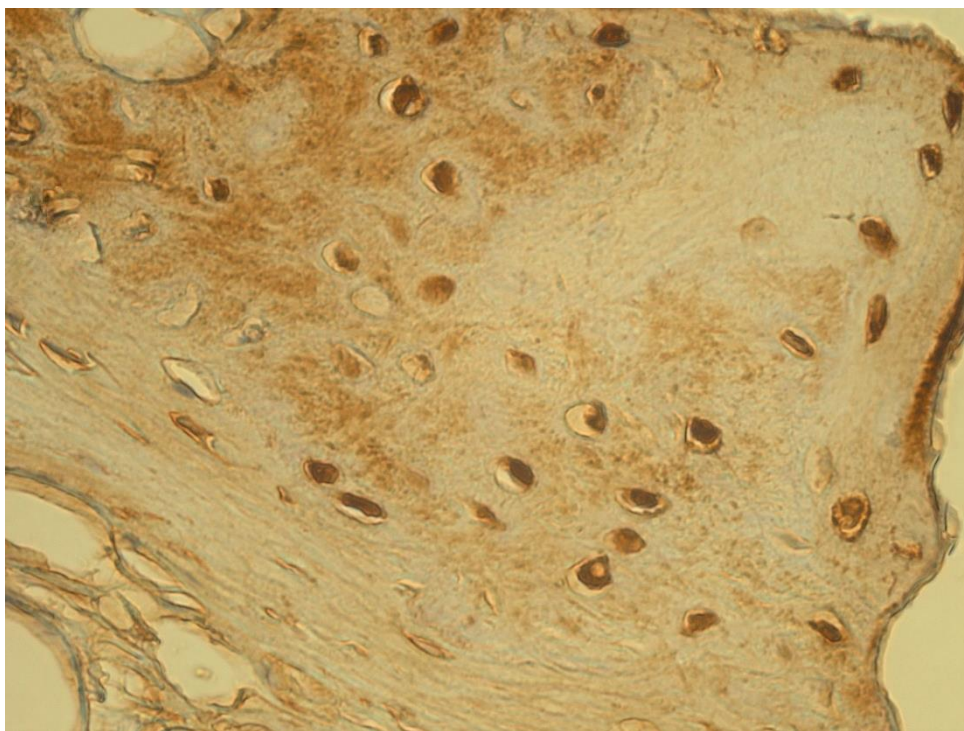
100. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *Sr-HA₇₀/TCP₃₀* neoperētās kājas, kurā redzams maz (+) *IL-10* pozitīvu kaula šūnu. *IL-10 IMH*, × 400



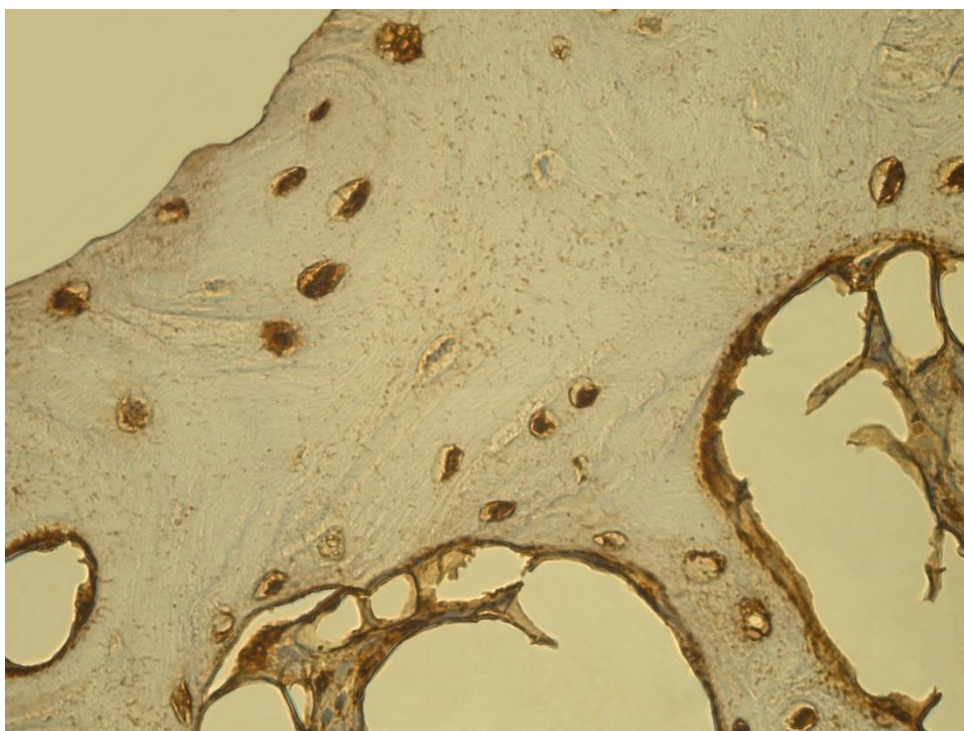
101. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{70}/TCP_{30} operētās kājas, kurā redzams daudz (+++) *IL-10* pozitīvu kaula šūnu. G – granula.
IL-10 IMH, × 200



102. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša HA_{70}/TCP_{30} neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *IL-10* pozitīvu kaula šūnu.
IL-10 IMH, × 400



103. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *sham* operētās kājas, kurā redzams vidēji daudz līdz daudz (++)/+++ *IL-10* pozitīvu kaula šūnu. *IL-10 IMH*, × 400



104. mikrofotogrāfija. Audu paraugs no truša *sham* neoperētās kājas, kurā redzams vidēji daudz (++) *IL-10* saturošu osteocītu. *IL-10 IMH*, × 400

Ētikas komisijas atļauja


Pārtikas un veterinārais dienests

**IZMĒĢINĀJUMA PROJEKTA ATĻAUJA Nr. 72
DŽĪVNIEKA IZMANTOŠANAI PROCEDŪRĀ**

Atļaujas saņēmējs
Rīgas Stradiņa universitātes Eksperimenta dzīvnieku audzētava, Nr. 025479
Izmēģinājuma dzīvnieku lietotājs (nosaukums, PVD reģistra Nr.)

Izmēģinājuma projekta/procedūras nosaukums
**Kaulaudu reģenerācijas izmaiņas pēc divfāzisku un trīsfāzisku
biomateriālu implantācijas dzīvniekiem ar eksperimentālu osteoporozi**

Ilze Šalma
Par visa izmēģinājuma projekta īstenošanu atbildīgā persona

Jekaterina Petļa, atļauja Nr. 17
Par izmēģinājuma projekta atbildīgā persona, PVD atļaujas Nr.

Izmēģinājuma projekta norises vieta
Kristapa Helmaņa iela 8, Jelgava, LV-3004
faktiskā adrese

Īpašie nosacījumi:
Retrospektīvi izvērtēt izmēģinājumu projektu un retrospektīvo izvērtējumu iesniegt PVD trīsdesmit dienu laikā pēc izmēģinājumu projekta beigām. Par jebkurām procedūras ieviestām izmaiņām nekavējoties ziņot PVD!
Retrospektīvā izvērtēšana u.c.

Atļaujas darbības laiks no 15.07.2015. līdz 15.05.2016.


Pārtikas un veterinārā
dienesta ģenerāldirektors


M. Balodis

AA 090005