

Jolanta Vamze-Liepiņa

**REAKTOGENITĀTES RAKSTUROJUMS
ATTĀLINĀTOS LAIKA PERIODOS
PĒC KAULAUDU AIZVIETOJOŠO
BIOMATERIĀLU IMPLANTĀCIJAS**

Promocijas darba kopsavilkums
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai
Specialitāte – morfoloģija

Rīga, 2016



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Jolanta Vamze-Liepīņa

REAKTOGENITĀTES RAKSTUROJUMS
ATTĀLINĀTOS LAIKA PERIODOS PĒC
KAULAUDU AIZVIETOJOŠO
BIOMATERIĀLU IMPLANTĀCIJAS

Promocijas darba kopsavilkums
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – morfoloģija

Darba zinātniskie vadītāji:

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

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

Rīga, 2016

Promocijas darbs izstrādāts:

Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūtā

Darba zinātniskie vadītāji:

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

Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

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

Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. habil. med., profesors **Jānis Vētra**

Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. sc. ing., asociētais profesors **Jānis Ločs**

Rīgas Tehniskā universitāte, Latvija

Dr. med., asociētā profesore **Renata Šimkūnaite-Rizgeliene**

Viļņas universitāte, Lietuva

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2016. gada 7. jūlijā plkst. 12.00

Rīgas Stradiņa universitātes Medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē

Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU mājas lapā:

www.rsu.lv

Promocijas padomes sekretāre:

Dr. med., Mg. sc. sal., docente **Anda Ķīvīte**

SATURS

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI	6
1. IEVADS.....	8
Darba aktualitāte	8
Darba mērķis	10
Darba uzdevumi	10
Darba hipotēzes	11
Zinātniskā novitāte	12
Personīgais ieguldījums	12
Ētiskie aspekti	12
Darba struktūra un apjoms	12
2. MATERIĀLS UN METODES.....	13
2.1. Pētījuma materiāls	13
2.2. Pētījuma metodes	14
2.2.1. Morfoloģiskā pētījuma metodes.....	14
2.2.2. Statistiskās apstrādes metodes	15
3. REZULTĀTI	17
3.1. Morfoloģiskā atrade un datu statistiskā analīze 1. eksperimentālajā grupā.....	17
3.2. Morfoloģiskā atrade un datu statistiskā analīze 2. eksperimentālajā grupā.....	18
3.3. Morfoloģiskā atrade un datu statistiskā analīze 3. eksperimentālajā grupā.....	19
3.4. Morfoloģiskā atrade un datu statistiskā analīze 4. eksperimentālajā grupā.....	20
3.5. Biomarkieru savstarpējās korelācijas	21

4. DISKUSIJA.....	22
4.1. Rutīnās izmeklēšanas morfoloģiskā atrade dažādos laika periodos pēc biomateriālu implantācijas.....	22
4.2. Imūnhistoķīmiskās atrades dati dažādos pēcimplantācijas periodos pēc dažādu biomateriālu implantācijas	25
4.2.1. Kaula morfoģenētiskais proteīns-2/4 (BMP-2/4)	25
4.2.2. Osteoproteģerīns (OPG)	28
4.2.3. Osteopontīns (OP)	30
4.2.4. Osteokalcīns (OC)	33
4.2.5. Proinflatōrie (iekaisumu veicinošie) citokīni interleikīns-1 (IL-1), interleikīns-6 (IL-6) un interleikīns-8 (IL-8)	36
4.2.6. Antiinflatōrais (pretiekaisuma) citokīns interleikīns-10 (IL-10)	40
4.2.7. β defensīns-2 (βDef-2)	42
4.2.8. Apoptozes atrade	44
5. SECINĀJUMI.....	48
6. IZMANTOTĀ LITERATŪRA	51
7. PUBLIKĀCIJAS UN PREZENTĀCIJAS PAR PĒTĪJUMA TĒMU	65
Zinātniskie raksti	65
Tēzes un prezentācijas starptautiskās zinātniskās konferencēs	65
Tēzes un prezentācijas vietēja mēroga zinātniskās konferencēs Latvijā.....	67
PATEICĪBAS.....	69

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

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

α -TCP-pH 6,0	<i>α-tricalcium phosphate cement with pH 6.0</i>	α -trikalcija fosfāta cements ar šķidro fāzi pH 6,0
α -TCP-pH 7,0	<i>α-tricalcium phosphate cement with pH 7.0</i>	α -trikalcija fosfāta cements ar šķidro fāzi pH 7,0
α -TCP-pH 8,0	<i>α-tricalcium phosphate cement with pH 8.0</i>	α -trikalcija fosfāta cements ar šķidro fāzi pH 8,0
HAP/ β -TCP-1	<i>biphasic hydroxyapatite/ β-tricalcium phosphate-1, sintered at 1000 °C</i>	bifāzisks hidroksiapatīts/ β -trikalcija fosfāts-1, apdedzināts 1000 °C
HAP/ β -TCP-2	<i>biphasic hydroxyapatite/ β-tricalcium phosphate-2, sintered at 1150 °C</i>	bifāzisks hidroksiapatīts/ β -trikalcija fosfāts-2, apdedzināts 1150 °C
HAP/PCL	<i>hydroxyapatite covered by polycaprolactone</i>	ar polikaprolaktonu pārklāts hidroksiapatīts
PMMA	<i>polymethylmethacrylate</i>	polimetilmetakrilāts
Bcl-2 gēns	<i>B cell lymphoma-2 gene</i>	B šūnu limfomas-2 gēns
RTU Rūdolfa Cimdiņa RBIAC	<i>Riga Technical university Rudolfs Cimdins Riga Biomaterials Innovation and Development Centre</i>	Rīgas Tehniskās universitātes Rūdolfa Cimdiņa Rīgas biomateriālu inovāciju un attīstības centrs

1. IEVADS

Darba aktualitāte

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

Dažāda veida kaulu defektu labošanai kaulu cementus izmanto kā kaula transplantātu aizstājējmateriālus locītavu protēžu nostiprināšanai, kaula masas palielināšanai, arī kā lokālas medikamentu piegādes sistēmas un šūnu pamatņu pagatavošanai kaulaudu inženierijā (*Shi, 2006; Talmadge, 2006; Habraken et al., 2007; Kokubo, 2008; Ratner et al., 2013*). Stomatoloģijas praksē potenciāli izmantojamo biomateriālu pētījumos lieto dažāda veida materiālus. Lielākoties tie ir kalcija fosfātu saturoši materiāli – hidroksiapatīts (HAP), kas var būt gan tīrā veidā, gan pārklāts ar medikamentiem, poliesteriem polikaprolaktonu (PCL) vai polilaktātskābi (PLA). Kā kaula cementa sastāvdaļu izmanto arī metilmetakrilāta un/vai polimetilmetakrilāta (PMMA) pulveri, vai HAP-hitozāna-PMMA savienojumus un citus materiālus.

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

Jebkuras substances implantācija bioloģiskos audos noris ar audu mehānisku bojājumu un tam sekojošu atbildes reakciju, audu dzīšanas un reģenerācijas procesu, kura ilgumu ietekmē individuālās imūnās aizsardzības sistēmas mehānismi un kas var variēt arī atkarībā no skarto audu lokalizācijas (Konig *et al.*, 1999; Leite and Ramalho, 2008). Imūnsistēmas šūnu, galvenokārt makrofāgu reakcijai uz biomateriālu, tiek piešķirta prognostiska nozīme granulācijas audu un svešķermeņa tipa reakcijas veidošanās procesam un līdz ar to arī biomateriāla funkcionalitātei (Brown *et al.*, 2012; Laurencin and Khan, 2013). Līdz ar to ir būtiski noteikt arī citokīnu interleikīna (IL)-10 un arī IL-1, IL-6 un IL-8 ekspresija saistībā ar biomateriālu implantāciju. Iekaisuma mediatoru – gan proinflatōro interleikīnu IL-1, IL-6 un IL-8, gan antiinflatōrā interleikīna IL-10 darbības rezultātā iekaisums parasti noris sākotnējā periodā un izsauc arī šūnu apoptozi – šūnu nāvi.

Audu reģenerācijas procesā būtiska loma ir arī izvēlētā implantāta materiālam, kas, kā apraksta Yamaguchi *et al.* (1997) un Anderson (2001), savukārt ir viena no tā biosaderību veidojošām komponentēm. Viņi arī skaidro, ka biosaderības veidošanās procesā būtiska loma ir arī imūnsistēmas reakciju savstarpējai mijiedarbībai ar biomateriālu un pēcimplantācijas periodam. Joprojām ir aktuāla biosaderīgu materiālu radīšana, kas likumsakarīgi nosaka nepieciešamību veikt paralēlus pētījumus par audu reaktogenitāti. Sluski un Vetra (1996) izstrādāja reaktogenitātes teoriju, dalot audu reakciju uz implantāciju nespecifiskā un specifiskā, kas kopā veido biosaderību. Audu reaktogenitāte ir organisma lokālā reakcija, kas ietver sevī adaptīvos mehānismus, un imūnās sistēmas reakcija tiek uzskatīta par šī procesa sastāvdaļu (Szebeni, 2012). Audu reaktogenitātes rādītājiem, t. i., audu reakcijām un izdalītajām vielām implantāta rajonā, tostarp arī augšanas faktoriem, šūnu nāves rādītājiem un iekaisuma mediatoriem, ir būtiska loma šajā organisma atbildes reakcijā. Audu nespecifiskā un specifiskā reaktogenitāte tiek izdalīta arī imūnhistoķīmiska izmeklējuma līmenī. Tā, audu

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

Darba mērķis

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

Darba uzdevumi

1. Pārskata griezumos analizēt audu biosaderību cietajos un mīkstajos audos ap dažāda veida biomateriāliem eksperimentālo dzīvnieku audos un kontroles gadījumā.

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

Darba hipotēzes

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

Zinātniskā novitāte

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

Personīgais ieguldījums

Darba autore veikusi audu paraugu morfoloģisko rutīnizmeklēšanu un imūnhistoķīmisko novērtēšanu un vizualizāciju, kā arī ir visu mikrofotogrāfiju autore.

Ētiskie aspekti

Pētījuma veikšanai izsniegta Latvijas Pārtikas un veterinārā dienesta atļauja (Nr. 24, 02.07.2010.).

Darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs uzrakstīts latviešu valodā. Tam ir klasiska struktūra un tas sastāv no 8 daļām: ievads, literatūras apskats, materiāls un metodes, rezultāti, diskusija, secinājumi, izmantotās literatūras saraksts un pielikumi. Promocijas darba apjoms – 152 lapaspuses, t. sk. 18 tabulas, 7 attēli, 66 mikrofotogrāfijas. Izmantotās literatūras sarakstā minēti 214 avoti (kopsavilkumā – 207 avoti).

2. MATERIĀLS UN METODEDES

2.1. Pētījuma materiāls

Audu reaktogenitātes pētījumam biomateriālu implantācijai tika izmantoti eksperimenta dzīvnieki – Kalifornijas truši. Pētījumā tika iekļauti 19 dzīvnieki. Dzīvnieku vienas puses apakšžokļa vai stilbu kaulaudi tika izvēlēti biomateriālu implantācijai, bet otras puses apakšžokļa vai stilbu kaulaudi, un mīkstie audi – kontroles paraugu veidošanai.

Biomateriālu implantācijas operācijas tikai veiktas 4 posmos, kas attiecīgi tika iedalīti četros eksperimentos. Pielietojot vispārējo anestēziju un lokālo anestēziju, tika veiktas biomateriālu implantācijas operācijas (Ģ. Šalms, A. Skaģers). Pēc paredzētajiem implantācijas termiņiem (1. eksperimentālajā grupā pēc 6 un 8 mēnešiem, 2. un 3. – pēc 3 mēnešiem un 4. – pēc 4,5 mēnešiem), pielietojot gaisa embolizācijas metodi, tika veikta dzīvnieku eitanāzija un izdalīti audu bloki no biomateriālu implantācijas zonas un no kontroles puses. Morfoloģiskai izmeklēšanai kopumā iegūti 33 eksperimentālie paraugi no biomateriālu implantācijas zonas un 12 kontroles paraugi.

Pētījumam tika izmantoti nekomerciālie – RTU Rūdolfa Cimdiņa RBIAC izveidotie biomateriālu implantāti (sagatavoja J. Ločs un V. Zālīte) un komerciālais materiāls:

1. eksperimentālajā grupā – 1150 °C apdedzinātas hidroksiapatīta granulas (**HAP-2**);
2. eksperimentālajā grupā – **komerciālais polimetilmetakrilāta (PMMA) kaulu cements** (*Biomet Bone Cement R; Biomet Inc., Šveice*), **nekomerciālais PMMA cements, α -TCP (trikalcija fosfāts) cements I** (ar sākotnējo šķidrās fāzes pH 6,0), **α -TCP cements II** (ar sākotnējo šķidrās fāzes pH 7,0), **neapdedzinātas HAP granulas, 1150 °C apdedzinātas HAP granulas (HAP-2)**,

ar polikaprolaktonu 30% (PCL) pārklāta HAP, nepārklāta HAP tablete;

3. eksperimentālajā grupā – 1000 °C apdedzinātas hidroksiapatīta/ β -trikalcijs fosfāta granulas (**HAP/ β -TCP-1**), 1150 °C apdedzinātas hidroksiapatīta/ β -trikalcijs fosfāta granulas (**HAP/ β -TCP-2**), 1000 °C apdedzinātas β -trikalcijs fosfāta granulas (**β -TCP-1**), 1150 °C apdedzinātas β -trikalcijs fosfāta granulas (**β -TCP-2**), 1000 °C apdedzinātas hidroksiapatīta granulas (**HAP-1**);
4. eksperimentālajā grupā – **α -TCP cements pH 6,0, α -TCP cements pH 7,0, α -TCP cements pH 8,0.**

2.2. Pētījuma metodes

2.2.1. Morfoloģiskā pētījuma metodes

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

Pēc kaulaudu bloku izdalīšanas audi tika fiksēti *Sol. Stefanini* šķīdumā ne mazāk kā 24 stundas. Pēc fiksācijas kaulaudi tika dekalcinēti ar *Decalcifer rapid* šķīdumu. Tad audi tika atūdeņoti, pielietojot etilspirtus no 70° līdz 96°, un attaukoti ksilola šķīdumā. Tad sekoja audu ieguldināšana kasetēs ar parafīnu, izveidojot, t. s. parafīna blokus, no kuriem tika sagatavoti 3–5 μ m biezi griezumumi un uzklāti uz priekšmetstikliem turpmākai apstrādei un krāsošanai. **Pārskata morfoloģiskās** ainas iegūšanai kaulaudu un mīksto audu morfoloģiskajai izpētē tika izmantota rutīnizmeklēšanas metode ar

hematoksilīnu/eozīnu (*Kiernan et al.*, 2008). Audu imūnhistoķīmiska krāsošana **biomarķieru noteikšanai** tika veikta pēc biotīna–streptavidīna metodes (*Hsu et al.*, 1981), izmantojot **βDef-2, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, BMP-2/4, OPG, OP, OC** antivielas. Šūnu **apoptoze** tika noteikta ar *Caspase-6* antivielu pēc biotīna–streptavidīna metodes (*Hsu et al.*, 1981) un pēc *TUNEL* metodes (*Gavrieli et al.*, 1992).

Imūnhistoķīmiski un pēc *TUNEL* metodes noteikto parametru/rādītāju relatīvā biežuma novērtēšanai kaulaudos tika izmantota morfoloģijas praksē plaši lietotā, arī literatūrā aprakstītā, puskvantitatīvā skaitīšanas metode (*Tobin et al.*, 1990; *Pilmane et al.*, 1998). Faktoru ekspresija tika analizēta viena griezuma trīs nejauši izraudzītos redzeslaukos (2.1. tabula).

2.1. tabula

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

–	Pozitīvas struktūras redzeslaukā neatrod
+	Maz pozitīvu struktūru redzeslaukā
++	Vidēji daudz pozitīvu struktūru redzeslaukā
+++	Daudz pozitīvu struktūru redzeslaukā
++++	Ļoti daudz pozitīvu struktūru redzeslaukā

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

2.2.2. Statistiskās apstrādes metodes

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

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

Ar vienu un divām zvaigznītēm* ** atzīmēta statistiski ticama korelācija. Statistiskā analīze tika veikta ar *IBM SPSS 20 (SPSS Inc., USA)* datorprogrammas palīdzību.

3. REZULTĀTI

3.1. Morfoloģiskā atrade un datu statistiskā analīze

1. eksperimentālajā grupā

Mīksto audu **pārskata griezumos** gan pēc 6, gan 8 mēnešiem implantāta – HAP-2 rajonā tika atrastas līdzīgas pārmaiņas audu struktūrā – atsevišķu skeleta šķērsvītrotu muskuļšķiedru distrofija un jaunveidošanās, vietām ar iekaisuma šūnu, galvenokārt, limfocītu infiltrāciju endo- un perimīzijā. Kontroles rajona mīkstajos audos minētās morfoloģiskās izmaiņas bija maz izteiktas. Vienā no kaulaudu paraugiem pēc 6 mēnešiem ap HAP-2 granulām tika konstatēta granulācijas audu saturoša kapsula. Kaulaudu pārskata griezumos kontroles audu rajonā pēc 6 un 8 mēnešiem tika konstatētas perēkļveida osteonu kanālu daļēja un pilnīga obliterācija ar saistaudiem un atsevišķu asinsvadu skleroze.

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

implantācijas. Lielāks vidējais apoptotiskais šūnu skaits gan eksperimenta, gan kontroles grupā bija pēc 6 mēnešiem.

Datu statistiskajā analīzē β Def-2, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, BMP-2/4, OPG, OC un OP saturošo šūnu, kā arī apoptotisko šūnu vidējais skaits statistiski ticami neatšķīrās eksperimenta un kontroles audu grupā, $p>0,05$.

3.2. Morfoloģiskā atrade un datu statistiskā analīze

2. eksperimentālajā grupā

Pēc trīs mēnešiem implantātu rajonos mīkstajos audos tika konstatēta audu tūska, atsevišķu limfocītu infiltrācija un fibroblastu proliferācija, kas bija mazāk izteikta α -TCP cementa un nekomerciālā PMMA cementa rajonā. Jaunā kaula veidošanās ar kaula – implantāta nepilnīgas saaugšanas pazīmēm tika konstatēta visu implantātu rajonos, izņemot nekomerciālā PMMA cementa rajonā.

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

ekspresējošas šūnas. *Statistiski ticami izteiktāks tika konstatēts IL-1 saturošo šūnu skaits eksperimenta grupā ($Z=1,77$; $p=0,04$).*

Apoptotisko šūnu vidējais skaits kaulaudos bija no $1,3\pm 0,57$ apoptotiskām šūnām α -TCP cementa II rajonā līdz $48,3\pm 5,50$ apoptotiskām šūnām neapdedzinātu HAP granulu rajonā. Savukārt kontroles rajonu kaulaudos apoptoze netika novērota.

3.3. Morfoloģiskā atrade un datu statistiskā analīze

3. eksperimentālajā grupā

Pēc trīs mēnešiem eksperimenta paraugos ar β -TCP-2 un HAP-1 granulām konstatējām mīksto audu pārmaiņas ar izteiktu makrofāgu un fibroblastu daudzumu. Kaulaudos 3 mēnešus pēc HAP/ β -TCP-1, HAP/ β -TCP-2, β -TCP-2 un HAP-1 granulu implantācijas tika konstatētas kaulaudu resorbcijas zonas un jauna kaula veidošanās.

Visvairāk IL-1 pozitīvu osteocītu konstatēts kaulaudu paraugos no HAP-1 implantācijas zonas ($21,33\pm 0,88$). Vislielākais IL-6 pozitīvo šūnu vidējais skaits konstatēts β -TCP-1 biomateriāla rajonā ($15,33\pm 1,20$). IL-8 pozitīvas šūnas konstatētas tikai β -TCP-2 apvidū un arī šeit to skaits bija salīdzinoši neliels (2 ± 0). IL-10 pozitīvo šūnu vidējais skaits, salīdzinoši ar citiem citokīniem, bija salīdzinoši zems, bet lielākais no tiem ($12,00\pm 0,57$) – konstatēts HAP-1 rajonā. β Def-2 tika konstatēts tikai HAP-1 rajonā un šī biomarķiera pozitīvo šūnu vidējais skaits trīs redzeslaukos bija $12,00\pm 0,57$, kas bija tuvu kontrolē atrastajam ($2,33\pm 0,33$). OP un OC ekspresējošo osteocītu vislielākais vidējais skaits (OP – $31,66\pm 0,88$; OC – $34,00\pm 0,57$) tika konstatēts HAP rajonā. Vislielākais BMP-2/4 pozitīvo osteocītu vidējais skaits tika konstatēts β -TCP-2 rajonā ($22,66\pm 0,88$), kas bija vairāk, nekā vidējais skaits kontroles audos ($1,67\pm 1,67$). OPG ekspresija bija salīdzinoši maz izteikta un lielākais OPG ekspresējošo šūnu skaits bija paraugos ar β -TCP-1 un

HAP/ β -TCP-1. Savukārt kontroles grupā vislielāko skaitu sastādīja OP pozitīvi osteocīti ($18,67 \pm 3,67$). ***Statistiski ticami lielāks tika konstatēts BMP-2/4 saturošo šūnu skaits eksperimenta grupā ($Z=1,84$; $p=0,03$).***

Vislielākais vidējais apoptotisko šūnu skaits trīs redzeslaukos tika konstatēts HAP-1 implantācijas rajonā ($65,00 \pm 21,18$), bet eksperimenta un kontroles grupas salīdzinājumā statistiski ticama atšķirība apoptotisko šūnu skaitā netika konstatēta.

3.4. Morfoloģiskā atrade un datu statistiskā analīze

4. eksperimentālajā grupā

4,5 mēnešus pēc α -TCP (ar pH 6,0, pH 7,0 un pH 8,0) implantācijas biomateriālu rajonā tika konstatēti granulācijas audi un fibrozes apvidi un jaunā kaula veidošanās zonas. Kontroles audos arī tika konstatēti nelieli granulācijas audu rajoni.

Biomarķieru ekspresija pēc 4,5 mēnešiem, salīdzinoši, bija maz izteikta. Kaulaudos ar trikalcija fosfāta materiālu vislielāko biomarķierus ekspresējošo šūnu skaitu sastādīja BMP-2/4 pozitīvas šūnas ($1,19 \pm 0,44$), bet vismazāko – IL-1 pozitīvi osteocīti ($0,11 \pm 0,11$). Kontroles grupā OPG ekspresējošo šūnu vidējais skaits bija 2 ± 0 , kas bija arī vienīgās imūnpozitīvās šūnas šajā grupā. 4. eksperimentā biomarķierus saturošo šūnu skaits eksperimenta un kontroles grupā statistiski ticami neatšķīrās, $p > 0,05$.

Apoptotisko šūnu skaits kaulaudu paraugos pēc α -TCP implantācijas bija variabls un visvairāk tās tika konstatētas paraugā ar α -TCP-pH 6,0 ($44,33 \pm 2,33$). Apoptotisko šūnu skaitā statistiski ticamas atšķirības netika konstatētas.

3.5. Biomarkieru savstarpējās korelācijas

Analizējot Spīrmena rangu korelāciju koeficientus starp imūnhistoķīmiskajiem rādītājiem **kontroles kaulaudos**, konstatējām sekojošas **statistiski ticamas ciešas korelācijas tikai pēc 3 mēnešiem** :

1. Pieaugot **IL-1** izdarei osteocītos, pieauga **OP** izdare ($r_s=0,880$);
2. Palielinoties **IL-6** izdarei osteocītos, pieauga arī **OPG** izdare, ($r_s=0,897$);
3. Pieaugot **IL-8** saturošo osteocītu skaitam, palielinājās arī **β Def-2** saturošo osteocītu skaits, ($r_s=0,897$).

Analizējot Spīrmena rangu korelāciju koeficientus starp faktoriem **eksperimenta kaulaudos**, **statistiski ticamas ciešas korelācijas** konstatējām **3 un 4,5 mēnešus** pēc biomateriālu implantācijas.

Pēc 3 mēnešiem:

1. Pieaugot **β Def-2** ekspresijai osteocītos, pieauga arī **IL-10** izdare ($r_s=0,703$), **OP** ($r_s=0,755$, $r_s=0,705$) un **OC** izdare ($r_s=0,701$);
2. Pieaugot **IL-1** izdarei osteocītos, pieauga arī **IL-10** izdare, ($r_s=0,810$);
3. Palielinoties **IL-6** ekspresējošo osteocītu skaitam, pieauga arī **OP** ekspresējošo osteocītu skaits, ($r_s=0,738$);
4. Pieaugot **IL-10** saturošo osteocītu skaitam, pieauga arī **OP** saturošo osteocītu skaitam ($r_s=0,780$);
5. Pieaugot **OP** ekspresējošo osteocītu skaitam, pieauga arī **OC** ekspresējošo osteocītu skaits, ($r_s=0,944$).

Pēc 4,5 mēnešiem:

1. Pieaugot **β Def-2** saturošo šūnu skaitam, pieauga arī **OC** saturošo šūnu skaits, ($r_s=0,711$);
2. Pieaugot **IL-1** saturošo osteocītu skaitam, pieauga arī **OC** saturošo osteocītu skaits, ($r_s=0,739$).

4. DISKUSIJA

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

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

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

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

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

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

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

implantācijas gadījumā. Bet **6 un 8 mēnešus** pēc implantācijas HAP rajonā jauna kaula veidošanās pazīmes nekonstatējām. Atrade mūsu pētījumā liecina par kaulaudu reģenerācijas prevalējošu norisi **3 mēnešu** pēc implantācijas, kas saskan ar citu autoru sniegtiem datiem par kaulaudu pēcimplantācijas reģenerāciju. Tomēr dažādu biomateriālu implantācijas gadījumos kaulaudu reģenerācijas sākums tiek novērots dažādos laika intervālos, un dažkārt ir atrodamī arī pretrunīgi dati par osteoģenēzes sākumu konkrētu biomateriālu apvidū. Piemēram, *Harada et al.* (1989), truša žokļa kaulā implantējot HAP/TCP, jau vienu nedēļu pēc implantācijas novēroja jauna kaula veidošanās pazīmes uz implantāta virsmas, bet pēc 48 nedēļām – jauna kaula ieaugšanu starp HAP porām. *Shaposhnikov* (1997), *Robbins et al.* (2005), *Chen et al.* (2015) ir novērojuši, ka dažāda rakstura balstaudu bojājuma gadījumos kaulaudu rumbēšanās un jaunā kaula veidošanās notiek, sākot no 2–3 nedēļām. Interesanti atzīmēt arī *Chazono et al.* (2008) pētījumu, kurā viņš 2 un 4 nedēļas pēc β -TCP implantācijas Jaunzēlandes trušu augšstilba kaulā konstatēja limfocītu, monocītu un gigantisko šūnu uzkrāšanos uz jaunveidotā kaula virsmas blakus biomateriālam, bet pēc 4 nedēļām – jauna kaula veidošanos ar β -TCP mikroporām tajā. Savukārt *Tsai et al.* (2010) un *Lee et al.* (2011) aprakstījuši, ka jaunā kaula veidošanās pēc HAP implantācijas konstatēta gan 3 mēnešus, gan 6–12 mēnešus pēc biomateriāla implantācijas. *Baslé et al.* (1993) un *Roldán et al.* (2010), izmantojot kalcija fosfāta implantātus, konstatēja kaula veidošanās pazīmes ne tikai 3 mēnešus pēc implantācijas (kā mūsu gadījumā pēc HAP, ar PCL pārklātas HAP tabletes, PMMA cementa un neapdedzinātu HAP granulu implantācijas), bet arī daudz agrīnākā periodā, t. i., vienu nedēļu pēc implantācijas. Interesants ir *Moghadam et al.* (2004) novērojums par jauna kaula veidošanos, ko autori atzīmē gan 6, gan 12 nedēļas pēc kalcija fosfāta cementa materiālu implantācijas Jaunzēlandes trušu galvaskausā, bet vairāk izteikta, taču bez būtiskas atšķirības implantāta un kontroles rajonā, tā tika novērota 12 nedēļu jeb 3 mēnešu implantācijas periodā.

Pētījumā ar bifāzisku kalcija fosfātu *Froum et al.* (2008) 6–8 mēnešus pēc biomateriāla implantācijas pacientu trepāna biopsijas materiāla histomorfometriskā izmeklēšanā novēroja jauna kaula veidošanos, tādējādi izceļot šī biomateriāla osteokondukcijas īpašības. Mūsu pētījumā arī bifāziska kalcija fosfāta materiālu – HAP/ β -TCP-1 un HAP/ β -TCP-2 – apvidū novērojām kaula veidošanos, bet maz izteiktu pēc **3 mēnešiem**. *Tsai et al.* (2010) 6–12 mēnešu periodā pēc HAP implantācijas pacientiem ar šķembainiem kaulu lūzumiem, labdabīgiem kaulu audzējiem ar dobumu veidošanos novēroja, ka 81,8% gadījumu radiogrāfiski tika konstatēta kaulaudu masas veidošanās un mikroskopiski – jauna kaula veidošanās uz implantētā HAP materiāla.

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

4.2. Imūnhistoķīmiskās atrades dati dažādos pēcimplantācijas periodos pēc dažādu biomateriālu implantācijas

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

Mūsu eksperimenta dzīvniekiem pētījuma četros eksperimentos pēc dažādu biomateriālu implantācijas BMP-2/4 ekspresējošās šūnas bija vienas no visvairāk konstatētajām šūnām, salīdzinot ar citus biomarkierus ekspresējošo šūnu skaitu. Tomēr BMP-2/4 ekspresējošo osteocītu skaits dzīvnieku kaulaudos bija variabls, ar vislielāko pārsvaru **3 mēnešus** pēc implantācijas ar PCL pārklātas HAP tabletes rajonā, tad β -TCP un neapdedzinātu HAP granulu rajonā. BMP-2/4 saturošo osteocītu skaits eksperimenta un kontroles grupā **3 mēnešos** arī statistiski ticami atšķīrās, ko nenovērojām citos implantācijas periodos. Vislielākais BMP-2/4 ekspresējošo šūnu skaits, kas tika novērots salīdzinoši agrīni pēc implantācijas, t. i., **3 mēnešus** pēc tās, līdzinās arī citu autoru novērojumiem par BMP aktivitāti un liecina par BMP stimulējošo lomu

kaulaudu dzīšanas procesā. *Aebli et al.* (2005), *Saito et al.* (2005) pētījumos par BMP stimulējošo ietekmi uz kaulaudu reģenerāciju un *Fu et al.* (2008) pētījumā par kaulaudu segmentālu defektu sadzīšanu novērojuši, ka HAP daļiņas regulē BMP-2 atbrīvošanos un HAP augstā koncentrācijā pat veicina to. Arī *Yu et al.* (2010) norādījuši, ka viena no BMP būtiskākajām lomām ir dalība osteoblastu diferenciācijas un kaula veidošanas procesā, un tas ir būtisks tieši lūzumu sadzīšanas agrīnās stadijās, kad BMP aktivizē kaula priekšteču šūnas periostā un endostā. Minētie *Yu et al.* (2010) novērojumi atbilst arī mūsu atradei **3 mēnešus** pēc implantācijas, kas vidēji atbilst agrīnai lūzuma sadzīšanas fāzei.

4,5 mēnešus pēc implantācijas BMP-2/4 pozitīvo osteocītu skaits jau bija mazākā daudzumā, tomēr visos paraugos ar dažādu pH α -TCP. Jāatzīmē, ka **4,5 mēnešus** pēc implantācijas novērojām vidēji ciešu statistiski ticamu korelāciju starp BMP-2/4 un β Def-2, OC, IL-1 un IL-10 izdali, kaut arī šajā laikā šo faktoru izdala bija salīdzinoši maz izteikta un tas raksturo funkciju izsīkumu. Mūsu pētījumā **6 mēnešus** pēc apdedzināta HAP-2 implantācijas augšanas faktoru ekspresējošie osteocīti ar nelielu pārsvaru, t. i., vidēji daudz, tika novēroti biomateriāla implantācijas apvidū, bet pēc **8 mēnešiem** tie pārsvarā bija kontroles audu rajonā. Statistiski ticamas atšķirības šī faktora saturošo šūnu skaitā, kā arī statistiski ticmas korelācijas ar citiem faktoriem **6 un 8 mēnešos** nenovērojām. Salīdzinoši mazāks BMP-2/4 pozitīvo osteocītu skaits **4,5, 6 un 8 mēnešus** pēc implantācijas, mūsuprāt, norāda uz traumas jau izzūdošo ietekmi uz audiem. Mūsu pētījumā novērotais variablais BMP saturošo osteocītu skaits, iespējams, liecina par BMP selektivitāti atkarībā no biomateriāliem. *De Jong et al.* (2002) aprakstījuši, ka, neskatoties uz pētījumu datiem par augšanas faktoru, t. sk. BMP receptoriem, un BMP kā vadošo osteoblastu diferenciācijas faktoru, tomēr ir maz zināms, kā tiek kontrolēta šī faktora bioloģiskā atbilde un tās selektivitāte. Par BMP selektivitāti kalcija fosfātu un polimēru tipa implantātiem atrodami tikai nedaudzi pētījumi, kuros aprakstītas BMP aktivitātes izpausmes pēc HAP un HAP/TCP implantācijas

periodā tikai līdz diviem mēnešiem. Tā, *Murata et al.* (2007) divas nedēļas pēc funkcionāli gradēta HAP subkutānas implantācijas žurkām novēroja materiāla virsmas un apmēra intensīvu degradāciju un gigantisko šūnu infiltrāciju biomateriāla rajonā, bet 4 nedēļas pēc implantācijas konstatēja albumīna saturoša šķidrums uzkrāšanos biomateriālā, ko autori izskaidro ar BMP-2/4 intensīvu ietekmi uz jauna kaula veidošanās procesu. Interesanti, ka agrīna pēcimplantācijas perioda pētījumā augsta BMP-2/4 aktivitāte ir novērota jau divas nedēļas pēc HAP implantācijas truša apakšžoklī (*Salma et al.*, 2009). *Ruhé et al.* (2009) divas un četras nedēļas pēc piesātinātas ar BMP kalcija fosfāta keramikas implantācijas truša galvaskausā, salīdzinot ar kontroles rajoniem, novēroja kaula struktūru intensīvāku veidošanos un norādīja uz BMP būtisko lomu kaulaudu reģenerācijas procesā. Arī *Yang et al.* (2012) 4 un 8 nedēļas pēc piesātināta ar rekombināto cilvēka BMP bifāziskā HAP/TCP materiāla implantācijas žurku augšstilba kaulos novēroja audu reģeneratīvās izmaiņas – jauna kaula veidošanos, tomēr salīdzinoši izteiktāku eksperimenta audos pēc 8 nedēļām. Savukārt *Liporace et al.* (2015), implantējot analogu materiālu žurkām, novēroja palielinātu kaula blīvumu gan pēc 4, gan 8 nedēļām. Gan *Yang et al.* (2012), gan arī *Liporace et al.* (2015) secinājuši, ka HAP/TCP var tikt izmantots kā efektīva šī osteoinduktīvā proteīna pievades un kaulaudus reģenerējoša sistēma.

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

4.2.2. Osteoproteģerīns (OPG)

OPG saturoši osteocīti skaita ziņā bija otras visbiežāk novērotās šūnas visu eksperimentu kaulaudos, kaut arī to skaits bija variabls. Tā **3 mēnešus** pēc implantācijas OPG ekspresējošus osteocītus ar lielāku pārsvaru konstatējām α -TCP cementa I un ar PCL pārklātas HAP tabletes rajonā, bet to skaits bija mazāks apdedzinātu HAP-1 un HAP-2 granulu, nepārklātas HAP tabletes, HAP/ β -TCP-2, β -TCP rajonā. **4,5 mēnešus** pēc implantācijas OPG saturošo osteocītu skaits bija salīdzinoši neliels gan eksperimenta audos ar dažādu pH α -TCP, gan kontroles audos. Savukārt pēc **6 mēnešiem** OPG ekspresija biomateriāla rajonā bija pilnībā izsīkusi, bet pēc **8 mēnešiem** implantātu rajonā tika konstatēta OPG ekspresijas atjaunošanās. Statistiski ticamas atšķirības OPG izdalē eksperimenta un kontroles audos nekonstatējām, bet novērojām statistiski ticamu OPG un IL-6 saturošo struktūru korelāciju kontroles audos 3 mēnešus pēc implantācijas. Minētā atrade mūsu pētījumā liecina, ka osteocītiem pēc **3, 4,5 mēnešiem, 6 un 8 mēnešiem** pēc kalcija fosfāta tipa un polimērus saturošu biomateriālu implantācijas ir dažāda funkcionālā aktivitāte implantācijas un arī kontroles audos. Tādējādi pieņemam, ka dažādiem implantācijas materiāliem piemīt selektīva īpašība rosināt šūnu aktivitāti un kaulu resorbciju neatkarīgi no pēcimplantācijas laika. Pie šādiem materiāliem pieder monofāziski un bifāziski HAP un TCP materiāli.

OPG kā kaulu šūnu aktivitātes marķieris ir aprakstīts un novērtēts arī citu autoru darbos. *Nakagawa et al.* (1998) pētījumā ir pierādīts, ka OPG ir receptors, kas var piesaistīties RANKL, inhibēt RANKL un preosteoklastos un osteoklastos esošā receptora RANK savstarpējo mijiedarbību. *Lacey et al.* (1998) apgalvo, ka šis receptors galvenokārt nosaka osteoklastu formēšanos un aktivitāti. Arī *Crotti et al.* (2004) atzīmējuši, ka RANKL, tā receptors RANK un to inhibitors OPG tiek uzskatīti par osteoklastu formēšanās vadošajiem regulatoriem gan veselos, gan patoloģiski izmainītos kaulaudos. Literatūrā

gandrīz nav atrodami pētījumi par OPG ekspresiju konkrētos implantācijas periodos, ir tikai nedaudz datu par OPG ekspresijas novērojumiem pēc kalcija fosfāta un polimēra tipa biomateriālu implantācijas, tostarp to zaudējumu gadījumos (kas gan netika novērots mūsu pētījumā). Piemēram, *Jiraneck et al.* (1993), *Goodman et al.* (1998), *Haynes et al.* (2001) gadījumos ar zaudētiem implantātiem un osteolītiskās zonās periimplanta audos (audos ap implantu) novērojuši paaugstinātu OPG un RANKL ekspresiju un aktivitāti. Turklāt *Jiraneck et al.* (1993) un *Goodman et al.* (1998) norādījuši, ka arī TNF alfa un IL-1 beta regulē OPG un RANKL ekspresiju un aktivitāti. *Arikan et al.* (2008), nosakot OPG ekspresiju periimplanta audos pacientiem ar saknes tipa dentāliem implantātiem, izpētījuši, ka OPG varētu būt marķieris audu fizioloģiski morfoloģiskā veseluma novērtēšanai ap implantātiem. Citu autoru pētījumos par kaulaudu aktivitātes asociētā proteīna OPG ekspresiju, izmantojot dažāda veida biomateriālus, t. sk. kalcija fosfāta un sintētiskos, ir norādīti atšķirīgi dati, un OPG ekspresija ir novērota gan implantātā, gan kontroles audu rajonos. Piemēram, *Crotti et al.* (2004) pētījumā par cilvēkiem ar locītavas implantātiem tika novērots, ka OPG ekspresija maz atšķiras periimplanta zonas audos pacientiem ar osteolīzi, sinoviālajos audos pacientiem ar osteoartrītiski izmainītām locītavām un veselos, vizuāli neizmainītos, audos. *Endres et al.* (2006), izmantojot titāna implantātus ar dažādu virsmas porozitāti, novērojuši, ka visi implantāti veicina kaulu asociēto proteīnu – OPG, OC un sārmainās fosfatāzes – ekspresiju, bet būtiski izteikta tā bija audos ap implantātiem, kuri bija pārklāti ar HAP. Jāatzīmē, ka arī mūsu pētījumā tika konstatēta augsta OPG ekspresija HAP materiāla implantācijas apvidos.

Iespējams, ka mūsu pētījumā novērotais šūnu aktivitātes papildu paaugstinātājs bija iekaisums, par ko liecina salīdzinoši augsta, bet statistiski ticami savā starpā nekorelējoša gan citokīnu, gan OPG ekspresija kaulaudos ar identisku biomateriālu, kaut nevar izslēgt arī individuālu atbildes reakciju uz implantēto materiālu. OPG ekspresijas saistību ar iekaisumu aprakstījuši arī citi

autori. Tā, *Wang et al.* (2015) pacientiem ar periimplantītu novēroja paaugstinātu, bet ne statistiski ticamu gan citokīna IL-1, gan OPG ekspresiju, kas savukārt netika konstatēts kontroles grupas pacientiem. Viņš uzskata, ka marķieru paaugstinātā ekspresija ir tieši saistāma ar iekaisuma procesu. Arī *Crotti et al.* (2004; 2015) ir aprakstījis OPG ekspresijas saistību ar iekaisumu, ko skaidro ar proinflatōro citokīnu regulējošo ietekmi uz osteoklastu aktivitāti, kas savukārt noris paaugstinātas OPG līdzīgā NFkappaB ligandu receptoru aktivatora (RANKL) ekspresijas dēļ. Uz RANK-RANKL-OPG sistēmas aktivāciju kaulu-locītavu sistēmas iekaisīgu saslimšanu un periimplantītu ir norādījuši arī *Yun et al.* (1998), *Theodore et al.* (2001), *Holding et al.* (2006), *Jiang et al.* (2015). Domājams, ka biomateriālu implantācijas gadījumos iespējama arī individuāla atbildes reakcija šī faktora izdalē, kas bija novērojama atsevišķiem mūsu eksperimenta dzīvniekiem.

4.2.3. Osteopontīns (OP)

Mūsu eksperimenta dzīvniekiem pēc dažādu biomateriālu implantācijas tika novērots variabls, galvenokārt palielināts, kaulu matricas proteīna OP ekspresējošo šūnu skaits visos eksperimenta paraugos ar kalcija fosfāta (β -TCP un HAP) un polimēra tipa implantātiem un kontroles paraugos **3 mēnešus** pēc implantācijas. Tad pat šādas šūnas bija atrodamas tiešā HAP tuvumā un ar PCL pārklātas HAP tabletes implantācijas rajonā. Iepriekš minētais norāda uz iespējamu traumas un materiāla selektivitātes ietekmes kombināciju, kad trauma samazina kaulu šūnu mineralizācijas spēju, kas saglabājas tikai HAP (dabīgo audu analoga) tuvumā un selektīvi kalcija fosfāta (β -TCP) un polimēru implantātiem. Interesanti, ka mūsu eksperimenta dzīvniekiem 3 mēnešus pēc implantācijas kaulaudos ap implantātu ar lielu OP saturošo šūnu skaitu tika atrasts arī liels, ar to statistiski ticami cieši korelējošs, IL-6 šūnu skaits, norādot

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

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

Būtisks un diskutabls joprojām ir jautājums par OP funkcijām kaulaudos, jo te faktoram tiek piedēvēta nozīme gan kaulaudu remodelēšanā, gan imūnās sistēmas atbildes reakcijās. *Nanci* (1999) un *Launey et al.* (2010) kaulaudos OP atraduši ārpusšūnu matricē starp mineralizētām kolagēna šķiedrām. *Fantner et al.* (2005) atklājis interesantu faktu, ka OP kā nekologenozs faktors kaulaudos darbojas arī kā adhezīvs materiāls. Savukārt *Sodek et al.* (2000) norāda uz OP nozīmi un ekspresijas atšķirībām kaulaudu attīstības, reģenerācijas, resorbcijas un kalcifikācijas procesos, minot, ka OP ir būtiska nozīme osteoklastu formēšanās norisē, migrācijā un šūnu resorbīvajā

aktivitātē. *Scatena et al.* (2007) uzskata, ka OP tomēr spēj arī inhibēt mineralizāciju, pasargājot organismu no ektopiskas kaulaudu veidošanās. *Sodek et al.* (2000) atzīmē arī OP proinflatatorās īpašības, kuru dēļ tas ir iesaistīts imūnās sistēmas atbildes reakcijās. Izrādās, ka OP stimulē imūno šūnu spēju izdalīt IL-1, IL-6 un TNF, bet inhibē apoptozi. Tomēr *Choi et al.* (2008) ankilizējošā spondilīta pacientiem atraduši augstāku OP līmeni asins serumā un norāda, ka OP prevalējošā loma ir kaula remodelēšanas procesā, kā sekundāru atstājot faktora nozīmi iekaisuma uzturēšanā. Dubultfunkcijas – proti, OP kā fosforilāciju veicinoša faktora iesaisti biomineralizācijā kaulaudu remodelēšanā un imūnās sistēmas atbildes reakcijas uzturēšanā – norāda arī *Li et al.* (2015). Nenoliedzot abas funkcijas, kas acīmredzot eksistē arī mūsu pētījumā, gribam uzsvērt, ka piekrītam arī *Hunter* (2013) un *Holm et al.* (2014) viedoklim, ka joprojām ir neskaidra OP kā mineralizēto struktūru ārpusšūnu matricē komponenta inhibējošā vai stimulējošā ietekme uz minerāla – hidroksiapatīta – veidošanos. Nav minēta selektīva dažādu biomateriālu ietekme uz OP izdali, jo nav veikti tik plaši pētījumi, taču iespējams aplūkot mūsu rezultātus kontekstā ar solitāriem pētījumiem. Mūsu dati sakrīt ar atsevišķu pētījumu (*Lee et al.*, 2011) par kalcija fosfāta tipa biomateriālu stimulējošu ietekmi uz OP ekspresiju šūnās. *Lee et al.*, 2011) apraksta arī interesantu novērojumu, ka ar HAP pārklāti titāna implantāti izraisa gan OP, gan OC paaugstināšanos implantācijas rajonos jau **3 mēnešus** pēc implantācijas. Atklāts, ka būtisks biomateriālu sastāva komponents ir tieši HAP, turklāt nav nozīmes, cik liels ir HAP īpatsvars biomateriālā (*Ruckh et al.*, 2012), jo jau 3 nedēļas pēc dažādas koncentrācijas (1% un 10%) HAP un PCL kompozītu implantācijas kaulaudos atrodami ievērojami OP perēkļi. Tādējādi mūsu atrade par OP saturošām šūnām tiešā HAP tuvumā ir būtiska un apstiprina *Zheng et al.* (2014) apgalvoto, ka HAP un OP ir augsts savstarpējās mijiedarbības potenciāls.

Tādējādi pieņemam, ka visos mūsu eksperimentos, kur analizējam OP, iezīmējas šādas būtiskas lietas: 1) iničiālā trauma kā OP ekspresiju samazinošs

faktors; 2) HAP saturošs materiāls, kā arī kalcija fosfāta un polimēru implantāti kā selektīvi OP ekspresiju veicinoši faktori un 3) būtiskie **3 un 8 mēneši** pēc implantācijas, no kuriem pirmais laiks saistāms vēl ar audu atbildes reakciju uz implantācijas traumu, bet otrs norāda uz pilnīgu kaulaudu faktoru ekspresijas atjaunošanos.

4.2.4. Osteokalcīns (OC)

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

Minētā atrade liecina par aktīvāku kaulaudu mineralizāciju **3 mēnešus** pēc implantācijas, kas saistāma ar, iespējams, selektīvu biomateriālu ietekmi uz kaulaudu mineralizāciju. Tāda tika konstatēta kaulu matricē proteīna OP ekspresijas analīzē, kurā novērojām izteiktu OP ekspresiju **3 mēnešus** pēc kalcija fosfāta un polimēra implantācijas. Minētais gan neizslēdz arī iespējamu traumas un materiāla selektivitātes ietekmes kombināciju, kad trauma samazina kaulu šūnu mineralizācijas spēju, kas saglabājas tikai HAP apvidū un selektīvi kalcija fosfāta un polimēru implantātu rajonos.

Līdz ar kaulu matricē proteīnu atradi mūsu pētījumā būtiski ir atzīmēt arī citu autoru darbos minētās OC funkcijas un lomu. Piemēram, *Lee* (2000) un *Lombardi et al.* (2015) aprakstījuši, ka OC atrodams osteoblastos,

odontoblastos, cementoblastos un hondrocītos. *Davis (2006), Lee (2007), Lombardi et al. (2015)* norādījuši uz OC intensīvu iesaistīšanos kaula vielmaiņas procesā un osteogēnēzē. Mūsaprāt, šeit svarīgi atzīmēt arī *Robey et al. (1993), Young (2003), Hamada et al. (2008)* novērojumu, ka kaula matricēs proteīniem – OP un OC – ir galvenā loma kolagēna I integrācijas procesā ar HAP kristāliem kaula matricē. Salīdzinoši izteiktā OP un OC ekspresija mūsu eksperimenta kaulaudu paraugos un tieši atrade HAP un kalcija fosfāta implantātu rajonos mūsu pētījumā norāda uz šo materiālu selektīvo ietekmi uz OP un OC ekspresiju, ko pamato *Robey et al. (1993), Young (2003), Hamada et al. (2008)* novērojumi. Literatūrā nav minēta selektīva dažādu biomateriālu ietekme arī uz OC izdali, jo nav veikti plaši pētījumi kalcija fosfāta un polimēru tipa biomateriālu implantācijā attiecībā uz kaulu matricēs proteīnu ekspresiju. Taču, neskatoties uz to, iespējams aplūkot mūsu rezultātus kontekstā ar atsevišķiem citu autoru pētījumiem, kas tomēr netieši pamato un atspoguļo HAP implantāta stimulējošo ietekmi arī uz OC ekspresiju. Tā *Endres et al. (2006)*, izmantojot titāna implantātus ar dažādu virsmas porozitāti, novēroja, ka visi implantāti veicināja kaulu asociēto proteīnu – OPG, OC un sārmainās fosfatāzes – ekspresiju, bet vairāk izteikta tā bija audos ap implantātiem, kuri bija pārklāti ar HAP. *Santarelli et al. (2014)* dabīgā, no liellopa iegūtā HAP un sintezēta nanokristālu hidroksiapatīta biosaderības pētījumā *in vitro*, izmantojot MG-63 šūnu līniju (cilvēka osteosarkomas šūnu līnija), konstatēja variablu osteogēno marķieru OC un OP ekspresiju eksperimenta un kontroles audos.

Mūsu pētījumā tika novērota polimēru tipa implantāta PMMA stimulējoša ietekme uz OC ekspresiju, kas aprakstīta arī citu autoru darbos. Tā *Zambonin et al. (1998)* cilvēka osteoblastu kultūrā *in vitro* pētījumā novēroja paaugstinātu OC un IL-6 ekspresiju PMMA pulverveida daļiņu implantācijas apvidos un vienlaikus atzīmēja nomāktu osteoblastu proliferāciju un kolagēna sintēzi. Viņš arī norādījis, ka PMMA daļiņas, ietekmējot osteoblastu aktivitāti, kopā ar citiem faktoriem var izraisīt periprostētisku osteolīzi (osteolīzi audos ap

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

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

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

Mūsu pētījumā proinflammatoro citokīnu IL-1, IL-6 un IL-8 ekspresija tika novērota visos pēcimplantācijas mēnešos gan eksperimenta, gan kontroles audos, izņemot **4,5 mēnešus** pēc implantācijas. Savukārt statistiski ticamu šūnu skaita atšķirību konstatējām tikai IL-1 **3 mēnešus** pēc implantācijas, kad arī vairāk IL-1 pozitīvo osteocītu tika novērots pēc α -TCP cementa I, bet IL-6 – pēc komerciālā PMMA cementa (arī IL-8 saturošas šūnas), α -TCP cementa I un ar PCL pārklātas HAP tabletes implantācijas. Turklāt šo faktoru savstarpējā korelāciju analīzē statistiski ticamas korelācijas nevienā no pēcimplantācijas periodiem ne eksperimenta, ne kontroles audos neieguvām.

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

Ar audu traumatizāciju saistāmais iekaisums skafīts arī citu autoru darbos, bet kopumā zināms, ka iekaisuma apvidū infiltrējošo makrofāgu izdalītajiem citokīniem, īpaši IL-1, piemīt izšķiroša loma lokāla iekaisuma un audu bojājuma patoģenēzē, kas skaidrojama ar IL-1 stimulējošo ietekmi uz adhēzijas molekulu ekspresiju no endoteliocītiem (*Dinarelo*, 1988, 1994; *Tracey*, 1989). Savukārt citokīns IL-6 stimulē citu citokīnu izdali (*Feurino et al.*, 2007), un, kā apraksta *Zhang et al.* (2014), darbojas kā iekaisumu stimulējošs citokīns, ir iekaisuma sākumfāzes vadošais citokīns traumas izraisītā iekaisumā, kas, mūsaprāt, būtu attiecināmi arī uz biomateriālu implantāciju. IL-6 sekretē T limfocīti un aktivēti makrofāgi asinsvadu sienā, tādējādi stimulējot imūnsistēmas atbildes reakciju uz traumu, apdegumiem un citiem audu bojājumiem, kas noris ar iekaisuma reakciju (*Ostriker*, 2014). Citokīns IL-8 kā hemokīnproteīns (*Oppenheim et al.*, 1989; *Baggiolini et al.*,

1992) ar iekaisumu veicinošu iedarbību un raksturīgo hemotakses ietekmes funkciju ir viens no galvenajiem citokīniem, kas iekaisuma gadījumā aktivizē neitrofilos leukocītus (*Bickel, 1993; Rosenthal et al., 1994; Gilmour et al., 2003*) un nodrošina organisma atbildes reakciju uz bojājumu. Vienlaikus *Qazi et al. (2011)* ir aprakstījis IL-1 un IL-8 savstarpējās ietekmes saistību un norādījis, ka IL-8 sintēze ir cieši saistīta ar IL-1 un TNF- α stimulējošo ietekmi.

Vēl kaulaudu morfoloģisko izmaiņu izpētē svarīgi ir novērtēt proinflaturo citokīnu IL-1 un IL-6 ekspresiju, jo literatūrā atrodamas liecības par IL-1 un IL-6 piemītošām osteoklastoģenēzi veicinošām īpašībām ar sekojošu kaulaudu resorbciju (*Holt et al., 2007; Polzer et al., 2010*) un implantāta fiksācijas zaudējumu (*Holt, 2007*). Zināms arī, ka pašu implantātu aktivēti makrofāgi atbrīvo IL-1 un TNF- α , kas savukārt stimulē osteoblastus un var veicināt IL-6 un prostaglandīnu E-2 sekrēciju (*Schmidt et al., 2003*). Tādējādi kopumā tiek aktivēti arī osteoklasti ar sekojošu kaula resorbciju un implantāta fiksācijas zudumu. Mūsu pētījumā implantāta zaudējuma pazīmes dzīvniekiem nenovērojām nevienā no implantācijas periodiem, lai gan pēc 3 mēnešiem konstatējām salīdzinoši daudz gan IL-6, gan OC pozitīvus osteocītus. Daudz IL-6 pozitīvo šūnu un vienlaikus ļoti daudz OC pozitīvo šūnu konstatējām apdedzināta HAP-1 implantācijas rajonā, bet monofāziska β -TCP rajonā – vidēji daudz IL-6 saturošu šūnu un ļoti daudz OC šūnu. Turklāt **3 mēnešus** arī pēc PMMA cementa, ar PCL pārklātas HAP tabletes implantācijas tika konstatēts ļoti daudz IL-6 saturošu šūnu. Acīmredzot minētā atrade mūsu pētījumā skaidrojama ar biomateriālu mazāk agresīvu un selektīvu ietekmi uz šo biomarķieru ekspresiju un no tās izrietošām sekām.

Tomēr literatūrā maz aprakstīti mums līdzīgi pētījumi par šo iepriekšminēto faktoru ekspresiju no paša kaula implantātu rajonos. Tā *Ninomiya et al. (2001)* norāda, ka HAP un bifāziskais HAP/ β -TCP stimulē kaula IL-6 un proteāžu ekspresiju, tā paaugstinot kaula resorbciju, osteolīzi un iespēju zaudēt implantātu. Savukārt *Eyckmans et al. (2013)* atzīmē izteiktu

osteoblastu IL-6 un BMP ekspresiju Ca-P implantācijas gadījumā. Minēto pētījumu dati atbilst mūsu atradei par salīdzinoši lielu IL-1 un IL-6 saturošu šūnu skaitu kalcija fosfātu saturošu biomateriālu rajonos, liecinot gan par slēptu iekaisuma norisi, gan arī par IL-6 stimulētu citu citokīnu izdali (*Feurino et al.*, 2007). Tomēr uzskatām, ka IL-1 un IL-6 izdale vien norāda uz iekaisumu bez vizuālas iekaisuma šūnu atrades, kas laika gaitā samazinās.

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

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

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

liecina OPG, OP un OC ekspresijas aktivitātes atjaunošanās. Paralēli noris arī proinflatōro citokīnu un antimikrobās aizsardzības proteīnu izdales atjaunošanās (kaut arī maz izteikta). Minēto pamato atrastās šo faktoru savstarpējās korelācijas, proti, ciešā statistiski ticamā korelācija starp OP un β Def-2 izdali un starp OP un IL-6 izdali eksperimenta grupā un OP un IL-1, IL-8 un β Def-2 izdali kontroles audos **3 mēnešus** pēc implantācijas, bet **8 mēnešus** pēc implantācijas starp OP un β Def-2 izdali kontroles audos.

4.2.6. Antiinflamatorais (pretiekaisuma) citokīns interleikīns-10 (IL-10)

IL-10 ekspresija tika konstatēta visos pēcimplantācijas periodos, izņemot pēc **4,5 mēnešiem** abos – gan eksperimenta, gan kontroles – audos, un šo faktoru saturošo šūnu skaits **3, 6 un 8 mēnešus** pēc implantācijas statistiski ticami neatšķīrās. Savukārt datu korelāciju analīze uzrādīja statistiski ticamu ciešu korelāciju starp antiinflamatorā citokīna IL-10 un proinflatōrā citokīna IL-1 izdali, kā arī IL-10, β Def-2 un IL-10 un kaula matricas proteīna OP izdali eksperimenta kaulaudos **3 mēnešus** pēc implantācijas. Šajā pēcimplantācijas periodā arī visvairāk IL-10 pozitīvi osteocīti tika atrasti pēc komerciālā PMMA cementa, β -TCP, ar PCL pārklātas HAP un nepārklātas HAP tabletes implantācijas. Savukārt kontroles audos IL-10 korelācijas ar citiem faktoriem nenovērojām. Minētā atrade liecina par saglabātu audu lokālo atbildes reakciju, cenšoties nomākt iekaisumu, jo IL-10 ir 2. tipa citokīns, kas tiek uzskatīts par pretiekaisuma citokīnu, kuram ir nozīmīga loma imūnsistēmas regulācijā un iekaisuma procesā (*Eskdale*, 1997), kuru producē tādas imūnās sistēmas šūnas kā T šūnas (Th2, Th1, Th17) (*McGuirk and Mills*, 2002), monocīti, makrofāgi, dendrītiskās šūnas (*Fillatreau et al.*, 2008), granulocīti, t. sk. eozinofīlie leukocīti un tuklās šūnas (*Ryan et al.*, 2007).

Savukārt IL-10 trūkums **4,5 mēnešus** pēc implantācijas skaidrojams ar proinflatōro citokīnu aktivitātes samazināšanos, kad maz izteikta bija arī IL-1 ekspresija. **Sešus un 8 mēnešus** pēc implantācijas vērojamā IL-10 ekspresijas atjaunošanās būtu skaidrojama ar IL-10 kā imūnsistēmas regulatora lomu, ko arī savā darbā atzīmējis jau minētais *Eskdale* (1997), un kas saglabājas ilgstošā laika periodā – **6 un 8 mēnešus** pēc biomateriālu implantācijas.

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

Neskaidra un maz pētīta ir citokīna IL-10 ekspresija korelācijā ar implantācijas laiku. Tā *Salma et al.* (2009) jau 2 nedēļas pēc ar deksametazonu un lidokaīnu piesūcināta HAP implantācijas atradusi šī faktora izdali, kas, iespējams, saistās ar zāļu primāro nomācošo ietekmi uz implantātam apkārtējiem audiem. Savukārt *Reinis et al.* (2011) divas un 4 nedēļas pēc stikla-kalcija fosfāta keramikas implantācijas trušiem novēroja paaugstinātu IL-10 ekspresiju ap biomateriālu, kas bija apstrādāts ar *P. aeruginosa* kultūru, kā arī to, ka divu un četru nedēļu implantācijas laiks neietekmē IL-10 ekspresiju biomateriālu implantācijas gadījumos. Interesanti šeit atzīmēt *Velard et al.* (2013) pētījumu, kurā autori norāda uz biomateriāla sastāva lomu audu reģenerācijā, proti, HAP un β -trikalcija fosfātam piemītošo augsto osteoindukciju un to, ka šo biomateriālu un apkārtējo audu savstarpējās iedarbības rezultātā var tikt inducēta imūnsistēmas šūnu atbildes reakcija, kas var būt dažādi izteikta. Būtiski ir atzīmēt arī *Hoene et al.* (2015) pētījumu, kurā

56 dienas pēc virsmas modificēta titāna intramuskulāras implantēšanas žurkām autori novēroja statistiski nozīmīgu korelāciju starp proinflatōro citokīnu interferona γ un IL-2 ekspresiju un CD-68 pozitīvu monocītu infiltrācijā, kamēr korelācija netika novērota starp pretiekaisuma citokīnu IL-10, IL-4 ekspresiju un iekaisuma šūnu infiltrāciju.

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

4.2.7. β defensīns-2 (β Def-2)

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

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

β -defensīnu loma un funkcijas organisma antimikrobās aizsardzības sistēmā ir samērā plaši aprakstītas (*Crovella et al.*, 2005; *Veerayuthwilai et al.*, 2007; *Vordenbäumen et al.*, 2010; *Nakatsuji and Gallo*, 2012), tomēr ir maz un turklāt pretrunīgi dati par defensīnu izdalīšanos iekaisuma skartajos audos, īpaši kaulaudos biomateriālu implantācijā. Pētījumā par pacientiem ar periodontītu un periimplantītu (*Bissell et al.*, 2004) norādīts, ka augstāka β Def-2 ekspresija tika novērota tieši veselajos blakus audos, nevis periodontīta un periimplantīta zonās. Savukārt citā pētījumā par osteomielīta pacientiem (*Varoga et al.*, 2008) atrasts, ka salīdzinoši lielāka β Def-2 ekspresija ir osteomielīta skartajās, nevis kontroles zonas audos. *Reinis et al.* (2011) divas un četras nedēļas pēc stikla-kalcija fosfāta keramikas implantācijas trušiem novēroja izteiktāku β Def-2 ekspresiju audos pēc divām nedēļām gan biomateriāla apvidū, gan kontroles audos. Tomēr atrade nesenākos pētījumos liecina, ka β Def-2 ekspresija pārsvarā norit implantācijas rajonā, nevis kontroles audos. Piemēram, *Ertugrul et al.* (2014) pētījumā pacientiem ar periimplantītu novērojuši augstāku β Def-2 līmeni periimplantāta audos, ko autori saista ar audu atbildes reakciju uz implantāciju (kas bija noteicošā arī mūsu pētījumā) un kaula resorbciju un mikrobu savairošanos audos ap implantātu. Interesanti atzīmēt arī *Warnke et al.* (2013) pētījumu, kurā, mezenhimālo šūnu, osteoblastu, keratinocītu šūnu kultūras inkubējot ar β Def-2, konstatēja labu biosaderību un pat šī proteīna stimulējošu ietekmi uz minēto šūnu proliferatīvo aktivitāti. Tomēr autori norāda, ka šī atrade nav pārliecinoša un būtu nepieciešami turpmāki pētījumi

par dažādu šūnu proliferatīvo aktivitāti defensīnu ietekmē dentālo implantātu funkcionālajā virsmā.

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

4.2.8. Apoptozes atrade

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

Mūsu atrade sakrīt ar citu autoru datiem, kas skaidro gan apoptozes un iekaisuma savstarpēji neatkarīgu norisi, gan iekaisuma izraisītu šūnu apoptozi, gan to, ka apoptoze netieši pat inhibē iekaisuma attīstību. Piemēram, *Fadok et al.* (1998) un *Savil et al.* (2000) aprakstījuši, ka apoptozes jeb programmētās šūnu nāves ceļā šūnu komponentu pārstrādi nodrošina kā makrofāgi, tā dendrītiskās šūnas, bet netiek atbrīvoti intracelulārie komponenti, tādējādi neradot iekaisumu pašas apoptozes norises laikā. Šeit interesanti arī atzīmēt

Fadok et al. (1998) un *Savil et al.* (2000) pieņēmumu, ka receptoru un opsonīnu piesaiste apoptotisko šūnu virsmas ligandiem nodrošina to atpazīšanu un modificē fagocitozi, un tādējādi tiek inhibēta iekaisuma mediatoru atbrīvošana un palielināta TGF- β 1 produkcija. Arī *Peng et al.* (2007) apstiprina minēto pieņēmumu, skaidrojot, ka dendrītiskajām šūnām, nonākot kontaktā ar apoptiskajām šūnām, tiek nomākta citokīnu izdāle un tās nenobriest, tādējādi iekaisuma rašanās netiek nekādi veicināta. Turpretī *Gamonal et al.* (2001) aprakstījuši, ka hroniska iekaisuma gadījumā aktivizējas apoptotiskais process un palielinās apoptotisko šūnu skaits, kas līdzinās atradei **3 mēnešus** pēc implantācijas mūsu pētījumā. Interesanti atzīmēt vairākus pētījumus par biomateriālu ietekmi uz apoptozi, kuru atrade sakrīt ar mūsu pētījumā novēroto, ka HAP veicina šūnu apoptozi. Piemēram, *Salma et al.* (2009) divas nedēļas pēc nepiesātināta un ar lidokaīnu piesātināta HAP implantācijas novēroja salīdzinoši daudz apoptotisko šūnu un arī TGF- β 1 saturošo osteocītu skaitu eksperimenta audos, bet vienmērīgi daudz IL-10 pozitīvo šūnu gan eksperimenta, gan kontroles audos. *Shi et al.* (2009) cilvēka osteoblastos *in vitro* novēroja, ka HAP daļiņas veicina apoptozi un tās intensitāte ir atkarīga no to izmēra, bet neatkarīgi no tā šim materiālam ir laba biosaderība. Arī *Xu et al.* (2012) dažāda izmēra, formas un virsmas HAP daļiņu pētījumā žurku osteoblastos *in vitro* novēroja, ka HAP nomāc minēto šūnu aktivitāti, bet vienlaikus veicina šūnu apoptozi, kuras izteiktība savukārt ir atkarīga no šo daļiņu izmēra un formas. Tajā pašā laikā ir atrodami dati, kas liecina, ka apoptozes saistība ar biomateriāla veidu agrīnā implantācijas periodā nav pārliecinoša. Piemēram, *Bombonato-Prado et al.* (2009) PMMA un HAP materiālu pētījumā, izmantojot cilvēka osteoblastu kultūru, pēc 7 dienām izmaiņas apoptozi regulējošo gēnu analīzē nenovēroja.

Mūsu pētījuma vēlākos pēcimplantācijas laikos – **4,5, 6 un 8 mēnešus** pēc implantācijas – tika konstatēta apoptotisko šūnu skaita pakāpeniska samazināšanās no vidēji daudz apoptotisko šūnu α -trikalcija fosfāta ar dažādu

pH rajonā līdz maz apoptotisko šūnu pēc **6 un 8 mēnešiem** HAP rajonā. Minētā atrade būtu saistāma arī ar antimikrobo proteīnu, proinflaturo un antiinflaturo proteīnu ekspresijas samazināšanos **4,5, 6 un 8 mēnešus** pēc implantācijas, kas apliecina iekaisuma un apoptotiskā procesa savstarpējo saistību. Mazāk izteiktais apoptozes process mūsu pētījumā pēc **4,5 mēnešiem** būtu saistāms arī ar šūnu funkcionālās aktivitātes izmaiņām (tās samazināšanos), ko pamato arī OPG samazinātā izdala mūsu pētījumā. Savukārt pēc **6 mēnešiem** nomainās šūnu funkcionālā aktivitāte, zūdot traumas ietekmei uz balstaudiem, un **8 mēneši** pēc implantācijas ir laiks, kad balstaudu funkcionālā aktivitāte pēc implantācijas procesa ir atjaunota, par ko liecina OPG, OP un OC ekspresijas aktivitātes atjaunošanās. Literatūrā praktiski nav atrodami pētījumi par mūsu eksperimentā izmantotajiem biomateriāliem un apoptozes saistību šajos implantācijas laika periodos, bet saistībā ar 4 un 6 mēnešu pēcimplantācijas laiku interesanti atzīmēt *Ibares-Frias et al.* (2015) novērojumu acs audos, kurā autori apraksta aktīvu apoptozi implantācijas periodā līdz 72 stundām, bet vēlākā periodā, t. sk. pēc 1, 3, 4 un 6 mēnešiem novēroja tikai atsevišķas apoptotiskas šūnas, ko autori saista ar iekaisumu un aktīvāku audu reģenerāciju agrīnos pēcimplantācijas periodos.

Literatūrā atrodami interesanti dati par OP, iekaisuma citokīnu un apoptozes procesa saistību. Izrādās, ka OP stimulē imūno šūnu spēju izdalīt IL-1, IL-6 un TNF, bet inhibē apoptozi (*Sodek et al.*, 2000). Mūsu pētījumā OP inhibējošā ietekme netika novērota, tieši pretēji – **3 mēnešu** periodā, kad tika konstatēta paaugstināta OP ekspresija, bija arī salīdzinoši liels, kaut arī variabls apoptotisko šūnu skaits. Acīmredzot šeit būtiska ir iekaisuma un biomateriāla ietekmes selektivitātes kombinācija, kas mūsu gadījumā ir attiecināma gan uz “tīru” HAP materiālu, gan trikalcija fosfāta un polimēra tipa implantātiem.

Otrs svarīgs faktors biomateriālu implantāciju gadījumos ir traumatisks bojājums. *Web et al.* (1997) un *Ratner et al.* (2013) norādījuši, ka biomateriālu implantācijas process ir saistīts ar tiešu mehānisku iedarbību uz audiem, kas ir

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

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

5. SECINĀJUMI

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

5. Izteiktā kaulaudu pamatvielas proteīna OC saturošo šūnu vislielākais daudzums 3 mēnešus pēc apdedzinātu HAP granulu, ar PCL pārklāta HAP, β -TCP-2 un nekomerciālā PMMA implantācijas liecina par tieši šo biomateriālu selektīvu kaulaudu mineralizācijas stimulāciju.
6. Izteiktā proinflatōro citokīnu – IL-1, IL-6 un IL-8 ekspresija 3 mēnešus pēc dažādu biomateriālu implantācijas liecina par audu atbildes reakciju gan uz traumu, gan uz biomateriālu, kas rada šūnu funkcionālo izsīkumu 4,5 mēnešus pēc implantācijas, bet vēlāk atjaunojas, liecinot par slēptā iekaisuma pakāpenisku izzušanu.
7. Pretiekaisuma citokīnam IL-10 raksturīga pastāvīga izdāle kaulaudos pēc dažādu biomateriālu, selektīvi pēc komerciālā PMMA cementa, implantācijas. Vislielākā IL-10 saturošo šūnu atrade 3 mēnešus pēc implantācijas liecina, ka šajā laikā visaktīvāk tiek nomākts biomateriālu radītais iekaisums, bet IL-10 saturošo šūnu trūkums pēc 4,5 mēnešiem liecina, ka šūnu lokālās aizsardzības sistēma ir izsīkususi.
8. Organisma galvenā antimikrobā proteīna β Def-2 sākotnēji izteiktā izdāle kaulaudos 3 mēnešus pēc implantācijas korelē ar iekaisuma norisi un proinflatōro un antiinflatōro citokīnu izdāli, un, iekaisumam izzūdot, lēnām sāk atjaunoties pēc 6 un 8 mēnešiem tikai kontroles pusē. Šī atrade kombinācijā ar biomateriālu selektīvu ietekmes trūkumu liecina par kaulaudos primāri noritošo iekaisuma/traumatisko pārmaiņu novēršanu ar sekojošu gausu antimikrobā proteīna izdāles atjaunošanos.
9. Apoptoze biomateriālu implantācijas gadījumā noris traumatiska bojājuma radīta iekaisuma un biomateriāla selektivitātes kombinācijas ietekmē, kas aktīvāk izpaužas 3 mēnešus pēc implantācijas.
10. Audu reaktogenitātes/biosaderības morfolōģiskajā noteikšanā 3 mēnešus pēc implantācijas visbūtiskākais ir BMP-2/4 HAP un to saturošiem materiāliem un proinflatōrais citokīns IL-1 kalcija fosfāta un polimēra materiāliem, par ko liecina statistiski ticamā šo faktoru izdāle eksperimenta

kaulaudos; mazizteiktas faktoru izdales 4,5 mēnešus pēc implantācijas dēļ šis pēcimplantācijas laiks nebūtu iekļaujams diagnostikas algoritmā; HAP implantācijas gadījumā pēc 6 mēnešiem nosakāms proinflammatorais citokīns IL-8 un kaulu matricas proteīns OC, bet pēc 8 mēnešiem – proinflammatorais citokīns IL-6, antiinflammatorais citokīns IL-10 un kaulu šūnu aktivitātes marķieris OPG, jo minētajos laika periodos šo faktoru izdale atjaunojās normas robežās.

6. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Aebli N., Stich H., Schawalder P., et al. Effects of bone morphogenetic-2 and hyaluronic acid on the osseointegration of hydroxyapatite coated implants: an experiment study in sheep // *J Biomed Mater Res*, 2005; 73A: 295–302.
2. Aihara M., Tsuchimoto D., Takizawa H., et al. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced Interleukin-8 production by gastric cancer cell line, MKN45 // *Inf Immun*, 1997; 65: 3218–3224.
3. Ahn J. J., Cho S. A., Byrne G., et al. New bone formation following sinus membrane elevation without bone grafting: histologic findings in humans // *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2011; 26 (1): 83–90.
4. Albrektsson T., Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osteointegration // *Eur Spine J*, 2001; 10 (2): S96–101.
5. Alikhami M., Alikhami Z., He H. Lipopolyscharides indirectly stimulate apoptosis and global induction of apoptotic genes in fibroblasts // *J Biol Chem*, 2003; 278: 52901–52908.
6. Anderson J. M. Biological responses to materials // *Ann Rev Mater Research*, 2001; 31: 81–110.
7. Anderson J., Ekdahl K. N., Lambris J. D., Nilsson B. Binding of C3 fragments on top of adsorbed plasma proteins during complement activation on a model biomaterial surface // *Biomaterials*, 2005; 26: 1477–1485.
8. Anderson J. M., Rodriguez A., Chang D. T. Foreign-body reactions to biomaterials // *Semin in Immunology*, 2008; 20: 86–100.
9. Arikan F., Buduneli N., Kütükçüler N. Osteoprotegerin levels in peri-implant crevicular fluid // *Clin Oral Implants Res*, 2008; 19 (3): 283–288.
10. Bagambisa F. B., Kappert H. F., Schili W. Cellular and molecular events at the implant surface // *J Craniomaxillfac Surg*, 1994; 22: 12–17.
11. Baggiolini M., Clark–Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine // *FEBS letters*, 1992; 307: 97–101.
12. Bantel H., Beikler T., Flemmig T. F., Schulce-Osthoff K. Caspase activation is involved in chronic periodontitis // *FEBS Lett*, 2005; 579: 5559–5564.
13. Baroud G., Böhner M. Biomechanical impact of vertebroplasty – postoperative biomechanics of vertebroplasty // *Joint Bone Spine*, 2006; 76: 144–150.
14. Bas E., Gupta C., Van De Water T. R. A novel organ of corti explant model for the study of cochlear implantation trauma // *Anat Rec (Hoboken)*, 2012; 295 (11): 1944–1956. doi: 10.1002/ar.22585.
15. Baslé M. F., Chopard D., Grizon F., et al. Osteoclastic resorption of Ca-P biomaterials implanted in rabbit bone // *Calcif Tissue Int*, 1993; 53 (5): 348–356.
16. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation // *J Periodontol*, 1993; 64 (5): 456–460.

17. Bissell J., Joly S., Johnson G. K., et al. Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease // *J Oral Pathol Med*, 2004; 33 (5): 278–285.
18. Blouin S., Baslé M. F., Chappard D. Interactions between microenvironment and cancer cells in two animal models of bone metastasis // *Br J Cancer*, 2008; 98 (4): 809–815.
19. Bombonato-Prado K. F., Bellesini L. S., Junta C. M., et al. Microarray-based gene expression analysis of human osteoblasts in response to different biomaterials // *J Biomed Mater Res A*, 2009; 88 (2): 401–408. doi: 10.1002/jbm.a.31701.
20. Brånemark P. I. Osseointegration and its experimental background // *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 1983; 50 (3): 399–410.
21. Broughton I. I. G., Jnais J. E., Attinger C. E. The basic science of wound healing // *Plastic and Reconstruction Surgery*, 2006; 117 (7): 12S–34S.
22. Brown B. N., Ratner B. D., Goodman S. B., et al. Macrophage polarization: an opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine // *Biomaterials*, 2012; 33 (15): 3792–3802.
23. Busscher H. J., van der Mei H. C., Subbiahdoss G, et al. Biomaterial-associated infection: locating the finish line in the race for the surface // *Sci Transl Med*, 2012; 4 (153): 153rv10.
24. Butler W. T., Ridal A., McKee M. D. Osteopontin // *Principles of bone biology* / Bilezikian J. P., Raisz L. G., Rodan G. A., editors. – San Diego, CA: Academic Press. – Pp. 167–181.
25. Chazono M., Tanaka T., Kitasato S., et al. Electron microscopy study on bone formation and bioresorption after implantation of beta-tricalcium phosphate in rabbit models // *J Orthop Sci*, 2008; 13 (6): 550–555. doi: 10.1007/s00776-008-1271-1.
26. Chen Y., Wang J., Zhu X. D., et al. Enhanced effect of β -tricalcium phosphate phase on neovascularization of porous calcium phosphate ceramics: in vitro and in vivo evidence // *Acta Biomater*, 2015; (1) 11: 435–448. doi: 10.1016/j.actbio.2014.09.028.
27. Cho H. J., Cho H. J., Kim H. S. Osteopontin: a multifunctional protein at the crossroads of inflammation, atherosclerosis, and vascular calcification // *Curr Atheroscler Rep*, 2009; 11 (3): 206–213.
28. Choi S. T., Kim J. H., Kang E. J., et al. Osteopontin might be involved in bone remodelling rather than in inflammation in ankylosing spondylitis // *Rheumatology*, 2008; 47 (12): 1775–1779.
29. Crotti T. N., Smith M. D., Findlay D. M., et al. Factors regulating osteoclast formation in human tissues adjacent to peri-implant bone loss: expression of receptor activator NF κ B, RANK ligand and osteoprotegerin // *Biomaterials*, 2004; 25 (4): 565–573.
30. Crotti T. N., Smith M. D., Hirsch R. S., et al. Receptor activator NF κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis // *J Perio Res*, 2003; 38: 380–387.

31. Crotti T. N., Dharmapatni A. A. S. S. K., Alias E., Haynes D. R. Osteoimmunology: major and costimulatory pathway expression associated with chronic inflammatory induced bone loss // *Journal of Immunology Research*, 2015; 2015: 13 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/281287>.
32. Crovella S., Antcheva N., Zelezetsky I., et. al. Primate β -defensins – structure, function and evolution // *Current Protein and Peptide Science*, 2005; 6: 7–21.
33. Dale B. A., Kimball J. R., Krisanaprakornkit S. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva // *J Periodontal Res*, 2001; 36: 285–294.
34. Davis J., Tucci M., Franklin L. The effects of growth factors on the production of osteopontin and osteocalcin // *Biomed Sci Instrum*, 2006; 42: 31–36.
35. De Jong D. S., van Zoelen E. J. J., Bauerschmidt S., et al. Microarray analysis of bone morphogenetic protein, transforming growth factor β , activin early response genes during osteoblastic cell differentiation // *J Bone Miner Res*, 2002; 17: 2119–2129.
36. De Wilde E. A., Jimbo R., Wennerberg A., et al. The soft tissue immunologic response to hydroxyapatite-coated transmucosal implant surfaces: a study in humans // *Clin Implant Dent Relat Res*, 2015; 17 (1): 65–74. doi: 10.1111/cid.12128.
37. Dinarello C. A. Biology of interleukin 1 // *J FASEB*, 1988; 2: 108–115.
38. Dinarello C. A. The interleukin-1 family: 10 years of discovery // *J FASEB*, 1994; 8 (15): 1314–1325.
39. Dommisch H., Winter J., Açil Y., et. al. Human beta-defensin (HBD-1, -2) expression in dental pulp // *Oral Microbiol Immunol*, 2005; 20 (3): 163–166.
40. El-Ghannam A. Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering // *Expert Rev Med Devices*, 2005; 2 (1): 87–101.
41. Eyckmans J., Roberts S. J., Bolander J., et al. Mapping calcium phosphate activated gene networks as a strategy for targeted osteoinduction of human progenitors // *Biomaterials*, 2013; 34 (19): 4612–4621. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.011.
42. Endres S., Wilke M., Knöll P., et al. Comparative in vitro analysis of vacuum plasma-sprayed titanium implants–evaluation of OPG, osteocalcin and AP expression // *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 2006; 144 (6): 632–638.
43. Ertugrul A. S., Tekin Y., Alpaslan N. Z., et al. Comparison of peri-implant crevicular fluid levels of adrenomedullin and human beta defensins 1 and 2 from mandibular implants with different implant stability quotient levels in nonsmoker patients // *J Periodontal Res*, 2014; 49 (4): 480–488. doi: 10.1111/jre.12127.
44. Eskdale J., Kube D., Tesch H., Gallagher G. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence // *Immunogenetics*, 1997; 46: 120–128.
45. Fadok V. A., Bratton D. L., Konowal A., et al. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, PAF // *Journal of Clinical Investigation*, 1998; 101: 890–898.

46. Fantner G. E., Hassenkam T., Kindt J. H., et al. Sacrificial bonds and hidden length dissipate energy as mineralized fibrills separate during bone fracture // *Nat Mater*, 2005; 4: 612–616.
47. Feurino L. W., Zhang Y., Bharadwaj U., et al. IL-6 stimulates Th2 type cytokine secretion and upregulates VEGF and NRP-1 expression in pancreatic cancer cells // *Cancer Biol Ther*, 2007; 6 (7): 1096–1100.
48. Fischer U., Janicke R. U., Schulze–Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates // *Cell Death Differ*, 2003; 10: 76–100.
49. Fillatreau S., Gray D., Anderton S. M. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology // *Nat Rev Immunol*, 2008; 8: 391–397.
50. Froum S. J., Wallace S. S., Cho S. C., et al. Histomorphometric comparison of a biphasic bone ceramic to anorganic bovine bone for sinus augmentation: 6- to 8-month postsurgical assessment of vital bone formation. A pilot study // *Int J Periodontics Restorative Dent*, 2008; 28 (3): 273–281.
51. Fu Y. Ch., Nie H., Ho M.L., et al. Optimized bone regeneration based on sustained release from three-dimensional fibrous PLGA/HAp composite scaffolds loaded with BMP-2 // *Biotech and Bioeng*, 2008; 99 (4): 996–1006. doi:10.1002/bit.
52. Fujita R., Yokoyama A., Nodasaka Y., et al. Ultrastructure of ceramic-bone interface using hydroxyapatite and β -tricalcium-phosphate ceramics and replacement mechanism of β -tricalcium phosphate in bone // *Tissue Cell*, 2003; 35: 427–440.
53. Funk C. D. Prostaglandins and leukotriens: advances in eicosanoid biology // *Science*, 2001; 294: 1871.
54. Galindo-Moreno P., Avila G., Fernandez-Barbero J. E., et al. Clinical and histological comparison of two different composite grafts for sinus augmentation: a pilot clinical trial // *Clin Oral Implants Res*, 2008; 19 (8): 755–759.
55. Gamonal J., Bascones A., Acevedo A. Apoptosis in chronic adult periodontitis analyzed by in situ breaks, electron microscopy, and immunohistochemistry // *J Periodontol*, 2001; 72: 517–525.
56. Garlet T. P., Coelho U., Silva J. S., Garlet G. P. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans // *Eur J Oral Sci*, 2007; 115 (5): 355–362.
57. Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation // *J Cell Biol*, 1992 (119): 493–501.
58. Gaur U., Aggarwal B. B. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of TNF superfamily // *Biochem Pharmacol*, 2003; 66 (8): 1403–1408.
59. Giachelli C. M., Liaw L., Murry C. E., et al. Osteopontin expression in cardiovascular diseases // *Ann NY Acad Sci*, 1995; 760: 109–126.
60. Giachelli C. M., Lombardi D., Johnson R. J., et al. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli *in vivo* // *Am J Pathol*, 1998; 152: 353–358.

61. Gilmour P. S., Rahman I., Donaldson K., MacNee W. Histone acetylation regulates epithelial IL-8 release mediated by oxidative stress from environmental particles // *American J of Physiology*, 2003; 284 (3): 533–540.
62. Gonçalves G., Portolés M. T., Ramírez-Santillán C, et. al. Evaluation of the *in vitro* biocompatibility of PMMA/high-load HA/carbon nanostructures bone cement formulations // *J Mater Sci Mater Med*, 2013; 24 (12): 2787–2796. doi: 10.1007/s10856-013-5030-2.
63. Goodman S. B., Huie P., Song Y., et al. Cellular profile and cytokine production at prosthetic interfaces. Study of tissues retrieved from revised hip and knee replacements // *J Bone Jt Surg*, 1998; 80-B: 531–539.
64. Haake S. K., Huang G. T. J. Molecular biology of the host-microbe interaction in periodontal diseases (selected topics) // Newman, Takei, Carranza (Eds) *Clinical periodontology*. – Philadelphia: W. B. Saunders, 2002. – P. 162.
65. Habraken W. J. E. M., Wolke J. G. C., Jansen J. A. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering // *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007; 59: 234–248.
66. Hamada K., Hirose M., Yamashita T., Ohgushi H. Spatial distribution of mineralized bone matrix produced by marrow mesenchymal stem cells in self-assembling peptide hydrogel scaffold // *J Biomed Mater Res A*, 2008; 84: 128–136.
67. Harada Y. Experimental studies of healing process on compound blocks of hydroxyapatite (HAP) particles and tricalcium phosphate (TCP) powder implantation in rabbit mandible-comparison of HAP/TCP ratios and plastic methods // *Shikwa Gakuho*, 1989; 89 (2): 263–297.
68. Haynes D. R., Barg E., Crotti T. N., et al. Osteoprotegerin (OPG) expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies, oostoarthritis and normal controls // *Rheumatol*, 2003; 43: 1–12.
69. Haynes D. R., Crotti T. N., Potter A. E., et al. The osteoclastogenic molecules RANKL and RANK are associated with periprosthetic osteolysis // *J Bone Jt Surg Br*, 2001; 83B: 90–111.
70. Henson P. M. The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes: II. Mechanisms of releaseduring phagocytosis, and adherence to nonphagocytosable surfaces // *J Immunol*, 1971; 107: 1547.
71. Higgins D. M., Basaraba R. J., Hohnbaum A. C., et al. Localized immunosuppressive environment in the foreign body response to implanted biomaterials // *Am J Pathol*, 2009; 175 (1): 161–170.
72. Hiraga T., Ninomiya T., Hosoya A., et al. Formation of bone-like mineralized matrix by periodontal ligament cells in vivo: a morphological study in rats // *J Bone Miner Metab*, 2009; 27 (2): 149–157.
73. Hoene A., Patrzyk M., Walschus U., et al. Systemic IFN γ predicts local implant macrophage response // *J Mater Sci Mater Med*, 2015; 26 (3): 131. doi: 10.1007/s10856-015-5476-5.
74. Holding C. A., Findlay D. M., Stamekov R. et al. The correlation of RANK, RANKL and TNF- α expression with bone loss volume and polyethylene wear debris around hip implants // *Biomaterials*, 2006; 27 (30): 5212-5219.

75. Holm E., Gleberzon J. S., Liao Y., et al. Osteopontin mediates mineralization and not osteogenic cell development in vitro // *Biochem J*, 2014; 464 (3): 355–364. doi: 10.1042/BJ20140702.
76. Holt G., Murnaghan C., Reilly J., Meek R. M. The biology of aseptic osteolysis // *Clin Orthop Relat Res*, 2007; 460: 240.
77. Hsu S. M., Raine L., Fanger H. Use of avidin–biotin–peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAS) procedures // *J Histochem Cytochem*, 1981; 29: 577–580.
78. Hunter G. K. Role of osteopontin in modulation of hydroxyapatite formation // *Calcif Tissue Int*, 2013; 93 (4): 348–354. doi: 10.1007/s00223-013-9698-6.
79. Inazama J., Itoh N., Abe T., Nagata S. Assignment of the human Fas antigen gene (Fas) to 10q24.1 // *Genomics*, 1992; 14 (3): 821–822.
80. Ibares-Frías L., Gallego P., Cantalapedra-Rodríguez R., et al. Tissue reaction after intrastromal corneal ring implantation in an experimental animal model // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2015; 253(7): 1071–1083. doi: 10.1007/s00417-015-2959-5.
81. Janssens W., Nuytten H., Dupont L. J., et al. Genomic copy number determines functional expression of {beta}-defensin 2 in airway epithelial cells and associates with chronic obstructive pulmonary disease // *Am J Respir Crit Care Med*, 2010; 182 (2): 163–169.
82. Jia H., Wang J., François F., et al. Molecular and cellular mechanisms of loss of residual hearing after cochlear implantation // *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2013; 122 (1): 33–39.
83. Jiang C., Li Z., Quan et al. Osteoimmunology in orthodontic tooth movement // *Oral Diseases*, 2015; 21: 694–704.
84. Jiranek W. A., Machado M., Jasty M., et al. Production of cytokines around loosened cemented acetabular components // *J Bone Jt Surg*, 1993; 75-A: 863–879.
85. Jones L. C., Frondoza C., Hungerford D. S. Effect of PMMA particles and movement on an implant interface in a canine model // *J Bone Joint Surg*, 2001; 83-B: 448–458.
86. Kamitakahara M., Ohtsuki C., Miyazaki T. Review paper: behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition // *J Biomater Appl*, 2008; 23 (3): 197–212.
87. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system // *Endocrinology*, 2001; 142 (12): 5050–5055.
88. Kiernan J. A. *Histological and histochemical methods: theory and practice*. – Bloxham, UK: Scion, 2008. – Pp. 141–174.
89. Kim S. B., Kim Y. J., Yoon T. L., et al. The characteristics of a hydroxyapatite-chitosan-PMMA bone cement // *Biomaterials*, 2004; 25 (26): 5715–5723.

90. Klokkevold P. R., Jovanovic S. A. Advanced implant surgery and bone grafting techniques // Newman, Takei, Carranza's clinical periodontology. – 9th ed. – Philadelphia: W. B. Saunders, 2002. – Pp. 907–908.
91. Kokesch-Himmelreich J., Schumacher M., Rohnke M., et al. ToF-SIMS analysis of osteoblast-like cells and their mineralized extracellular matrix on strontium enriched bone cements // *Biointerphases*, 2013; 8 (1): 17. doi: 10.1186/1559-4106-8-17.
92. Kokubo T. *Bioceramics and their clinical applications*. – CRC Press, 2008. – P. 760.
93. König B., Forger S. E., Mascaro M. B., Beck T. J. Biocompatibility of the polyurethane resin of the castor bean inserted into alveolar bone of the dog // *Anat Anz*, 1999; 181: 581–584.
94. Konttinen Y. T., Lappalainen R., Laine P., et al. Immunohistochemical evaluation of inflammatory mediators in failing implants // *Int J Periodontics Restorative Dent*, 2006; 26 (2): 135.
95. Kuula H., Salo T., Pirilä E., Hagström J. et al. Human beta-defensin-1 and -2 and matrix metalloproteinase-25 and -26 expression in chronic and aggressive periodontitis and in peri-implantitis // *Arch Oral Biol*, 2008; 53 (2): 175–186.
96. Kumar A., Webster T. J., Biswas K., Basu B. Flow cytometry analysis of human fetal osteoblast fate processes on spark plasma sintered hydroxyapatite-titanium biocomposites // *J Biomed Mater Res A*, 2013; 101 (10): 2925–2938. doi: 10.1002/jbm.a.34603.
97. Kumar V., Abbas A., Fausto N. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. – 7th ed. – Elsevier Saunders, 2005. – P. 48.
98. Kumar V., Abbas A., Fausto N. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. – 7th ed. – Elsevier Saunders, 2005. – Pp. 112–116.
99. Lacey D. L., Timms E., Tan H. L., et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation // *Cell*, 1998; 93: 165–176.
100. Langhans C., Weber-Carstens S., Schmidt F., et al. Inflammation-induced acute phase response in skeletal muscle and critical illness myopathy // *PLoS One*, 2014; 9 (3): e92048. doi: 10.1371/journal.pone.0092048.
101. Launey M. E., Buehler M. J., Ritchie R. O. On the mechanistic origins of toughness in bone // *Annu Rev Mater Res*, 2010; 40: 25–53.
102. Laurencin C. T., Khan Y. *Regenerative engineering*. – CRC Press Taylor & Francis group, 2013. – Chapter 7. – Pp. 166–178.
103. Lazzara R. J., Testori T., Trisi P., et al. A human histologic analysis of osseotite and machined surfaces using implants with 2 opposing surfaces // *Int J Periodontics Restorative Dent*, 1999; 19 (2): 117–129.
104. Lee A. J., Hodges S., Eastell R. Measurement of osteocalcin // *Annual of Clinical Biochemistry*, 2000; 37: 432–436.
105. Lee K. W., Bae C. M., Jung J. Y., et al. Surface characteristics and biological studies of hydroxyapatite coating by a new method // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2011; 98B (2): 395–407. doi: 10.1002/jbm.b.31864; Pubmed.

106. Lee N. K., Sowa H., Hinoi E., et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton // *Cell*, 2007; 130 (3): 456–469. doi:10.1016/j.cell.2007.05.047; Pubmed.
107. Leite F. R. M., Ramalho L. T. O. Bone regeneration after demineralized bone matrix and castor oil polyurethane implantation // *J Appl Oral Sci*, 2008; 16 (2): 122–126.
108. Lentsch A. B., Ward P. A. Regulation of inflammatory vascular damage // *J Pathol*, 2000; 190: 343.
109. Li Y. S., Deng Z. H., Zeng C., Lei G. H. Role of osteopontin in osteosarcoma // *Med Oncol*, 2015; 32 (1): 449. doi: 10.1007/s12032-014-0449-y.
110. Liporace F. A., Breitbart E. A., Yoon R. S., et al. The effect of locally delivered recombinant human bone morphogenetic protein-2 with hydroxyapatite / tricalcium phosphate on the biomechanical properties of bone in diabetes-related osteoporosis // *J Orthoped Traumatol*, 2015; 16: 151–159.
111. Lombardi G., Perego S., Luzi L., Banfi G. A four-season molecule: osteocalcin. Updates in its physiological roles // *Endocrine*, 2015; 394–404.
112. Lovett D. H., Szamel M., Ryan J. L., et al. Interleukin 1 and the glomerular mesangium. I. Purification and characterization of a mesangial cell-derived autogrowth factor // *J Immunol*, 1986, 136: 3700–3705.
113. Lyritis G. P., Georgoulas T., Zafeiris G. Bone anabolic versus bone anticatabolic treatment of postmenopausal osteoporosis // *CP Ann NY Acad Sci*, 2010; 1205: 277–283.
114. Lü H. Z., Hu J. G. Expression of bone morphogenetic proteins-2/4 in neural stem cells and their lineages // *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2009; 69 (4): 441–447.
115. Majno G. Chronic inflammation: links with angiogenesis and wound healing // *Am J Pathol*, 1998; 153: 1035.
116. Mastrorade J. G., Monick M. M., Mukaida N., et al. Synergism between rhinoviruses infection and oxidant pollutant exposure enhances airway epithelial cell cytokine production // *J Infect Dis*, 1998; 177: 1275–1281.
117. Matsushima K., Oppenheim J. J. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL-1 and TNF // *Cytokine*, 1989; 1 (1): 2–13.
118. Miuyazaki T., Ohtsuki C., Kyomoto M., et al. Bioactive PMMA bone cement prepared by modification with methacryloxypropyltrimethoxysilane and calcium chloride // *J Biomed Mater Res A*, 2003; 67 (4): 1447–1423.
119. Miyatake S., Hara Y., Maeda K., et al. Hydroxyapatite implant for human periodontal osseous defects // *Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi*, 1989; 31 (1): 318–326.
120. Moghadam H. G., Sándor G. K., Holmes H. H., Clokie C. M. Histomorphometric evaluation of bone regeneration using allogenic and alloplastic bone substitutes // *J Oral Maxillofac Surg*, 2004; 62 (2): 202–213.
121. Moore K. W., de Wall M. R., Coffman R. L., O’Garra A. Interleukin-10 and Interleukin-10 receptor // *Annu Rev Immunol*, 2001; 19: 683–765.
122. Mosser D., Edwards J. P. Exploring the full spectrum of macrophage

activation // *Nature*, 2008; 8: 958–969.

123. McGuirk P., Mills K. H. G. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases // *Trends Immunol*, 2002; 23: 450–455.

124. Murata M., Akazawa T., Tazaki J., et al. Blood permeability of a novel ceramic scaffold for bone morphogenetic protein-2 // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2007; 81 (2): 469–475.

125. Nakagawa N., Kinoshita M., Yamaguchi K., et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoblast differentiation factor in osteoclastogenesis // *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; 253: 395–400.

126. Nakatsuji T., Gallo R. L. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas // *Journal of Investigative Dermatology*, 2012; 132: 887–895.

127. Nanci A. Content and distribution on noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density // *J Struct Biol*, 1999; 126: 256–269.

128. Nevins M., Camelo M., Nevins M. L., et al. Pilot clinical and histologic evaluations of a two-piece zirconia implant // *Int J Periodontics Restorative*, 2011; 31 (2): 157–163.

129. Neut D., Diercks R. L. Biomaterial-related infections in orthopaedic implants // G. Rakhorst, R. Ploeg (Eds.) *Biomaterials in modern medicine: the Groningen perspective*. – World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2008. – Pp. 169–189.

130. Ninomiya J. T., Struve J. A., Stelloh C. T., et al. Effects of hydroxyapatite particulate debris on the production of cytokines and proteases in human fibroblasts // *J Orthop Res*, 2001; 19 (4): 621.

131. Numerof R. P., Asadullah K. Cytokine and anti-cytokine therapies for psoriasis and atopic dermatitis // *BioDrugs*, 2006; 20 (2): 93–103.

132. Ohsawa K., Neo M., Matsuoka H., et al. Tissue responses around polymethylmethacrylate particles implanted into bone: analysis of expression of bone matrix protein mRNAs by in situ hybridization // *J Biomed Mater Res*, 2001; 15; 54 (4): 501–508.

133. Oppenheim J. J., Matsushima K., Larsen C. G., Anderson A. O. Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumor necrosis factor // *Immunology*, 1989; 68: 31–36.

134. Ostriker A., Horita H. N., Poczobutt J., et al. Vascular smooth muscle cell-derived transforming growth factor- β promotes maturation of activated, neointima lesion-like macrophages // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014; 34 (4): 877–886. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303214.

135. Pearce G., Yamaguchi Y., Munske G., Ryan C. A. Structure–activity studies of AtPep1, a plant peptide signal involved in the innate immune response // *Peptides*, 2008; 12: 2083–2089.

136. Peng Y., Martin D. A., Kenkel J., et al. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells // *Journal of Autoimmunity*, 2007; 29: 303–309.

137. Pillemer L., Blum L., Lepow I. H., et al. The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena // *Science*, 1954; 120: 279–285.
138. Pilmane M., Rumba I., Sundler F., Luts A. Patterns of occurrence and distribution of neuroendocrine elements in lungs of humans with chronic lung diseases // *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B*, 1998; 53: 144–152.
139. Podaropoulos L., Veis A. A., Papadimitriou A., et al. Bone regeneration using β -tricalcium phosphate in a calcium sulfate matrix // *J Oral Implantol*, 2009; 35 (1): 28–36.
140. Polzer K., Joosten L., Gasser J., et al. Interleukin-1 is essential for systemic inflammatory bone loss // *Ann Rheum Dis*, 2010; 69 (1): 284–290.
141. Qazi B. S., Tang K., Qazi A. Recent advances in underlying pathologies provide insight into interleukin-8 expression-mediated inflammation and angiogenesis // *International Journal of Inflammation*, 2011; (2011): 1–13. Article ID 908468.
142. Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J., Lemons J. E. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. – 3rd ed. – Elsevier, 2013. – p.xxvii.
143. Reinis A., Pilmane M., Stunda A., et al. An *in vitro* and *in vivo* study on the intensity of adhesion and colonization by *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on originally synthesized biomaterials with different chemical composition and modified surfaces and their effect on expression of TNF- α , β -defensin 2 and IL-10 in tissues // *Medicina*, 2011; 47 (10): 560–565.
144. Robey P. G., Fedarko N. S., Hefferan T. E., et al. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins // *J Bone Miner Res*, 1993; 8: 483–487.
145. Roldán J. C., Detsch R., Scafer S., et al. Bone formation and degradation of a high porous biphasic calcium phosphate ceramic in presence of BMP-7, VEGF and mesenchymal stem cells in a ectopic mouse model // *J Craniomaxillofac Surg*, 2010; 38 (6): 423–430.
146. Roodman G. D. Role of stromal-derived cytokines and growth factors in bone metastasis // *Cancer*, 2003; 97: 733–738.
147. Rosenthal G. J., Germolec D. R., Blazka M. E., et al. Asbestos stimulates IL-8 production from human lung epithelial cells // *J Immunology*, 1994; 153 (7): 3237–3244.
148. Ruckh T. T., Carroll D. A., Weaver J. R., Popat K. C. Mineralization content alters osteogenic responses of bone marrow stromal cells on hydroxyapatite / polycaprolactone composite nanofiber scaffolds // *J Funct Biomater*, 2012; 3 (4): 776–798.
149. Ruhé P. Q., Kroese-Deutman H. C., Wolke J. G., et al. Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants in cranial defects in rabbits // *Biomaterials*, 2004; 25 (11): 2123–2132.
150. Rui Y. F., Du L., Wang Y., et al. Bone morphogenetic protein 2 promotes transforming growth factor β 3-induced chondrogenesis of human osteoarthritic synovium-derived stem cells // *Chin Med J*, 2010; 123 (21): 3040–3048.
151. Ryan J. J., Kashyap M., Bailey D. Mast cell homeostasis: a fundamental

aspect of allergic disease // *Crit Rev Immunol*, 2007; 27: 15–32.

152. Saito N., Murakami N., Takahashi J., et al. Synthetic biodegradable polymers as drug delivery systems for bone morphogenetic proteins // *Adv Drug Deliv Rev*, 2005; 57: 1037–1048.

153. Saitoh M., Abiko Y., Shimabukuro S. Correlated expression of human beta defensin-1, -2, -3 mRNAs in gingival tissues of young children // *Arch Oral Biol*, 2004; 49 (10): 799–803.

154. Salma I., Pilmane M., Skagers A., et al. Early morphofunctional response of contact tissue after intraoral implantation in rabbit jaw of pure synthetic hydroxyapatite (Hap) bioceramic materials and Hap saturated with lidocaine // *Stomatologija*, 2009; 11 (4): 113–118.

155. Santarelli A., Mascitti M., Orsini G., et al. Osteopontin, osteocalcin and OB-cadherin expression in synthetic nanohydroxyapatite vs bovine hydroxyapatite cultured Osteoblastic-like cells // *J Biol Regul Homeost Agents*, 2014; 28 (3): 523–529.

156. Sarfati J. Bone building: perfect protein // *Journal of Creation*, 2004; 18 (1): 11–12.

157. Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation // *J Leukoc Biol*, 1997; 61: 375–380.

158. Savil J., Dransfield I., Gregory C., et al. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses // *Nature Reviews in Immunology*, 2000; 2: 965–975.

159. Scatena M., Liaw L., Giachelli C. M. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007; 27 (11): 2302–2309.

160. Schierano G., Canuto R. A., Navone R., et al. Biological factors involved in the osseointegration of oral titanium implants with different surfaces: a pilot study in minipigs // *J Periodontol*, 2005; 76 (10): 1710–1715.

161. Schmidt C., Steinbach G., Decking R., et al. IL-6 and PGE2 release by human osteoblasts on implant materials // *Biomaterials*, 2003; 24 (23): 4191.

162. Schminke B., Vom Orde F., Gruber R., et al. The pathology of bone tissue during peri-implantitis // *J Dent Res*, 2015; 94 (2): 354–361. doi: 10.1177/0022034514559128.

163. Sedlak T. W., Oltvai Z. N., Yang E., et al. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax // *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92 (17): 7834–7838.

164. Shaposhnikov J. G. Traumatology and orthopedy. – Moscow: Medicine, 1997. – Pp. 64–81.

165. Shen H. M., Pervaiz S. TNF receptor superfamily-induced cell death: redox dependent execution // *FASEB J*, 2006; 20 (10): 1589–1598.

166. Shepherd J. H., Best S. M. Calcium phosphates scaffolds for bone repair // *JOM*, 2011; 63 (4): 83–92.

167. Shi D. Introduction to biomaterials. – Tsinghua: University Press, 2006. – Pp. 253.

168. Shi Z., Huang X., Cai Y., et al. Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells // *Acta Biomater*, 2009; 5 (1): 338–345. doi: 10.1016/j.actbio.2008.07.023.
169. Simonet W. S., Lacey D. L., Dunstan C. R., et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density // *Cell*, 1997; 89 (2): 309–319.
170. Slutski L. I., Vetra J. J. Biocompatibility and reactogenicity of materials: a semantic and logical analysis of definitions and their practical significance // *Cells and Materials*, 1996, 6 (1-3): 137–142.
171. Sodek J., Ganss B., McKee M. D. Osteopontin // *Crit Rev Oral Biol Med*, 2000; 11 (3): 279–303.
172. Svensson S., Trobos M., Hoffman M., et al. A novel soft tissue model for biomaterial-associated infection and inflammation – bacteriological, morphological and molecular observations // *Biomaterials*, 2015; 41: 106–121. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.11.032.
173. Szebeni J., Barenholz Y. Handbook of harnessing biomaterials in nanomedicine: preparation, toxicity and application. – Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., 2012. – P. 311.
174. Talmadge K. Vertebral compression fracture treatments // S. M. Kurtz, A. A. Edidin (Eds.). *Spine technology handbook*. – Elsevier Academic Press, 2006. – Pp. 371–396.
175. Theodore J. Y., Tallquist M. D., Aicher A., et al. Osteoprotegerin, a crucial regulator of bone metabolism, also regulates B cell development and function 1 // *The Journal of Immunology*, 2001; (166) 3: 1482–1491.
176. Thomma B. P., Cammue B. P., Thevissen K. Plant defensins // *Planta*, 2002; 216 (2): 193–202.
177. Tobin G., Luts A., Sundler F., Ekström J. Peptidergic innervation of the major salivary glands of the ferret // *Peptides*, 1990; 11: 863–867.
178. Tracey K. J., Vlassara H., Cerani A. Peptide regulatory factors. Cachectin / tumor necrosis factor // *Lancet*, 1989; 1: 1122–1125.
179. Trampuz A., Zimmerli W. Prosthetic joint infections: up-date in diagnosis and treatment // *Swiss Med Wkly*, 2005; 135: 243–351.
180. Tremollieres F., Ribot C. Bone mineral density and prediction of non-osteoporotic disease // *Maturitas*, 2010; 65 (4): 348–351.
181. Trump B. F. Cell injury and cell death: apoptosis, oncosis, and necrosis // Acosta D. (Ed.) *Cardiovascular toxicology*. – 3rd ed. – London and New York: Taylor & Francis, 2001. – P. 105.
182. Tsai W. C., Liao C. J., Wu C. T., et al. Clinical result of sintered bovine hydroxyapatite bone substitute: analysis of the interface reaction between tissue and bone substitute // *J Orthop Sci*, 2010; 15 (2): 223–232.
183. Tseng W. P., Yang S. N., Lai C. H., Tang C. H. Hypoxia induces BMP-2 expression via ILK, Akt, mTOR, and HIF-1 pathways in osteoblasts // *J Cell Physiol*, 2010; 223 (3): 810–818.

184. Varoga D., Tohidnezhad M., Paulsen F., et al. The role of human beta-defensin-2 in bone // *J Anat*, 2008; 213 (6): 749–757.
185. Veerayutthwilai O., Byers M. R., Pham T. T., et al. Differential regulation of immune responses by odontoblasts // *Oral Microbiol Immunol*, 2007; 22 (1): 5–13.
186. Veis A. A., Papadimitriou S., Trisi P., et al. Osseointegration of osseotite and machined-surfaced titanium implants in membrane-covered critical-sized defects: a histologic and histometric study in dogs // *Clin Oral Implants Res*, 2007; 18 (2): 153–160.
187. Velard F., Braux J., Amedees J., Laquerriere P. Inflammatory cell response to calcium phosphate biomaterial particles: an overview // *Acta Biomater*, 2013; 9 (2): 4956–4963. doi: 10.1016/j.actbio.2012.09.035.
188. Verron I., Khairoun J., Bouler J. M. Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review // *Drug Discovery Today*, 2010; 15: 547–552.
189. Vij N., Sharma A., Thakkar M., et al. PDGF-driven proliferation, migration, and IL8 chemokine secretion in human corneal fibroblasts involve JAK2-STAT3 signaling pathway // *Molecular Vision*, 2008; 14: 1020–1027.
190. Vordenbäumen S., Pilic D., Otte J. M., et al. Defensin-mRNA expression in the upper gastrointestinal tract is modulated in children with celiac disease and *Helicobacter pylori*-positive gastritis // *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2010; 50 (6): 596–600.
191. Xu Z., Liu C., Wei J., Sun J. Effects of four types of hydroxyapatite nanoparticles with different nanocrystal morphologies and sizes on apoptosis in rat osteoblasts // *J Appl Toxicol*, 2012; 32 (6): 429–435. doi: 10.1002/jat.1745.
192. Yamada S., Heymann D., Bouler J. M., Daculsi G. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite, β -tricalcium phosphate ratios // *Biomaterials*, 1997; 18: 1037–1041.
193. Yamaguchi K., Anderson J. M. Biocompatibility studies of naltrexone sustained release formulations // *J Controlled Rel*, 1992; 19: 299–314.
194. Yang J. H., Kim H. J., Kim S. E., et al. The effect of bone morphogenetic protein-2-coated tricalcium phosphate/hydroxyapatite on new bone formation in a rat model of femoral distraction osteogenesis // *Cytotherapy*, 2012; 14 (3): 315–326. doi: 10.3109/14653249.2011.630728. Epub 2011 Nov 28.
195. Yang R. N., Ye F., Cheng L. J., et al. Osteoinduction by Ca-P biomaterials implanted into the muscles of mice // *J Zhejiang Univ Sci B*, 2011; 12 (7): 582–590.
196. Young M. F. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis // *Osteoporos Int*, 2003; 14: 35–42.
197. Yu Y. Y., Lieu S., Lu C., Colnot C. Bone morphogenetic protein 2 stimulates endochondral ossification by regulating periosteal cell fate during bone repair // *Bone*, 2010; 47 (1): 65–73.
198. Yun T. J., Chaudhary P. M., Shu G. L., et al. OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40 // *J Immunol*, 1998; 161 (11): 6113–6121.

199. Wang H. L., Garaicoa-Pazmino C., Collins A. et al. Protein biomarkers and microbial profiles in peri-implantitis // *Clin Oral Implants Res*, 2015. doi: 10.1111/clr.12708.
200. Wang P., Wu P., Siegel M. I. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kB (NFkB) activation in human monocytes // *J Bio Chem*, 1995; 270: 9558–9563.
201. Warnke P. H., Voss E., Russo P. A., et al. Antimicrobial peptide coating of dental implants: biocompatibility assessment of recombinant human beta defensin-2 for human cells // *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2013; 28 (4): 982–988. doi: 10.11607/jomi.2594.
202. Webb S. J., Harrison D. J., Wyllie A. H. Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease // *Adv Pharmacol*, 1997; 41: 1–34.
203. Wolff B., Burns A. R., Middleton J., Rot A. Endothelial cell “memory” of inflammatory stimulation: human venular endothelial cells store interleukin 8 in Weibel-Palade bodies // *J Exp Med*, 1998; 188 (9): 1757–1762. doi:10.1084/jem.188.9.1757.
204. Zambonin G., Colucci S., Cantatore F., Grano M. Response of human osteoblasts to polymethylmetacrylate in vitro // *Calcif Tissue Int*, 1998; 62 (4): 362–365.
205. Zhang Y., Zhang J., Korff S., et al. Delayed neutralization of interleukin 6 reduces organ injury, selectively suppresses inflammatory mediator, and partially normalizes immune dysfunction following trauma and hemorrhagic shock // *Shock*, 2014; 42 (3): 218–227.
206. Zheng B. L., Mingchao W., Cheng Y., Adekunle O. Molecular dynamics simulation of mechanical behavior of osteopontin-hydroxyapatite interfaces // *J Mechan Beh Biomed Mater*, 2014; 36: 12–20.
207. Zhou X., Schmidtke P., Zepp F., Meyer C. U. Boosting interleukin-10 production: therapeutic effects and mechanisms // *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 2005; 5 (4): 465–475.

7. PUBLIKĀCIJAS UN PREZENTĀCIJAS PAR PĒTĪJUMA TĒMU

Zinātniskie raksti

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

Tēzes un prezentācijas starptautiskās zinātniskās konferencēs

1. **Vamze-Liepina J.**, Pilmane M., Skagers A., Salms G., Loca D. Characteristic of osteopontin, osteocalcin and osteoproteģerin expression in rabbit bone tissue after the implantation of hydroxyapatite-containing

- biomaterials [poster presentation] // Abstract book: p. 191; International Conference on Functional Materials and Nanotechnologies, October 5–8, 2015, Vilnius, Lithuania.
2. **Vamze J.**, Pilmane M., Skagers A. Analysis of cellular death in the experimental bone tissue regarding the biomaterial implantation [oral presentation] // *Annals of Anatomy*, 2014; 196 (S1): 88–89; 18th Congress of International Federation of Associations of Anatomists/30th Congress of Chinese Society of Anatomical Science, August 6–8, 2014, Beijing, China.
 3. **Vamze J.**, Pilmane M., Skagers A. Bone tissue morphological characteristic by using routine investigation methods and Exact grunding system after the implantation of various bioceramic materials [poster presentation] // Abstract book: p. 53; Baltic Morphology VII Scientific Conference November 07–09, 2013, Riga, Latvia.
 4. **Vamze J.**, Pilmane M., Skagers A. Bone regeneration and host defense in rabbit bone after the implantation of pure and mixed hydroxyapatite and tricalcium phosphate [poster presentation] // *Virchows Archiv*, 2013; p. 323; Congress of European Society of Pathology, August 31–September 4, 2013, Lisbon, Portugal.
 5. **Vamze J.**, Pilmane M., Skagers A. Expression of bone regeneration proteins in rabbit bone tissue after the implantation of various bioceramic materials [poster presentation] // Abstract book: p. 29.; International Symposium on Bioceramics and Cells for Reinforcement of Bone, October 18–20, 2012, Riga, Latvia.
 6. **Vamze J.**, Pilmane M., Skagers A. Activity of host defense proteins in rabbit bone after pure hydroxyapatite and tricalcium phosphate and mixed tricalcium phosphate/hydroxyapatite implantation [poster presentation] // Scientific programm book: p. 35; International Symposium on Biomedical Engineering and Medical Physics, October 10–12, 2012, Riga, Latvia.

7. **Vamze J.**, Pilmane M., Skagers A. Bone regeneration and implantation of hydroxyapatite and tricalcium phosphate [poster presentation] // e-Abstract book, abstract No. 160; PER/IADR International Congress, September 12–15, 2012, Helsinki (Finland).
8. **Vamze J.**, Pilmane M., Skagers A. Expression of interleukins and defensins in the experimental rabbit bone tissue after implantation of different biomaterials [poster presentation] // Abstract book: p. 175; International Conference on Functional Materials and Nanotechnologies, April 17–20, 2012, Riga, Latvia.
9. **Vamze J.**, Pilmane M., Skagers A. Changes of regeneration ruling factors in rabbits lower jaw bone and surrounding soft tissue after hydroxyapatite implantation [poster presentation] // Abstract book: p. 60; 6th Conference of Baltic Morphology, September 21–24, 2011, Tartu, Estonia.

Tēzes un prezentācijas vietēja mēroga zinātniskās konferencēs Latvijā

1. **Vamze J.**, Pilmane M., Skaģers A. Apoptozes raksturojums truša kaulaudos pēc dažādu biomateriālu implantācijas [stenda prezentācija] // Tēžu grāmata: 325. lpp.; Rīgas Stradiņa universitātes zinātniskā konference, 10.–11.04.2014., Rīga, Latvija.
2. **Vamze J.**, Pilmane M., Skaģers A. Audu reaktogenitātes analīze trušu apakšžokļa kaulā pēc “tīra” un jaukta hidroksiapatīta un α -trikalcijs fosfāta implantācijas [stenda prezentācija] // tēzes elektroniski [www.arstubiedriba.lv]; Latvijas ārstu 7. kongress, 19.–20.09.2013., Rīga, Latvija.
3. **Vamze J.**, Pilmane M., Skaģers A. Kaulaudu reģeneratīvo funkciju un hidroksiapatīta un trikalcijs fosfāta implantātu mijiedarbība [stenda

prezentācija] // Tēžu grāmata: 295. lpp.; Rīgas Stradiņa universitātes zinātniskā konference, 21.–22.03.2013., Rīga, Latvija.

4. **Vamze J.**, Pilmane M., Skaģers A., Šalms Ģ., Irbe Z. Kaula morfoģenētiskā proteīna, osteoproteģerīna, osteopontīna, osteokalcīna ekspresija truša apakšžokļa un stilba kaulaudos pēc dažādu biokeramikas materiālu implantācijas [mutisks ziņojums] // Tēžu grāmata: 299. lpp.; Rīgas Stradiņa universitātes 11. zinātniskā konference, 29.–30.03.2012.

5. **Vamze J.**, Pilmane M. Kaulaudu reģeneratīvo procesu noteicošo faktoru izmaiņas truša apakšžokļa kaulā pēc HAp (hidroksiapatīta) implanta [stenda prezentācija] // Tēžu grāmata: 330. lpp.; Rīgas Stradiņa universitātes 10. zinātniskā konference, 14.–15.04.2011., Rīga, Latvija.

PATEICĪBAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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