Vladislavs Anaņjevs

**Divfāžu kalcija fosfāta
biokeramikas ietekme
uz osteoporotisku kaulu
biomehāniskiem rādītājiem
un minerālbūvumu
(eksperimentāls pētījums)**

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

Nozare – medicīniskā inženierija
Apakšnozare – biomehānika

Rīga, 2021

RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Vladislavs Ananjevs

ORCID 0000-0002-0498-1403

Divfāžu kalcija fosfāta biokeramikas ietekme
uz osteoporotisku kaulu biomehāniskiem
rādītājiem un minerālbīvējumu
(eksperimentāls pētījums)

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

Nozare – medicīniskā inženierija

Apakšnozare – biomehānika

Rīga, 2021

Promocijas darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātes Biomehānikas laboratorijā, Latvijā

Promocijas darba vadītāji:

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

Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

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

Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Zinātniskais konsultants:

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

Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. sc. ing. asociētā profesore **Kristīne Šalma-Ancāne**,

Rīgas Tehniskās universitātes Rūdolfa Čimdiņa Rīgas biomateriālu inovācijas un attīstības centrs, Latvija

Dr. med. profesors **Ilmārs Dūrītis**,

Latvijas Lauksaimniecības universitāte

Dr. med. **Simonas Grybauskas**,

Viļņas Universitāte, Lietuva

Promocijas darbs tiks aizstāvēts “Medicīnas bāzes zinātnes, tai skaitā farmācija” promocijas padomes atklātā sēdē 2021. gada 18. jūnijā plkst. 11.00, attālināti tiešsaistes platformā *Zoom*.

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

Promocijas padomes sekretārs:

Dr. biol. profesors **Pēteris Tretjakovs**

Saturs

Darbā izmantotie saīsinājumi	5
Ievads	6
Darba aktualitāte	6
Darba mērķis	8
Darba uzdevumi	9
Darba hipotēze	9
Pētījuma zinātniskā novitāte.....	9
Pētījuma uzbūve (dizains)	10
Pētījuma izpildīšanas vietas	10
Ētiskie aspekti	10
Darba struktūra un apjoms	11
1. Materiāls un metodes.....	12
1.1. Pētījuma materiāls.....	12
1.1.1. Dzīvnieku modelis.....	12
1.1.2. Biomateriālu sagatavošana	17
1.2. Pētījuma metodes	18
1.2.1. Biomehāniskā pētījuma metode	18
1.2.2. Rentģenoloģiskā pētījuma metode	25
1.2.3. Morfoloģiskā pētījuma metode.....	26
1.3. Datu statistiskās apstrādes metodes.....	27
2. Rezultāti.....	28
2.1. Biomehāniskā pētījuma un datu statistiskās apstrādes rezultāti augšstilba kaula paraugos.....	28
2.1.1. Graujošās deformācijas noteikšanas un datu statistiskās apstrādes rezultāti.....	28
2.1.2. Graujošā sprieguma noteikšanas un datu statistiskās apstrādes rezultāti.	30

2.1.3. Lieces moduļa noteikšanas un datu statistiskās apstrādes rezultāti	31
2.2. Biomehāniskā pētījuma un datu statistiskās apstrādes rezultāti apakšžokļa kaula paraugos.....	33
2.2.1. Graujošās deformācijas noteikšanas un datu statistiskās apstrādes rezultāti.....	33
2.2.2. Graujošā sprieguma noteikšanas un datu statistiskās apstrādes rezultāti.....	34
2.2.3. Lieces moduļa noteikšanas un datu statistiskās apstrādes rezultāti	35
2.3. Rentgenoloģiskā pētījuma un datu statistiskās apstrādes rezultāti augšstilba kaula paraugos.....	36
2.4. Rentgenoloģiskā pētījuma un datu statistiskās apstrādes rezultāti apakšžokļa kaula paraugos.....	37
2.5. Operēta un neoperēta augšstilba biomehānisko parametru un minerālblīvuma salīdzinājums pēc dažāda biomateriāla implantācijas	39
2.6. Morfoloģiskā pētījuma un datu statistiskās apstrādes rezultāti apakšžokļa kaula paraugos.....	42
3. Diskusija.....	44
Secinājumi.....	51
Izmantotā literatūra.....	52
Autora publikācijas un tēzes par pētījuma tēmu.....	56
Pateicības.....	59

Darbā izmantotie saīsinājumi

Abreviatūra	Nosaukums latviešu valodā	Nosaukums angļu valodā
GPa	Gigapaskāls	<i>Gigapascal</i>
HAP	Hidroksiapatīts	<i>Hydroxyapatite</i>
HU	Haunsfīlda vienības	<i>Hounsfield units</i>
LLU	Latvijas Lauksaimniecības universitāte	<i>Latvia University of Life Sciences and Technologies</i>
M	Molmasa	<i>Mole</i>
MPa	Megapaskāls	<i>Megapascal</i>
p	Būtiskuma (nozīmības) līmenis	<i>The level of marginal significance</i>
Pa	Paskāls	<i>Pascal</i>
RSU	Rīgas Stradiņa universitāte	<i>Rīga Stradiņš University</i>
SD	Standarta deviācija	<i>Standard deviation</i>
TCP	Trikalcija fosfāts	<i>Tricalcium phosphate</i>
VPP	Valsts pētniecības programma	<i>National research program</i>

Ievads

Darba aktualitāte

Osteoporoze ir sistēmiska skeletālā slimība, kurai raksturīga samazināta kaulu masa un kaulaudu mikroarhitektūras izmaiņas, kā rezultātā palielinās kaulu trauslums (*Blanchard et al.*, 2019). Palielinoties iedzīvotāju vecumam un dzīvildzei, osteoporoze kļūst arvien plašāk izplatīta. Ar sabiedrības novecošanos osteoporoze arvien vairāk kļūst par globālu problēmu. Pašlaik osteoporoze skar vairāk nekā 200 miljonus cilvēku visā pasaulē. Eiropas valstīs aptuveni 30 % sieviešu, kas ir pēcmenopauzes periodā, tiek diagnosticēta osteoporoze (*Sözen et al.*, 2017).

Osteoporozes profilakse ir kritienu nepieļaušana, redzes un dzirdes traucējumu novēršana, fiziskās aktivitātes, smēķēšanas un alkohola lietošanas pārtraukšana, kā arī atbilstoša D vitamīna, olbaltumvielu un kalcija uzņemšana (*Föger-Samwald et al.*, 2020). Osteoporozes medikamentozā ārstēšanā parasti tiek izmantoti perorālie bifosfonāti (alendronāts, risedronāts un ibandronāts). Sievietēm, kurām ir perorālu bifosfonātu grupas medikamentu nepanesība (vai tie ir kontrindicēti), intravenoza bifosfonātu vai denosumaba lietošana ir vislabākā alternatīva (*Kanis et al.*, 2019). Aptuveni viena no trīs sievietēm un viens no pieciem vīriešiem pēc 50 gadu vecuma piedzīvo osteoporotiskus lūzumus. Osteoporozes izraisīti lūzumi palielina saslimstību un pāragru mirstību, it sevišķi gados vecākiem cilvēkiem (*Sözen et al.*, 2017). Osteoporotisko lūzumu ārstēšana viņiem ir problemātiska, jo ir mazākas lūzumu dzīšanas spējas, kas korelē ar daudz augstāku implanta fiksācijas neveiksmju līmeni salīdzinājumā ar jaunākiem pacientiem. Bieži tiek veiktas ķirurģiskas procedūras, lai salabotu bojāto kaulu, izmantojot skrūves vai fiksācijas plāksnes. Sakarā ar augsto porainību un zemo osteoporotisko kaulaudu izturību, lai uzlabotu iznākumu,

implantus bieži papildina ar dažādiem kaula biomateriāliem (*Offermanns et al.*, 2018).

Divdesmit pirmā gadsimta sākumā strauji sākās plaša biomateriālu izmantošana ortopēdijas praksē. Pēdējā desmitgadē vairākos veselības jomu segmentos tiek meklēti bioloģiski saderīgi materiāli defektīvu kaulu rekonstrukcijai (*Ratner et al.*, 2013). Kaulaudu aizvietojošo biomateriālu izmantošanas iespēju pētniecība ir aktuāla arī Latvijā. Biomateriālam jābūt saderīgam ar implantācijas vietu, netoksiskam, nekancerogēnam, ķīmiski un bioloģiski stabilam, ar atbilstošu blīvumu, svaru, mehānisko izturību un elastību. Autogēnie kaula transplantāti, kas satur minerālo komponentu un daudz imūnkompetento šūnu osteogēnēzei, ir labākais kaulaudu aizvietošanas materiāls, tomēr ir vajadzīgas divas ķirurģiskas vietas un kaula avots ir ierobežots (*Leite et al.*, 2008).

Kaula reģenerācija ir kaulaudu veidošanās fizioloģiskais process, kas notiek normāla lūzuma sadzīšanas laikā un ir iesaistīts nepārtrauktā kaula aprites procesā dzīves laikā. Tomēr ir dažādi klīniski apstākļi, kad nepieciešama plaša kaula reģenerācija, piemēram, osteoporotisko kaulu lūzumu gadījumā (*Dimitriou et al.*, 2011). Biokeramikas materiāliem ir milzīgs potenciāls dabisko kaulu audu atjaunošanai (*Wang et al.*, 2017). Kalcija fosfātu saturošs biomateriāls – hidroksiapatīts (HAP), kas var būt gan tīrā veidā, gan pārklāts ar medikamentiem, ir viens no zināmākajiem un klīniski izpētītiem kaulaudu atjaunošanas līdzekļiem. Kalcija fosfāts stimulē kaulu dzīšanu osteovadītspējas, bioloģiskās saderības un bionoārdīšanās īpašības dēļ (*Schlickewei et al.*, 2015). Divfāžu kalcija fosfāta biokeramika kā kaulu aizstājējmateriāls tiek izmantots, lai uzlabotu osteoporotisko kaulu īpašības un veicinātu kaulaudu dzīšanu. Kalcija hidroksiapatīts (HAP) ir ļoti bioakumulatīvs un veido tiešu saikni ar kaulaudiem. Trialkalcija fosfāts (TCP) darbojas kā katalizators jaunu kaulaudu veidošanās stimulēšanai (*Ratner et al.*, 2013). Stronciju saturošie kalcija fosfāta kaulaudu

cementi ir perspektīvi materiāli ar osteoporozi saistītu defektīvu kaulu reģenerācijai, jo tie stimulē kaulu veidošanos un vienlaikus ierobežo osteoklastu darbību (*Lode et al.*, 2017).

Rīgas Tehniskās universitātes Rūdolfa Cimdiņa Rīgas biomateriālu inovāciju un attīstības centrā tiek veikta kaulaudu aizvietojošu materiālu izpēte. Šim centram ir vairāk nekā 20 gadu pieredze sadarbībā ar Rīgas Stradiņa universitātes Mutes, sejas un žokļu ķirurģijas katedru jaunu sintētisko biomateriālu eksperimentālajā un klīniskajā aprobācijā. Darbs norisinās pie hidroksiapatīta, divfāžu kalcija fosfāta cementa, polimetilmetakrilāta cementa, stikla-jonomēra cementa sintezēšanas un to īpašību pētniecības. No minētajiem materiāliem promocijas darba autora eksperimentālajā pētījumā ar dzīvniekiem tika izmantoti divfāžu kalcija fosfāta biokeramikas materiāli.

Jebkurš biomateriāls, kurš tiek implantēts dzīvā organismā, izraisa noteiktu lokālu reakciju. Reakcija ir atkarīga no materiāla fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām. Tika izstrādāta reaktogenitātes teorija, dalot audu reakciju uz implantāciju nespecifiskā un specifiskā reakcijā, kas kopā veido biosaderību (*Slutskii et Vetra*, 1996). Literatūrā ir maz datu par organisma vispārējo reakciju uz biomateriālu implantāciju. Joprojām nav noskaidrots, kādas ir kaulaudu īpašību izmaiņas blakus implantācijas zonai un attālinātos rajonos pēc biomateriālu implantācijas.

Darba mērķis

Pētījuma mērķis ir noteikt kaulaudu minerālbūvuma, biomehānisko un morfoloģisko īpašību izmaiņas pēc lokālas augšstilba kaula *trochanter major* apvidus pastiprināšanas ar divfāžu kalcija fosfāta biokeramiskajiem materiāliem truši ar eksperimentālu osteoporozi.

Darba uzdevumi

1. Noteikt operēta, neoperēta augšstilba un apakšžokļa kaula paraugu graužošo deformāciju dažādām eksperimentālo dzīvnieku grupām.
2. Noteikt operēta, neoperēta augšstilba un apakšžokļa kaula paraugu graužošo spriegumu dažādām eksperimentālo dzīvnieku grupām.
3. Noteikt operēta, neoperēta augšstilba un apakšžokļa kaula paraugu lieces moduli dažādām eksperimentālo dzīvnieku grupām.
4. Noteikt operēta, neoperēta augšstilba un apakšžokļa kaula paraugu minerālbūvumu dažādām eksperimentālo dzīvnieku grupām.
5. Salīdzināt eksperimentālo dzīvnieku operēta un neoperēta augšstilba kaula paraugu biomehāniskus rādītājus un minerālbūvumu pēc dažāda veida biomateriālu implantācijas.
6. Statistiski salīdzināt iegūtos rezultātus starp dažādām eksperimentālo dzīvnieku grupām pēc biomateriālu implantācijas ar vai bez stroncija.
7. Noteikt apakšžokļa kaula paraugu šķēsgriezumā trabekulāra kaula laukumu pēc dažādu veidu biomateriālu implantācijas eksperimentālajiem dzīvniekiem un kontroles grupai.

Darba hipotēze

Lokāla pastiprināšana ar divfāžu kalcija fosfāta biokeramiskajiem materiāliem augšstilba *trochanter major* apvidū dzīvniekiem ar eksperimentālu osteoporozi uzlabo kaulaudu biomehānikās īpašības un palielina minerālbūvumu.

Pētījuma novitāte

Tika pierādīts, ka Rīgas Tehniskās universitātes Rūdolfa Cimdiņa Rīgas biomateriālu inovāciju un attīstības centra divfāžu kalcija fosfāta biokeramikas materiāli, kuri tiek izmantoti RSU Stomatoloģijas institūtā defektīvu kaulu

aizvietošanai, pēc implantācijas osteoporotiskā kaulā ievērojami palielina tā minerālbūvumu un uzlabo biomehāniskās īpašības.

Pētījuma uzbūve (dizains)

Eksperimentāls salīdzinošs pētījums ar placebo ķirurģijas un kontroles grupu.

Pētījuma grupas: sieviešu dzimtes truši ar eksperimentāli izraisītu osteoporozi, kam augšstilba lielā grozītāja rajonā ievietotas divfāžu kalcija granulas ar un bez stroncija.

Placebo ķirurģijas grupa: dzīvnieki ar eksperimentāli izraisītu osteoporozi bez biomateriāla granulu ievietošanas kaulā.

Kontroles grupa: veseli dzīvnieki.

Pētījuma izpildīšanas vietas

Rīgas Stradiņa universitātes Biomehānikas laboratorija – kaulu paraugu biomehānisko īpašību noteikšana.

Rīgas Stradiņa universitāte, Stomatoloģijas institūts – kaulu paraugu minerālbūvuma noteikšana ar datortomogrāfijas palīdzību.

Rīgas Stradiņa universitātes Patoloģijas katedra – kaulu paraugu morfoloģiskā analīze.

“Liepadent” zobārstniecības klīnikas zobu tehniskā laboratorija – kaulu paraugu sagatavošana biomehānisko īpašību izpētei.

Ētiskie aspekti

Pētījums ir veikts, ievērojot ētikas normas, kas ir noteiktas eksperimentālo pētījumu veikšanai. Pētījumam ir izsniegta Latvijas Pārtikas un veterinārā dienesta atļauja un Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas komitejas atļauja.

Darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs uzrakstīts latviešu valodā. Tam ir klasiska struktūra un 10 daļas: ievads, literatūras apskats, materiāls un metodes, rezultāti, diskusija, secinājumi, izmantotās literatūras saraksts, autora publikācijas un tēzes par pētījuma tēmu, pateicības un pielikumi. Promocijas darba apjoms: 106 lappuses, tajā skaitā 45 attēli un 1 tabula. Izmantotās literatūras sarakstā minēti 174 zinātnisku rakstu un 6 grāmatu avoti.

1. Materiāls un metodes

1.1. Pētījuma materiāls

1.1.1. Dzīvnieku modelis

Pētījumā tika izmantoti 34 astoņus mēnešus veci sieviešu dzimtes eksperimenta dzīvnieki – “Kalifornijas” un “Lielais marders” šķirnes truši no trušu audzētavas “Podziņas”, Ādažu novads, Latvija, LV-2164, novietnes Nr. 1382580, ganāmpulka Nr. LV06178330 (RSU Iepirkuma komisijas lēmums Nr. 5-2/80 (17.02.2015.)) ar vidējo svaru pirms eksperimenta 3,87 kg (2,9–5,0).

Dzīvnieki tika turēti Rīgas Stradiņa universitātes Eksperimenta dzīvnieku audzētavā (faktiskā adrese: Kristapa Helmaņa iela 8, Jelgava, LV-3004). Stacionārs (32,8 m²) un ķirurģijas zāle (62,0 m²) tika nomāti no Latvijas Lauksaimniecības universitātes uz līguma Nr. 4.4.-9/15/2015 pamata. Pētījuma laikā tika ievērotas prasības saskaņā ar Ministru kabineta noteikumiem Nr. 52 “Noteikumi par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību”. Dzīvnieki tika izmitināti pa vienam 100 × 45 × 62 cm izmēra būros. To barībai izmantoja pļavas sienu un auzas, savukārt dzirdināšanai – krāna ūdeni. Eksperimenta laikā visiem trušiem tika atļautas brīvprātīgas kustības, bija pieejams ēdiens un ūdens jebkurā brīdī.

Eksperimentāla osteoporoze tika izraisīta 24 trušiem pēc ovariectomijas un sekojošas metilprednizolona injekcijas. Viens trusis *exitus letalis* 28. dienā pēc metilprednizolona kursa uzsākšanas laika. Kontroles grupā bija 10 veseli truši. Biomateriālu implantācijas operācijas un dzīvnieku eitanāzija tika veikta laika posmā no 2016. gada 20. februāra līdz 2016. gada 13. maijam.

Eksperimentālās osteoporozes ierosināšanas protokols

Eksperimentālā osteoporoze tika ierosināta uz iepriekš zinātniskajā literatūrā aprakstītās metodoloģijas principiem (*Baofeng et al.*, 2010; *Wanderman et al.*, 2018). Ķirurģiskās manipulācijas tika veiktas vispārējā anestēzijā, izmantojot ketamīna 10 % šķīdumu devā 30 mg/kg ķermeņa svara, ksilazīna 2 % šķīdumu devā 3 mg/kg ķermeņa svara, atropīna 0,1 % šķīdumu devā 0,1–0,5 mg/kg ķermeņa svara. Ķirurģijas pirmajā posmā pēc operācijas lauka sagatavošanas tika veikts 3 cm grieziens vēdera priekšējā sienā pie nabas pa viduslīniju (operēja prof. A. Skaģers, asoc. prof. Ģ. Šalms). Tika atvērts vēdera dobums, atrastas un pēc liģēšanas pie pamatnes nogrieztas olnīcas, pārbaudīta hemostāze (1.1. att.).

1.1. att. Abpusējās ovariektomijas operācija
(fotogrāfija no doc. I. Šalmas personīgā arhīva)

Vēdera siena tika slēgta divās kārtās ar resorbējošiem 4/0 diegiem. Āda tika slēgta bez iespieguma ar neresorbējošiem 4/0 diegiem, kuri tika noņemti desmitajā pēcoperācijas dienā. Sāpes pēcoperācijas periodā tika kontrolētas, subkutāni injicējot ketoprofēnu 1–3 mg/kg vienu reizi dienā trīs pirmās dienas.

Kad brūce bija sadzījusī un dzīvnieka veselības stāvoklis normalizējies, pēc 14 dienām tika uzsākts 6 nedēļu metilprednizolona kurss intramuskulāri 1 mg/kg dienā. Metilprednizolona kursa laikā dzīvnieki saņēma

hepatoprotektoru *Hepatile Forte* 170 mg dienā (fosfolipīdi 85 mg, L-ornitīna L-aspartāts 85 mg).

Medikamentu izvēle un devas balstītas uz LLU Veterinārmedicīnas Preklīniskā institūta asociētās profesores Aijas Ilgažas ieteikumiem un datiem no *James W. Carpenter "Exotic Animal Formulary"* un *Ian Ramsey "BSAVA Small Animal Formulary"*. Veterināro medikamentu izmantošanu trušiem veica veterinārārste Jekaterina Petļa, kura arī uzņēmās nodrošināt eksperimenta dzīvnieku labturīgu aprūpi pēcoperācijas periodā.

Kaula defekta veidošana placebo paraugiem un ar biomateriālu implantāciju

Ķirurģijas otrajā posmā labā augšstilba *trochanter major* rajonā vispārējā anestēzijā tika veikts aptuveni 2 cm garš grieziens, atslāpoti mīkstie audi un periosts (1.2. att.).

1.2. att. **Labā augšstilba *trochanter major* rajons**
(fotogrāfija no doc. I. Šalmas personīgā arhīva)

Ar trepāna urbi 5 mm diametrā un 4 mm dziļumā tika izveidots apaļš defekts augšstilba lielā grozītāja rajonā (1.3. att.).

1.3. att. **Kaula defekts 5×4 mm apjomā augšstilba lielā grozītāja rajonā**
(fotogrāfija no doc. I. Šalmas personīgā arhīva)

23 eksperimentālie dzīvnieki tika iedalīti trīs grupās: 1. grupa (8 truši) – defekti tika aizpildīti ar HAP/TCP (70/30) granulām, 2. grupa (8 truši) – defekti tika aizpildīti ar HAP/TCP (70/30) granulām, kam pievienoti 5 % stroncija, 3. placebo ķirurģijas grupa (7 truši) – defekti tika radīti, bet materiāls netika ielikts (1.4. att.).

1.4. att. **Biomateriāla implantācija augšstilba *trochanter major* rajonā**
(fotogrāfija no doc. I. Šalmas personīgā arhīva)

Virš kaula defekta periosts tika slēgts ar uzsūcošiem 4/0 diegiem; āda slēgta bez iespieguma ar neresorbējošiem 4/0 diegiem, kuri tika noņemti desmitajā pēcooperācijas dienā (1.5. att.).

1.5. att. **Periosta slēgšana ar uzsūcošiem diegiem**
(fotogrāfija no doc. I. Šalmas personīgā arhīva)

Dzīvniekiem tika veikta novērošana, novērtējot ūdens un ēdiena patēriņu, svara izmaiņas, šuvju, brūču stāvokli, dzīvnieku uzvedību, ārējo izskatu. Eksperimenta laikā netika novērotas fiziskās aktivitātes vai apetītes zudums.

Dzīvnieku eitanāzija un kaulu paraugu ņemšana

Dzīvnieku eitanāzija tika veikta trīs mēnešus pēc kaula defekta veidošanas vispārējā anestēzijā, ievadot preparātu T-61 intrapulmonāli, deva 1,0 ml/kg ķermeņa svara. Lai iegūtu statistiski ticamus rezultātus, minimālais paraugu skaits bija vairāk nekā 6 (Yamada, 1970; Evans, 1971; Charan *et al.*, 2013).

Osteoporozes pierādīšanai ar morfoloģiskā pētījuma metodi tika ņemti 10 apakšžokļa kaula premolāra rajona paraugi no veselīgiem trušiem un 23 apakšžokļa kaula premolāra rajona paraugi no trušiem ar eksperimentālo osteoporozi. Lai

noteiktu biomateriālu lokālo ietekmi, tika izmantoti 23 labā (operētā) augšstilba kaula paraugi no trušiem ar eksperimentālo osteoporozi, kā arī 23 kreisā (neoperētā) augšstilba un 23 apakšžokļa kaula leņķa rajona paraugi no trušiem ar eksperimentālo osteoporozi, lai noteiktu sistēmisku biomateriāla iedarbību ar biomehāniskā un rentgenoloģiskā pētījuma metodēm (1.6. att.).

1.6. att. Trušu kaulu paraugu sadalījuma shēma

1.1.2. Biomateriālu sagatavošana

Pētījumam tika izmantoti nekomerciālie Rīgas Tehniskās universitātes Rūdolfa Cimdiņa Rīgas biomateriālu inovāciju un attīstības centrā ražoti biomateriāli. Kalcija fosfāta materiālu sintēze un granulu izgatavošana tika realizēta, kā iepriekš aprakstīts zinātniskajā literatūrā (*Grybauskas et al.*, 2016; *Zarins et al.*, 2017). Pirms kalcija fosfātu sintēzes CaO (*Fluka*) un SrO (*Sigma-Aldrich*) aktivēšanas nolūkos tiek termiski apstrādāts augsttemperatūras krāsnī 1100 °C temperatūrā vienu stundu. No iegūtā kalcija oksīda un stroncija oksīda

tika pagatavota 0,3 M Ca(OH)_2 vai $\text{Sr(OH)}_2/\text{Ca(OH)}_2$ suspensija dejonizētā ūdenī. Kalcija fosfātu sintēze tika veikta reaktorā, hidroksīdu suspensijām to maisīšanas laikā pievienojot 2 M H_3PO_4 tādā daudzumā, lai iegūstamā produkta HAP/TCP fāžu attiecība pēc augsttemperatūras apstrādes būtu 70/30. Pēc sintēzes nogulsnes tika filtrētas un granulētas, izmantojot manuālu ekstrūzijas paņēmienu. Iegūtās granulas tika žāvētas un apdedzinātas 1150 °C temperatūrā divas stundas. Termiski apstrādātās granulas tika sadalītas pa frakcijām, tās sijājot ar vibrējošo sietu iekārtu, izmantojot sietus ar 1000 mkm un 500 mkm acu izmēru, tādējādi iegūstot nepieciešamo granulu frakciju (no 0,5 līdz 1 mm). Pēc sijāšanas granulas vairākkārt tika skalotas etanolā, lai atdalītu smalkākās daļiņas, un žāvētas +70 °C temperatūrā.

Ekspimenta pētījumam *in vivo* biomateriāls pēc izgatavošanas tika testēts ar fizikāli ķīmiskām un šūnu kultūrās *in vitro*, atlasot maztoksiskākās, biosaderīgākās un osteogēnas bioaktivitātes ziņā efektīvākās daļiņas.

Biomateriālu granulu raksturojošie parametri atrodami 1.1. tabulā.

1.1. tabula.

Biomateriālu granulu raksturojošie parametri.

Biomateriāls	Virsmas laukums, m^2/g	Tilpuma blīvums, g/cm^3	HAP/TCP saturs, %	Sr saturs, %
HAP/TCP (70/30)	1.262 ± 0.014	0.98 ± 0.01	73/27	0.017 ± 0.002
HAP/TCP ar Sr (70/30)	1.124 ± 0.0147	1.05 ± 0.02	71/29	6.7 ± 0.7

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

1.2. Pētījuma metodes

1.2.1. Biomehāniskā pētījuma metode

Pētījumā kaulaudu biomehānisku parametru noteikšanai tika veikts trīs punktu lieces izpētes tests (*Prodinger et al.*, 2018), (1.7. att.).

1.7. att. Parauga trīs punktu lieces izpētes testa shēma:
F – slogojums, L – laidums, d – parauga biezums

Lieces laikā katram paraugam tika noteikts graužošais (maksimālais) spriegums (σ^*) un graužošā (maksimālā) deformācija (ε^*). Datorprogramma mērījumu rezultātus atspoguļoja tabulas veidā un grafiski kā sprieguma–deformācijas līkni. Paraugu cietība tika izteikta kā pieskares lieces modulis uz noteiktas sprieguma–deformācijas līknes lineārās daļas kā tangensa leņķis α ($\tan \alpha$), kurš veidojas starp koordinātu asi un pieskares līkni tās lineārajā daļā (1.8. att.).

1.8. att. Tipiskā eksperimentālā sprieguma–deformācijas sakarība un galvenie nosakāmie mehāniskie parametri: σ^* – graužošais spriegums, ε^* – graužošā deformācija, $\tan \alpha$ – lieces modulis

Graužošais spriegums tika aprēķināts pēc formulas:

$$\sigma = 3FL / (2bd^2),$$

kur F – slogojums, L – laidums, b – parauga platums, d – parauga biezums.

Graužošais spriegums tika mērīts paskālos (Pa).

Graužošā deformācija tika aprēķināta pēc formulas:

$$\varepsilon = 6df / L^2,$$

kur d – parauga biezums, f – parauga noliece un L – laidums.

Graužošā deformācija tika noteikta procentos (%).

Lieces modulis tika aprēķināts pēc formulas:

$$E = FL^3 / (4fbd^3),$$

kur F – slogojums, L – laidums, f – parauga noliece, b – parauga platums, d – parauga biezums.

Lieces modulis tika mērīts paskālos (Pa).

Lieces modulis tika aprēķināts sprieguma–deformācijas līknes lineārajā daļā relatīvā parauga deformācijas laikā ($\varepsilon = 0,5 \%$).

Kaulaudu biomehānisko īpašību izpētei par trīs punktu lieci tika izmantoti taisnstūra formas paraugi. Pielietojot fiziodispenseri *Surgic Pro* (NSK, Japāna), taisno galu un dimanta diska urbi ar diametru 5 mm, tika izveidoti taisnstūra formas kaulaudu bloki (1.9. att.).

1.9. att. *Surgic pro* fiziodispensers taisnstūra formas kaulu paraugu iegūšanai

(fotogrāfija no darba autora personīgā arhīva)

Taisnstūra formas kaula paraugi tika iegūti no operēta augšstilba kaula diafīzes daļas, neoperēta augšstilba kaula diafīzes daļas un apakšžokļa kaula leņķa rajona (1.10. att.).

1.10. att. Shematisks trušu augšstilba un apakšžokļa kaula zīmējums – ar melno taisnstūri apzīmēta kaula paraugu izgriezuma vieta

(Endoskeleton of Rabbit (With Diagram)

NotesOnZoology.com, Fig. 29.11 un 29.19.

(<http://www.notesonzoology.com/rabbit/endoskeleton/endoskeleton-of-rabbit-with-diagram-vertebrates-chordata-zoology/7690>))

Visi paraugi tika pielīdzināti vienam lielumam, izmantojot speciāli izgatavotu ierīci paraugu kalibrēšanai un abrazīvo slīpēšanas disku: augšstilba kaula paraugu platums $3,2 \pm 0,02$ mm, biezums $0,61 \pm 0,02$ mm; apakšžokļa kaula paraugu platums $3,2 \pm 0,02$ mm, $0,32 \pm 0,02$ mm biezums. Speciāla ierīce paraugu kalibrēšanai tika izgatavota un kalibrēta “Liepadent” zobu tehniskajā laboratorijā. Paraugi, kuri neatbilda noteiktiem izmēriem, netika izmantoti pētījumā (1.11. att.).

1.11. att. **Speciāli izgatavota ierīce paraugu kalibrēšanai un abrazīvais slīpēšanas disks kaulu paraugu pielīdzināšanai**
(fotogrāfija no darba autora personīgā arhīva)

Kaulu paraugu platums un biezums tika izmērīts ar katetometru *KM-6* (Lomo, Krievija), mērījuma precizitāte $\pm 0,01$ mm (1.12. att.).

1.12. att. **KM-6 katetometrs, mērijuma precizitāte $\pm 0,01$ mm**
(fotogrāfija no darba autora personīgā arhīva)

Kaulu paraugi tika mērīti 550 mm attālumā no katetometra (1.13. att.).

1.13. att. **Kaulu parauga platuma un biezuma mērījumu iegūšana**
(fotogrāfija no darba autora personīgā arhīva)

Paraugu lieces izpēte tika veikta standā Zwick/Roell (BT1-FR2.5TN.D14, Vācija), kas aprīkots ar $2,50 \pm 0,1$ kN spēka tenzodevēju (1.14. att.).

1.14. att. **Zwick/Roell** lieces izpētes stends
(fotogrāfija no darba autora personīgā arhīva)

Kaulu paraugi tika ielikti 10 mm attālumā starp atbalstiem (1.15. att.).

1.15. att. **Parauga izpēte par trīs punktu lieci**
(fotogrāfija no darba autora personīgā arhīva)

Stends tika izmantots kopā ar datorprogrammu *testXpert 2.5* (Vācija), kas paredzēta testēšanas ierīces vadīšanai un datu apstrādei. Paraugi tika deformēti ar ātrumu 1 mm/min līdz parauga sabrukšanai. Noslogojuma stendā iegūtie dati tika apstrādāti ar *testXpert 2.5* programmu.

Katrā sprieguma–deformācijas liknes punktā pēc stenda spiediena uzgaļa pārvietošanas programma automātiski aprēķināja parauga nolieci. Pēc formulām, kuras tika ievadītas programmā, automātiski tika aprēķināts graužoais spriegums, graužoā deformācija un lieces modulis.

1.2.2. Rentgenoloģiskā pētījuma metode

Operēta un neoperēta augšstilba ķermeņa kortikālā kaula blīvums tika mērīts ar konusa staru datortomogrāfijas palīdzību, izmantojot *iCAT Next Generation* aparāturu (Kavo, Vācija), (1.16. att.).

1.16. att. *iCAT Next Generation* aparātura konusa stara datortomogrāfijas attēla iegūšanai

(fotogrāfija no darba autora personīgā arhīva)

Aparātura tika izmantota, vadoties pēc standarta darbības protokola (spriegums 120 KV, strāvas stiprums 38 mA, izmeklēšanas lauks (FOV) 17 cm, izšķirtspēja 0,4 vokseli (trīsdimensiju attēla tilpuma mērvienība)). Iegūtie testa dati tika apstrādāti un analizēti, izmantojot aparāturai specifisko programmatūru *iCAT eXamVision* (Kavo, Vācija). Paraugiem tika noteiktas attēla vokseļa nomelnējuma līmeņa vērtības. Vērtības, kas tika parādītas *Haunsfīlda vienībās (HU)*, tika pārveidotas 1 : 1 radioloģiskās vokseļa nomelnējuma līmeņa vērtības

vienībās (*Do-Gyoon Kim, 2014*). Attēla nomelnējuma līmeņa vērtība tika noteikta 4 mm² lielā laukā (1.17. att.).

1.17. att. Konusa stara datortomogrāfijas attēls radioloģiskā attēla nomelnējuma blīvuma vērtības noteikšanai augšstilba ķermeņa kortikālajā kaulā – sagitālajā plaknē. Sarkanās līnijas – koronārā plakne, zilās līnijas – aksiālā plakne. Ar sarkano taisnstūri atzīmēts izmeklējamais lauks.

Augšējā labajā stūrī var redzēt nosaukumus un parametrus:

Mean – vidējais kaula minerālbļīvums izmeklējamā laukā; *SD* – standarta deviācija; *HU min* – minimālais kaula minerālbļīvums izmeklējamā laukā;

HU max – maksimālais kaula minerālbļīvums izmeklējamā laukā;

Area – izmeklējamā lauka lielums

1.2.3. Morfoloģiskā pētījuma metode

Pētījumā tika izmantota klasiskā audu sagatavošanas metode 33 kaulaudu paraugiem no apakšžokļa premolāra rajona. Kaulaudu morfoloģiskajai izpētei tika izmantota rutīnizmeklēšanas metode ar hematoksilīnu/eozīnu (*Kiernan, 2015*).

Pēc kaulaudu bloku izdalīšanas audi tika ievietoti fiksējošā šķīdumā – 10 % formalīnā uz divām nedēļām. Pēc fiksācijas kaulaudi tika dekalcinēti ar *Osteodec* šķīdumu (*Bio-medica, Itālija*), tad audi tika atūdeņoti, pielietojot

etilspirtu, un attaukoti ksilola šķīdumā. Pēc tam audi tika ieguldīti kasetēs ar parafīnu, izveidojot parafīna blokus, no kuriem tika sagatavoti 3–5 µm biezi griezumi un uzklāti uz priekšmetstikliem turpmākai apstrādei un krāsošanai ar hematoksilīnu/eozīnu.

Trabekulārā kaula laukums tika izmērīts, izmantojot datorprogrammu *Image Pro Plus 7 (Media Cybernetics, ASV)*. Visos kaulaudu paraugos pēc nejaušības principa tika izvēlēti trīs vienādi redzamības lauki (0,975 mm²).

1.3. Datu statistiskās apstrādes metodes

Visu datu statistiskā apstrāde, aprēķināšana un grafiskais attēlojums tika veikts ar speciālas programmatūras *GraphPad PRISM v.6.0e (GraphPad Software Inc., Sandjego, Kalifornija, ASV)* palīdzību. Dispersijas homogenitāte tika pārbaudīta ar *Brown–Forsythe* un *Bartlett* testu palīdzību. Nevienmērīga sadalījuma gadījumā dažādu grupu skaitlisko mainīgo vērtību vidējās vērtības tika salīdzinātas, izmantojot neparametrisko kritēriju ANOVA testu jeb *Kruskal–Wallis* testu un kā *post-hoc* procedūru pēc tam pielietoja *Benjamini, Krieger* un *Yekutieli* metodi.

Visi rezultāti tika izteikti kā mediānas (Md) ar starpkvartīļu diapazonu (IQR). Divi lielumi tika uzskatīti par statistiski nozīmīgi atšķirīgiem, ja starpības ticamības līmenis starp tiem bija lielāks par 95 % ($p < 0,05$).

2. Rezultāti

2.1. Biomehāniskā pētījuma un datu statistiskās apstrādes rezultāti augšstilba kaula paraugos

Visi kaula paraugi, kuri tika izmantoti augšstilba kaulu biomehānisko parametru noteikšanai, tika iedalīti trīs grupās:

- 1) placebo ķirurģijas grupa: labajā augšstilbā *trochanter major* rajonā tika radīts defekts, bet materiāls netika ielikts;
- 2) HAP/TCP grupa: labajā augšstilbā *trochanter major* rajonā defekts tika aizpildīts ar HAP/TCP (70/30) granulām;
- 3) HAP/TCP/5 % Sr grupa: labajā augšstilbā *trochanter major* rajonā defekts tika aizpildīts ar HAP/TCP (70/30) granulām, kam pievienoti 5 % stroncija.

2.1.1. Graujošās deformācijas noteikšanas un datu statistiskās apstrādes rezultāti

Operēta augšstilba placebo ķirurģijas grupas paraugiem graujošā deformācija bija 1,43 (1,57–1,20) %, kas ir statistiski ticamāki lielāks nekā HAP/TCP grupas paraugiem 1,16 (1,18–1,13) %, $p = 0,002$, un HAP/TCP/5 % Sr grupas paraugiem 1,04 (1,14–0,86) %, $p = 0,005$. Tika atrastas statistiski ticamas graujošās deformācijas atšķirības starp HAP/TCP un HAP/TCP/5 % Sr grupas paraugiem: HAP/TCP grupas kaulu paraugu graujošā deformācija ir lielāka nekā HAP/TCP/5 % Sr grupas kaulu paraugu graujošā deformācija, $p = 0,02$ (2.1. att.).

2.1. att. Operēta augšstilba paraugu graujošā deformācija dažādām grupām

Neoperēta augšstilba placebo ķirurģijas grupas paraugiem graujošā deformācija bija 1,27 (1,42–1,17) %, kas ir statistiski ticamāki lielāka nekā HAP/TCP grupas paraugiem 1,06 (1,15–0,93) %, $p = 0,012$, un HAP/TCP/5 % Sr grupas paraugiem 1,02 (1,14–0,9) %, $p = 0,003$. Statistiski ticamas graujošās deformācijas atšķirības starp HAP/TCP un HAP/TCP/5 % Sr grupas paraugiem netika atrastas, $p = 0,64$ (2.2. att.).

2.2. att. Neoperēta augšstilba paraugu graujošā deformācija dažādām grupām

2.1.2. Graujošā sprieguma noteikšanas un datu statistiskās apstrādes rezultāti

Operēta augšstilba paraugu statistiski ticamas graujošā sprieguma atšķirības starp visām trim grupām paraugu lieces laikā netika konstatētas ($p > 0,05$): graujošā sprieguma lielums placebo ķirurģijas grupas paraugiem bija 176,7 (216–154) MPa, HAP/TCP grupas paraugiem 194,6 (207,2 – 169,9) MPa un HAP/TCP/5 % Sr grupas paraugiem 193,7 (208,1–176,1) MPa (2.3. att.).

2.3. att. **Operēta augšstilba paraugu graujošais spriegums dažādām grupām**

Neoperēta augšstilba placebo ķirurģijas grupas paraugiem graujošais spriegums bija 155,5 (174,7–140,8) MPa, kas ir statistiski ticami mazāks nekā HAP/TCP grupas paraugiem 209,2 (234,2–164,4) MPa, $p = 0,017$, un HAP/TCP/5 % Sr grupas paraugiem 177,7 (200,3–165,5) MPa, $p = 0,026$. Statistiski ticamas graujošā sprieguma atšķirības starp HAP/TCP un HAP/TCP/5 % Sr grupas paraugiem netika atrastas, $p = 0,46$ (2.4. att.).

2.4. att. Neoperēta augšstilba paraugu graužoais spriegums dažādām grupām

2.1.3. Lieces moduļa noteikšanas un datu statistiskās apstrādes rezultāti

Lieces modulis raksturo materiāla stingumu: jo lielāks ir lieces modulis, jo materiāls ir stingāks. Pētījuma rezultāti pierādīja, ka *operēta augšstilba* placebo ķirurģijas grupas paraugu lieces modulis bija 16,31 (18,66–12,15) GPa, kas ir statistiski ticami mazāks nekā HAP/TCP grupas paraugiem 19,87 (21,10–17,94) GPa, $p = 0,01$, un HAP/TCP/5 % Sr grupas paraugiem 21,88 (27,53–21,09) GPa, $p = 0,005$. Tika atrastas statistiski ticamas lieces moduļa atšķirības starp HAPTCP un HAP/TCP/5 % Sr grupas paraugiem: HAP/TCP grupas kaulu paraugu lieces modulis ir mazāks nekā HAP/TCP/5 % Sr grupas kaulu paraugu lieces modulis, $p = 0,02$ (2.5. att.).

2.5. att. **Operēta augšstilba paraugu lieces modulis dažādām grupām**

Neoperēta augšstilba placebo ķirurģijas grupas paraugu lieces modulis bija 14,91 (17,36–13,6) GPa, kas ir statistiski ticami mazāks nekā HAP/TCP grupas paraugiem 21,86 (25,81–19,6) GPa, $p = 0,004$, un HAP/TCP/5 % Sr grupas paraugiem 22,11 (23,41–20,29) GPa, $p = 0,006$. Statistiski ticamas lieces moduļa atšķirības starp HAP/TCP un HAP/TCP/5% Sr grupas paraugiem netika atrastas, $p = 0,87$ (2.6. att.).

2.6. att. **Neoperēta augšstilba paraugu lieces modulis dažādām grupām**

2.2. Biomehāniskā pētījuma un datu statistiskās apstrādes rezultāti apakšžokļa kaula paraugos

Visi kaula paraugi, kuri tika izmantoti apakšžokļa kaulu biomehānisko parametru noteikšanai, tika iedalīja trīs grupās:

- 1) placebo ķirurģijas grupa: labajā augšstilbā *trochanter major* rajonā tika radīts defekts, bet materiāls netika ielikts;
- 2) HAP/TCP grupa: labajā augšstilbā *trochanter major* rajonā defekts tika aizpildīts ar HAP/TCP (70/30) granulām;
- 3) HAP/TCP/5 % Sr grupa: labajā augšstilbā *trochanter major* rajonā defekts tika aizpildīts ar HAP/TCP (70/30) granulām, kam pievienoti 5 % stroncija.

2.2.1. Graujošās deformācijas noteikšanas un datu statistiskās apstrādes rezultāti

Placebo ķirurģijas grupas paraugiem graujošā deformācija bija 2,04 (2,37–1,76) %, kas ir statistiski ticamāki lielāka nekā HAP/TCP grupas paraugiem 1,46 (1,49–1,27) %, $p = 0.0003$, un HAP/TCP/5 % Sr grupas paraugiem 1,37 (1,94–1,03) %, $p = 0,02$. Statistiski ticamas graujošās deformācijas atšķirības starp HAP/TCP un HAP/TCP/5 % Sr grupas paraugiem netika atrastas, $p > 0,99$ (2.7. att.).

2.7. att. Apakšžokļa kaula paraugu graužošā deformācija dažādām grupām

2.2.2. Graujošā sprieguma noteikšanas un datu statistiskās apstrādes rezultāti

Placebo ķirurģijas grupas paraugiem graužošais spriegums bija 89,36 (108,6–77,44) MPa, kas ir statistiski ticami mazāk nekā HAP/TCP grupas paraugiem 183 (202,7–155,2) MPa, $p = 0,0003$, un HAP/TCP/5% Sr grupas paraugiem 241,9 (250,9–234,9) MPa, $p = 0,0007$. Tika atrastas statistiski ticamas graužošā sprieguma atšķirības starp HAP/TCP un HAP/TCP/5 % Sr grupām: HAP/TCP grupas kaulu paraugu graužošais spriegums ir mazāks nekā HAP/TCP/5 % Sr grupas kaulu paraugu graužošais spriegums, $p = 0,022$ (2.8. att.).

2.8. att. Apakšžokļa kaula paraugu graujošais spriegums dažādām grupām

2.2.3. Lieces moduļa noteikšanas un datu statistiskās apstrādes rezultāti

Placebo ķirurģijas grupas paraugu lieces modulis bija 5,25 (7,23–4,35) GPa, kas ir statistiski ticami mazāks nekā HAP/TCP grupas paraugiem 12,44 (17,71–11,55) GPa, $p = 0,0003$, un HAP/TCP/5 % Sr grupas paraugiem 15,83 (20,8–14,67) GPa, $p = 0,0007$. Statistiski ticamas lieces moduļa atšķirības starp HAP/TCP un HAP/TCP/5 % Sr grupas paraugiem netika atrastas, $p = 0,29$ (2.9. att.).

2.9. att. Apakšžokļa kaula paraugu lieces modulis dažādām grupām

2.3. Rentgenoģiskā pētījuma un datu statistiskās apstrādes rezultāti augšstilba kaula paraugos

Visi kaula paraugi, kuri tika izmantoti augšstilba kaulu minerālblīvuma noteikšanai, tika iedalīti trīs grupās:

- 1) placebo ķirurģijas grupa: labajā augšstilbā *trochanter major* rajonā tika uztaisīts defekts, bet materiāls netiek ielikts;
- 2) HAP/TCP grupa: labajā augšstilbā *trochanter major* rajonā defekts tika aizpildīts ar HAP/TCP (70/30) granulām;
- 3) HAP/TCP/5 % Sr grupa: labajā augšstilbā *trochanter major* rajonā defekts tika aizpildīts ar HAP/TCP (70/30) granulām, kam pievienoti 5 % stroncijs.

Operētā augšstilba placebo ķirurģijas grupas paraugiem kortikālā kaula blīvums bija 923 (1056–843,5) HU, kas ir statistiski ticami mazāks nekā HAP/TCP grupas paraugiem 1302 (1350–1209) HU, $p = 0,016$, un HAP/TCP/5 % Sr grupas paraugiem 1344 (1459–1156) HU, $p = 0,042$. Statistiski ticamas kortikālā kaula blīvuma atšķirības starp HAP/TCP un HAP/TCP/5 % Sr grupas paraugiem netika atrastas, $p = 0,761$ (2.10. att.).

2.10. att. Operēta augšstilba paraugu kortikālā kaula blīvums dažādām grupām

Neoperēta augšstilba placebo ķirurģijas grupas paraugiem kortikālā kaula blīvums bija 935,5 (1053–876) HU, kas ir statistiski ticami mazāks nekā HAP/TCP grupas paraugiem 1212 (1360–1138) HU, $p = 0,016$, un HAP/TCP/5 % Sr grupas paraugiem 1261 (1315 – 1090) HU, $p = 0,012$. Statistiski ticamas kortikālā kaula blīvuma atšķirības starp HAP/TCP un HAP/TCP/5% Sr grupas paraugiem netika atrastas, $p > 0,99$ (2.11. att.).

2.11. att. *Neoperēta augšstilba* paraugu kortikālā kaula blīvums dažādām grupām

2.4. Rentgenoloģiskā pētījuma un datu statistiskās apstrādes rezultāti apakšžokļa kaula paraugos

Visi kaula paraugi, kuri tika izmantoti apakšžokļa kaulu minerālblīvuma noteikšanai, tika iedalīti trīs grupās:

- 1) placebo ķirurģijas grupa: labajā augšstilbā *trochanter major* rajonā tika uztaisīts defekts, bet materiāls netiek ielikts;
- 2) HAP/TCP grupa: labajā augšstilbā *trochanter major* rajonā defekts tika aizpildīts ar HAP/TCP (70/30) granulām;

- 3) HAP/TCP/5% Sr grupa: labajā augšstilbā *trochanter major* rajonā defekts tika aizpildīts ar HAP/TCP (70/30) granulām, kam pievienoti 5 % stroncija.

Placebo ķirurģijas grupas paraugiem kortikālā kaula blīvums bija 709,5 (807–645) HU, kas ir statistiski ticami mazāk nekā HAP/TCP grupas paraugiem 871 (1047–829) HU, $p = 0,024$, un HAP/TCP/5% Sr grupas paraugiem 916 (962–876) HU, $p = 0,006$. Statistiski ticamas kortikālā kaula blīvuma atšķirības starp HAP/TCP un HAP/TCP/5 % Sr grupas paraugiem netika atrastas, $p = 0,522$ (2.12. att.).

2.12. att. Apakšžokļa kaula paraugu kortikālā kaula blīvums dažādām grupām

2.5. Operēta un neoperēta augšstilba biomehānisko parametru un minerālbīvuma salīdzinājums pēc dažāda biomateriāla implantācijas

Visi kaula paraugi, kuri tika izmantoti operēta un neoperēta augšstilba kaulu biomehānisko parametru un bīvuma salīdzināšanai, tika iedalīja četrās grupās:

- 1) HAP/TCP LA grupa: operēta augšstilba kaulu paraugi – labajā augšstilbā *trochanter major* rajonā defekti tika aizpildīti ar HAP/TCP (70/30) granulām;
- 2) HAP/TCP KA grupa: neoperēta augšstilba kaulu paraugi – labajā augšstilbā *trochanter major* rajonā defekts netika aizpildīts ar HAP/TCP (70/30) granulām;
- 3) HAP/TCP/5% Sr LA grupa: operēta augšstilba kaulu paraugi – labajā augšstilbā *trochanter major* rajonā defekts tika aizpildīts ar HAP/TCP (70/30) granulām, kam pievienoti 5 % stroncija.
- 4) HAP/TCP/5% Sr LA grupa: neoperēta augšstilba kaulu paraugi – labajā augšstilbā *trochanter major* rajonā defekts tika aizpildīts ar HAP/TCP (70/30) granulām, kam pievienoti 5 % stroncija.

Salīdzinot operētu un neoperētu augšstilba kaulu paraugu graužošo deformāciju, graužošo spriegumu, elastības moduli un bīvumu, netika atrastas statistiski ticamas atšķirības ($p > 0,05$), (2.13.–2.16. att.).

2.13. att. **Operēta un neoperēta augšstilba paraugu graužošanās deformācijas salīdzinājums pēc dažāda biomateriāla implantācijas**

2.14. att. **Operēta un neoperēta augšstilba paraugu graužoša sprieguma salīdzinājums pēc dažāda biomateriāla implantācijas**

2.15. att. Operēta un neoperēta augšstilba paraugu lieces moduļa salīdzinājums pēc dažāda biomateriāla implantācijas

2.16. att. Operēta un neoperēta augšstilba paraugu minerālbļīvuma salīdzinājums pēc dažāda biomateriāla implantācijas

2.6. Morfoloģiskā pētījuma un datu statistiskās apstrādes rezultāti apakšžokļa kaula paraugos

Visi kaula paraugi, kuri tika izmantoti apakšžokļa trabekulāra kaula laukuma noteikšanai, tika iedalīja četrās grupās:

- 1) kontroles grupa: veseli truši;
- 2) placebo ķirurģijas grupa: labajā augšstilbā *trochanter major* rajonā tika radīts defekts, bet materiāls netika ielikts;
- 3) HAP/TCP grupa: labajā augšstilbā *trochanter major* rajonā defekts tika aizpildīts ar HAP/TCP (70/30) granulām;
- 4) HAP/TCP/5% Sr grupa: labajā augšstilbā *trochanter major* rajonā defekts tika aizpildīts ar HAP/TCP (70/30) granulām, kam pievienoti 5 % stroncija.

Trabekulārā kaula laukums kontroles grupas paraugiem bija lielāks, salīdzinot ar osteoporozes grupu (placebo ķirurģijas grupas, HAP/TCP grupas, HAP/TCP5% Sr grupas) paraugiem. Trabekulārā kaula laukums kontroles grupā bija $0,20 \text{ mm}^2$ ($0,176\text{--}0,233 \text{ mm}^2$), kas ir statistiski ticami lielāks ($p < 0,0001$) nekā HAP/TCP grupā ($0,127 \text{ mm}^2$; $0,118\text{--}0,149 \text{ mm}^2$), HAP/TCP/5 % Sr grupā ($0,136 \text{ mm}^2$; $0,108\text{--}0,166 \text{ mm}^2$) un placebo ķirurģijas grupā ($0,135 \text{ mm}^2$; $0,126\text{--}0,164 \text{ mm}^2$). Statistiski ticamas atšķirības starp HAP/TCP, HAP/TCP/5 % Sr un placebo ķirurģijas grupām netika atrastas, $p > 0,05$ (2.17. att.).

2.17. att. Trabekulārā kaula laukums dažādām pētījuma grupām

3. Diskusija

Darbs tika realizēts Valsts pētījumu programmas Nr. 2014.10-4/VPP-3/21 “Daudzfunkcionālie materiāli un kompozīti, fotonika un nanotehnoloģijas”, projekts Nr. 4 “Nanomateriāli un nanotehnoloģijas medicīniskajam pielietojumam”, ietvaros, un tas ir liela projekta sastāvdaļa, kura mērķis ir radīt un izpētīt jaunus, pielietojamus un konkurētspējīgus biomateriālus – nanostrukturētus kompozītmateriālus osteoporotisku kaulaudu pastiprināšanai un aizvietošanai. Pieaugot dzīves līmenim, katra valsts saskaras ar sabiedrības novecošanas problēmu risināšanu, kas saistīta ar cilvēkiem, kuru dzīves kvalitāte ir atkarīga no balsta un kustību sistēmas slimību izraisītiem kaulu funkciju traucējumiem, kas ir otrs izplatītākais cēlonis invaliditātei globālā līmenī (*Sözen et al.*, 2017). Pēc Eiropas Savienības datiem, Latvijā apmēram 33 % iedzīvotāju (t. i., 700 000 cilvēku) sirgst ar balsta un kustības sistēmas slimībām, tādām kā osteoporoze, reimatoīdais artrīts, osteoartrīts, spondiloze, podagra, un vairāk nekā 200 citu slimību, kurām ir hroniska gaita un kuru dēļ cilvēks ātri kļūst par darba nespējīgu invalīdu.

Līdztekus osteoporozes vispārējai medikamentozai ārstēšanai pēdējā laikā notiek pētījumi par osteoporotiskā kaula pastiprināšanu lūzumu profilaksei biežākajās potenciālajās lūzumu vietās (*Cosman et al.*, 2014; *Iaquinta et al.*, 2019). *Iaquinta et al.* apskatā tika ņemti vērā dažādi audu inženierijas aspekti, kas tika izmantoti kaulu inženierijā. Tiek implantēti visvairāk izpētītie kaulaudus aizvietojošie materiāli, kas tiek modificēti, lai izstrādātu jaunas struktūras un tehnoloģijas. Arī mūsu pētījumā, kas tika realizēts VPP projekta ietvaros, tika paredzēts izpētīt jaunus multifunkcionālus materiālus un metodes kaulaudu apjoma un mehānisko īpašību pastiprināšanai, kaulaudu remineralizācijai un kaulaudu reosifikācijai, kaulaudu remodelāciju pavēršot vēlamajā virzienā – no atrofijas uz kaula jaunveidošanos – osteoporotisku kaulu ārstēšanu un

osteoporozes profilaksi, papildinot iepriekš pētītos un klīnikā pielietojamos divfāžu kalcija fosfātu biokeramikas materiālus ar stroncija joniem.

Biosaderīgu biomateriālu izstrādē nozīmīga loma ir *in vivo* novērojumiem, jo tikai pēc pozitīva atzinuma par materiāla biosaderību materiāls var tikt virzīts tālākiem klīniskiem pētījumiem. Pirms *in vivo* pētījumiem notiek stingra piemērotāko biomateriālu atlase *in vitro* pētījumiem, pielietojot šūnu kultūras. Tiek izmantotas dažādas metodes dzīvnieku osteoporozes ierosināšanai, starp kurām visplašāk izplatīta ir dzīvnieku sieviešu dzimtes bilaterālā ovariectomy. Citas metodes, kuras parasti izmanto osteoporozes ierosināšanai, ir imobilizācija, diētas maiņa un glikokortikoīdu ievadīšana (Calciolari *et al.*, 2017). Līdzīgas osteoporozes ierosināšanas metodes ir izmantotas arī mūsu pētījumā.

Pēcmenopauzes osteoporozes imitēšanai tiek izmantoti vairāki dzīvnieku modeļi, galvenokārt grauzēji (Kalu, 1991; Turner, 2001). Žurkas un peles parasti tiek izmantotas zemās cenas, turēšanas un pārvadāšanas ērtuma dēļ, bet tās nesasniedz pilnīgu skeleta briedumu, kauliem nav Haversa kanālu sistēmas, ir mazizteikta remodelēšanās kortikālajā kaulā. Šie apstākļi ierobežo žurku un peļu izmantošanu osteoporozes pētījumos, īpaši kaulaudu minerālbūvumu ietekmējošu medikamentu izpētē, kas pieprasa kortikālā un trabekulārā kaula remodelēšanās dinamikas novērtēšanu. Wanderman *et al.* savā pētījumā secināja, ka mazāku dzīvnieku izmantošana apgrūtinā implantācijas operāciju tehniskā ziņā, kā arī grūti izvērtēt osteoporozes medikamentu efektivitāti kaulaudu uzbūves īpatnību dēļ (Wanderman *et al.*, 2018). Savukārt Kimmel pētījuma dati liecina, ka lielāku dzīvnieku (piem., suņu, aitu, pērtiķu) izmantošana eksperimentālajās operācijās tehnoloģiskā ziņā tās vairāk tuvinātu cilvēku operācijām, bet tās nav iespējams tehnisku iemeslu dēļ un piešķirtā finansējuma ietvaros (Kimmel, 2001). Castaneda *et al.* biomateriālu pētījumos rekomendē izmantot trušus, jo viņiem ir aktīva kaulaudu remodelēšanās. Trušu un cilvēku

audos novērojamās morfoloģiskās pārmaiņas ir līdzīgas un salīdzināmas. Truši ir labs modelis eksperimentālas osteoporozes pētījumiem, jo sasniedz skeleta briedumu 7–8 mēnešos un tiem ir ievērojama remodelēšanās kortikālajā kaulā (*Castaneda et al.*, 2008). Mūsu eksperimentālajā pētījumā kā dzīvnieku modelis tika izmantoti truši.

Analizējot literatūras avotus, netika atrasts neviens pētījums, kurā tikuši salīdzināti kaulaudu biomehāniskie parametri vai minerālbļīvums blakus biomateriāla implantācijas vietai un attālināti no tās, kā osteoporozes modeli izmantojot dzīvniekus. Turklāt bieži vien tajos analizēti kaulu paraugi no divām vai trim dzīvnieku grupām. Mūsu pētījumu var uzskatīt par unikālu, jo tika analizēti 102 kaulaudu paraugi no 13 dažādām dzīvnieku grupām, salīdzinot kaulaudu paraugus pēc divfāzu kalcija fosfāta biokeramikas implantācijas ar vai bez stroncija klātbūtnes ar placebo ķirurģijas un kontroles grupas kaulaudu paraugiem trušiem ar eksperimentālo osteoporozi. Tika izvērtēti biomehāniski parametri (graujošā deformācija, graujošais spriegums un elastības modulis) un minerālbļīvums osteoporotisku kaulu paraugiem. Kaulu paraugi tika ņemti no operēta augšstilba ķermeņa daļas pēc iespējas tuvāk implantācijas vietai, lai noteiktu lokālu biomateriāla ietekmi, kā arī no neoperēta augšstilba ķermeņa daļas un apakšžokļa kaula leņķa rajona, lai noteiktu sistēmisku biomateriāla iedarbību.

Lai pierādītu osteoporozi, tika noteikts trabekulārā kaula laukums apakšžokļa kaula premolārā rajonā trušiem ar eksperimentālo osteoporozi un veseliem dzīvniekiem. Tika novērotas statistiski ticamas atšķirības veseliem un osteoporotiskiem trušiem: trabekulārā kaula laukums veseliem trušiem bija $0,20 \text{ mm}^2$, savukārt osteoporotiskiem trušiem variēja no $0,127 \text{ mm}^2$ līdz $0,136 \text{ mm}^2$, kas ir statistiski ticami mazāks, salīdzinot ar veselo trušu trabekulāro kaulu laukumu. Mūsu pētījumā netika atrastas statistiski ticamas trabekulārā kaula laukuma atšķirības starp osteoporotisku dzīvnieku grupām trīs mēnešos

pēc biomateriāla implantācijas un placebo ķirurģijas. Līdzīgi rezultāti ir *Baier et al.* pētījumā, kurā tika salīdzināts kalcija fosfāta cements ar stronciju saturošo kalcija fosfāta cementu, ņemot vērā to lokālo un sistēmisko iedarbību uz kaulaudiem eksperimentālā osteoporozes dzīvnieku modelī. Savā pētījumā autors konstatēja līdzīgu kaulaudu apjomu vienu un trīs mēnešus pēc kalcija fosfātu saturoša biomateriāla implantācijas ar vai bez stroncija klātbūtnes. Taču, analizējot žurku kaulu paraugus pēc sešiem mēnešiem, lielākais trabekulārā kaula apjoms bija stronciju saturošo biomateriālu grupā (*Baier et al.*, 2013). Tas tika apstiprināts arī *Ni et al.* pētījumā, kurā, izmantojot trušu modeli, stronciju saturošs hidroksiapatīta cements tika izmantots primārā gūžas locītavas protezēšanā. Autora darbā tika konstatēts, ka pēc sešiem mēnešiem stroncija klātbūtnē veidojas lielāks kaula apjoms, salīdzinot ar trušu grupu, kur kā kaulu aizvietojošais biomateriāls tika izmantots polimetilmetakrilāta cements (*Ni et al.*, 2006). Mūsu un citu autoru iegūtie dati liecina par to, ka jaunveidoto kaulu apjoms stronciju jonu ietekmes rezultātā ir atkarīgs no laika perioda pēc implantācijas.

No dažādiem pieejamajiem kaulaudu aizvietošanas biomateriāliem tikai autologiem kaula transplantātiem piemīt osteokonduktīvas, osteoinduktīvas un osteogēnas īpašības (*Sakkas et al.*, 2017). Tomēr šim biomateriālam piemīt neparedzamas resorbcijas īpašības, tas ir pieejams ierobežotā daudzumā, un pastāv inficēšanas risks (*Nkenke et al.*, 2014; *Jensen et al.*, 2016). Tādēļ liela uzmanība tiek pievērsta biokeramisko materiālu (hidroksiapatīta) pētniecībai, šiem materiāliem jābūt ar bioloģiskas saderība, osteovadītspējas un bionoārdīšanās īpašībām. *Schlickewei et al.* pētījumā izveidoti defekti veselo trušu apakšstilba kaulā tika pildīti ar HAP biokeramikas granulām. Pēc 12 nedēļām tika novērota kaulaudu jaunveidošanās. Dzīvnieku kaulā ieauga kaula transplantāts, un uz tā virsmas izveidojās jauns kauls (*Schlickewei et al.*, 2015). Mūsu pētījuma darba rezultātos var novērot kaulu biomehānisku

parametru uzlabojumu un minerālbūvuma palielināšanos eksperimentālo dzīvnieku grupām pēc biomateriāla implantācijas. Savukārt līdzīgais trabekulārā kaula laukums visām osteoporotisko dzīvnieku grupām liecina par nemainīgu kaula apjomu.

Divfāzu kalcija fosfāta biomateriālus var izmantot kā kaulaudu aizvietošanas materiālus, lai stiprinātu osteoporotisko kaulu un uzlabotu kaulaudu dzīšanu (*Salma et al.*, 2013). *Sulaiman et al.* savā pētījumā secināja, ka 80 % trikalcija fosfāta un 20 % hidroksiapatīta kombinācija nodrošina mehānisku izturību un veido 60–70 % kaulaudu. Trikalcija fosfāts kalpo kā bagāts kalcija un fosfora avots, kas var viegli asimilēties un absorbēties (*Sulaiman et al.*, 2013). Tas ir ļoti bioloģiski saderīgs, izveido resorbējošu bloķēšanas tīklu defekta vietā, lai veicinātu sadzīšanu un nodrošinātu sākotnēju kalcija un ortofosfāta jonu izdalīšanos asinsvados, tādējādi nodrošinot jaunu kaulu veidošanos (*Sulaiman et al.*, 2013; *Salma et al.*, 2015). *Ishakawa et al.* pētījumā salīdzināja trīs komerciālus kaulaudu aizstājējus ar dažādu sastāvu: hidroksiapatītu (HAP, Neobone®), karbonāta apatītu (CO₃AP, Cytrans®) un trikalcija fosfātu (TCP, Cerasorb®). Pētījuma rezultāti parādīja, ka jauna kaula veidošana un kaula aizstājēja resorbcija ir atkarīga no biomateriāla veida. HAP gadījumā 4 nedēļas pēc implantācijas jaunu kaulu veidošanās esošā kaula apkārtnē bija ierobežota un jauna kaula daudzums bija ļoti mazs, 12. nedēļā kaulu daudzums bija gandrīz tāds pats. Atšķirībā no HAP, CO₃AP gadījumā gan 4., gan 12. nedēļā tika izveidots daudz lielāks kaulaudu daudzums. Lielāku CO₃AP granulu daļu 12. nedēļā daļēji nomainīja jaunizveidoti kaulaudi. Interesanti dati bija TCP gadījumā, kad 4. nedēļā gandrīz netika novērota kaulaudu veidošanās – materiāls palika pie kaula defekta, bet 12 nedēļas pēc biomateriāla implantācijas izveidojās liels kaulaudu daudzums un lielākā daļa materiāla šajā laikā tika absorbēta (*Ishakawa et al.*, 2010). Ar šo darbu autoru rezultātiem ir pamatoti mūsu pētījumā izmantoto biomateriālu izvēle: HAP biokeramikas sastāvā tika

izmantots, lai jaunizveidotam kaulam nodrošinātu mehānisku izturību, savukārt TCP nodrošina jauna kaula veidošanos.

Lielākais kalcija fosfāta biomateriālu daudzums nav viendabīgs un satur mikroelementus, kuriem ir būtiska loma augšanā un kaulu atjaunošanā (*Ehret et al.*, 2017). Stroncijs pēc bioloģiskajām īpašībām ir līdzīgs kalcijam, tādēļ uzkrājas kaulos. Agrāk stroncija ranelāts tika pielietots osteoporozes sistēmiskā ārstēšanā (piem., *Protelos*, Francija), bet tā biopieejamība ievērojami samazinās (par 60–70 %) atkarībā no pacienta uztura režīma. Sistēmiskajai stroncija ranelāta lietošanai ir arī vairākas nopietnas blaknes – gremošanas traucējumi, psihiskas izmaiņas, venoza tromboze un miokarda infarkts (*Jonville-Bera et al.*, 2011). *Hao et al.* pētījums parādīja, ka stroncijs varētu uzlabot mezenhimālo cilmes šūnu osteogēno diferenciāciju un kaulu veidošanos *in vivo*, kā arī samazināt osteoklastu skaitu un aktivitāti (*Hao et al.*, 2015). Tā kā stroncijs darbojas kā duāls aģents, optimālais stroncija daudzums joprojām ir pētniecības jautājums. Kā aprakstīts literatūrā, stroncija daudzums biokeramikā ir robežās no 1 % līdz 100 % (*Ehret et al.*, 2017). *Saint-Jean et al.* savā pētījumā pierādīja, ka zema stroncija koncentrācija biomateriālos samazina kaulu resorbciju un stimulē kaulu veidošanos (*Saint-Jean et al.*, 2005). Līdzīgi *Grynepas et al.* pētījumā, žurku mugurkaula skriemeļu tilpums palielinājās par 17% (*Grynepas et al.*, 1996). Arī mūsu pētījumā biomateriāli ar nelielu stroncija daudzumu, uzlaboja kaulu biomehāniskās īpašības, salīdzinot ar pārējām osteoporotisku dzīvnieku grupām. Savukārt, netika atrastas statistiski ticamas kaulu minerālblīvuma atšķirības pēc biomateriāla implantācijas ar vai bez stroncija klātbūtnes.

Literatūras datus ir pierādīts, ka lielākas Sr devas izraisa pretēju efektu, kavējot kaulaudu mineralizācijas procesu (*Grynepas et al.*, 1996). Līdzīga negatīva ietekme tika novērota *in vitro* osteoblastos, kur lielākas Sr devas (> 20µg/ml) traucēja hidroksilapatīta veidošanos, samazinot kaulaudu mineralizāciju (*Verbercmoes et al.*, 2003). Tādēļ, lai labāk izprastu to lomu,

osteoporotisko kaulaudu atjaunošanās mehānismos nepieciešami turpmāki pētījumi ar dažādu stroncija daudzumu biomateriālā.

Pētot Rīgas Tehniskās universitātes Rūdolfa Cimdiņa Rīgas biomateriālu inovāciju un attīstības centra divfāžu kalcija fosfāta biokeramikas ietekmi uz kaulaudiem implantācijas vietas tuvumā (labajā augšstilbā), bija jānoskaidro, vai šim biomateriālam ir arī kaut kāda ietekme uz kaulaudiem attālinātos rajonos, piemēram, kreisajā augšstilbā. Mūsu pētījumā tika salīdzināti abu augšstilbu biomehāniskie parametri un minerālbūvums pēc biomateriāla implantācijas. Salīdzinot operētu un neoperētu augšstilba paraugu graužošo deformāciju, graužošo spriegumu, elastības moduli un minerālbūvumu, statistiski ticamas atšķirības netika atrastas ($p > 0,05$). No tā var secināt, ka pētījumā izmantoto biomateriālu ietekme uz osteoporotisko kaulu biomehāniskiem parametriem un minerālbūvumu implantācijas vietas tuvumā (labajā augšstilbā) un attālinātā rajonā (kreisajā augšstilbā) ir vienāda, kas liecina par sistēmisku biomateriāla iedarbību uz osteoporotisko trušu kaulaudiem.

Secinājumi

1. Osteoporotisko trušu paraugu graužoša deformācija pēc biomateriāla implantācijas ir statistiski ticami mazāka, salīdzinot ar placebo ķirurģijas grupu, kas liecina par kaulu uzlabotu spēju pretoties deformācijas spēkiem.

2. Neoperēta augšstilba un apakšžokļa paraugu graužošais spriegums pēc biomateriāla implantācijas ir statistiski ticami lielāks, salīdzinot ar placebo ķirurģijas grupu, kas liecina par kaulu izturības palielināšanu. Savukārt operēta augšstilba paraugu grupās statistiski ticamas atšķirības netika atrastas.

3. Operēta, neoperēta augšstilba un apakšžokļa paraugu elastības modulis pēc biomateriāla implantācijas ir statistiski ticami lielāks, salīdzinot ar placebo ķirurģijas grupu, kas liecina par kaulu stinguma īpašību palielināšanos.

4. Osteoporotisko trušu paraugu minerālbūvums pēc biomateriāla implantācijas ir statistiski ticami lielāks, salīdzinot ar placebo ķirurģijas grupu, kas liecina par sistēmisku biomateriālu iedarbību uz eksperimentālo dzīvnieku kauliem.

5. Salīdzinot operēta un neoperēta augšstilba paraugu biomehāniskos parametrus un minerālbūvumu grupām pēc biomateriālu implantācijas, statistiski ticamas atšķirības netika atrastas, kas liecina par vienādu biomateriālu iedarbību uz osteoporotiskiem kauliem, kas atrodas attālināti no implantācijas vietas.

6. Stronciju saturoši biomateriāli uzlabo kaulu biomehāniskās īpašības, salīdzinot ar pārējām osteoporotisku dzīvnieku grupām. Savukārt netika atrastas statistiski ticamas kaulu minerālbūvuma atšķirības pēc biomateriāla implantācijas ar vai bez stroncija klātbūtnes.

7. Šķērsgriezumā trabekulārā kaula laukums veselo trušu kaulu paraugiem bija statistiski ticami lielāks nekā osteoporotiskiem trušiem, kas ir eksperimentālo dzīvnieku grupu osteoporozes pierādījums. Savukārt līdzīgais trabekulārā kaula laukums visām osteoporotisko dzīvnieku grupām liecina par nemainīgu kaula apjomu pēc biomateriāla implantācijas.

Izmantotā literatūra

1. Baier, M., Staudt, P., Klein, R., Sommer, U. et al. 2013. Strontium enhances osseointegration of calcium phosphate cement: a histomorphometric pilot study in ovariectomized rats. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 8, 16.
2. Baofeng, L., Zhi, Y., Bei, C., Guolin, M. et al. 2010. Characterization of a rabbit osteoporosis model induced by ovariectomy and glucocorticoid. *Acta Orthopaedica*. 81, 396–401.
3. Blanchard, R., David, C., Thomas, L., Hardiman, R., Clement, J. G., Cooper, D. C., Pivonka, P. 2019. Structural and Material Changes of Human Cortical Bone with Age: Lessons from the Melbourne Femur Research Collection. *Encyclopedia of Biomedical Engineering*. 246–264.
4. Boyle, W. J., Simonet, W. S., Lacey, D. L. 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 15(423(6937)), 337–342.
5. Calciolari, E., Donos, N., Mardas, N. 2017. Osteoporotic Animal Models of Bone Healing: Advantages and Pitfalls. *J. Invest. Surg.* 30, 342–350.
6. Castaneda, S., Calvo, E., Largo, R., Gonzalez-Gonzalez, R., de la Piedra, C., Diaz-Curiel, M., Herrero-Beaumont, G. 2008. Characterization of a new experimental model of osteoporosis in rabbits. *J. Bone Miner. Metab.* 26, 53–59.
7. Charan, J., Kantharia, N. D. 2013. How to calculate sample size in animal studies? *J. Pharmacol. Pharmacother.* 4, 303–306.
8. Cosman, F., de Beur, S. J., LeBoff, M. S., Lewiecki, E. M., Tanner, B., Randall, S., Lindsay, R. 2014. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporos. Int.* 25(10), 2359–2381.
9. Danciu, T. E. et al. 2003. Calcium regulates the PI3K-Akt pathway in stretched osteoblasts. *FEBS Lett.* 536, 193–197.
10. Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D., Giannoudis, P. V. 2011. Bone regeneration: Current concepts and future directions. *BMC Med.* 9, 66–71.
11. Dorozhkin, S. V. 2007. Calcium orthophosphates. *JMatS.* 42, 1061–1995.
12. Ehret, C., Aid-Launais, R., Sagardoy, T., Siadous, R., Bareille, R., Rey, S., Pechev, S., Etienne, L., Kalisky, J., de Mones, E., Letourneur, D., Amadee Vilamitjana, J. 2017. Strontium-doped hydroxyapatite polysaccharide materials effect on ectopic bone formation. *PLoS One*. 12 (9), e0184663.
13. Endoskeleton of Rabbit (With Diagram). *NotesOnZoology.com*. Fig. 29.11 un 29.19. (<http://www.notesonzooology.com/rabbit/endoskeleton/endoskeleton-of-rabbit-with-diagram-vertebrates-chordata-zoology/7690>).
14. Evans, F. G. 1971. The Mechanical Properties of Bone. Charles and Thomath Publisher. 322.

15. Föger-Samwald, U., Dovjak, P., Azizi-Semrad, U., Kersch-Schindl, K., Pietschmann, P. 2020. Osteoporosis: Pathophysiology and therapeutic options. *EXCLI J.* 19, 1017–1037.
16. Grybaskas, S., Locs, J., Salma, I., Salms, G., Berzina-Cimdina, L. 2016. Volumetric analysis of implanted biphasic calcium phosphate/collagen composite by three-dimensional cone beam computed tomography head model superimposition. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery.* 43(1), 167–174.
17. Grynblas, M.D., et al. 1996. Strontium increases vertebral bone volume in rats at a low dose that does not induce detectable mineralization defect. *Bone.* 18(3), 253–259.
18. Hao, J., Chou, J., Kuroda, S., Otsuka, M., Kasugai, S., Lang, N. P. 2015. Strontium hydroxyapatite in situ gel-forming system – a new approach for minimally invasive bone augmentation. *Clin. Oral Implants Res.* 26, 581–585.
19. Henriksen, K., Byrjalsen, I., Andersen, J. R., Bihlet, A. R., Russo, L. A., Alexandersen, P. et al. 2016. A randomized, double-blind, multicenter, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of oral salmon calcitonin in the treatment of osteoporosis in postmenopausal women taking calcium and vitamin D. *Bone.* 91, 122–129.
20. Iaquineta, M. R., Mazzoni, E., Manfrini, M., D'Agostino, A., Trevisiol, L., Nocini, R., Trombelli, L., Barbanti-Brodano, G., Martini, F., Tognon, M. 2019. Innovative Biomaterials for Bone Regrowth. *Int. J. Mol. Sci.* 20(3), 618.
21. Ishikawa, K., Matsuya, S., Lin, X., Zhang, L., Yuasa, T., Miyamoto, Y. 2010. Fabrication of low crystalline B-type carbonate apatite block from low crystalline calcite block. *J. Ceram. Soc. Jpn.* 118, 341.
22. Jackman, T. M., Hussein, A. I., Adams, A. M., Makhnejia, K. K., Morgan, E. F. 2014. Endplate deflection is a defining feature of vertebral fracture and is associated with properties of the underlying trabecular bone. *J. Orthop. Res.* 32, 880–886.
23. Jensen, A. T., Jensen, S. S., Worsaae, N. 2016. Complications related to bone augmentation procedures of localized defects in the alveolar ridge. A retrospective clinical study. *Oral Maxillofac Surg.* 20(2), 115–122.
24. Jonville-Bera, A. P., Autret-Leca, E. 2011. Adverse drug reactions of strontium ranelate (Protelos®) in France. *Presse Med.* 40(10), 453–462.
25. Kalu, D. N. 1991. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.*, 15, 175–191.
26. Kanis, J. A., Cooper, C., Rizzoli, R., Reginster, J. Y. 2019. Scientific Advisory Board of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis (ESCEO), the Committees of Scientific Advisors and National Societies of the International Osteoporosis Foundation (IOF). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 30, 3–44.

27. Kiernan, J. A. 2008. Histological and histochemical methods: theory and practice. *Scion Pub.* 12–170.
28. Kim, D. G. 2014. Can dental cone beam computed tomography assess bone mineral density? *J. Bone Metab.* 21(2), 117–126.
29. Kimmel, D. B. 2001. Animal models for *in vivo* experimentation in osteoporosis research. In: Marcus R., Feldman D., Kelsey J. (Eds.) *Osteoporosis*. Academic Press. 2, 29–47.
30. Leite, F. R. M., Ramalho, L. T. de O. 2008. Bone regeneration after demineralized bone matrix and castor oil (*Ricinus communis*) polyurethane implantation. *J. Appl. Oral Sci.* 16(2), 122–126.
31. Lode, A., Heiss, C., Knapp, G., Thomas, J., Nies, B., Gelinsky, M., Schumacher, M. 2017. Strontium-Modified Premixed Calcium Phosphate Cements for the Therapy. *Acta Biomater.* 1, 30664–30665.
32. Ni, G. X., Lu, W. W., Chiu, K. Y., Li, Z. Y., Fong, D. Y. T., Luk, K. D. K. 2006. Strontium-containing hydroxyapatite (Sr-HA) bioactive cement for primary hip replacement: an *in vivo* study. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials.* 77(2), 409–415.
33. Nkenke, E., Neukam, F. W. 2014. Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: morbidity, resorption and implant survival. *Eur. J. Oral Implantol.* 7, 203–217.
34. Offermanns, V., Andersen, O. Z., Riede, G., Sillassen, M., Jeppesen, C. S., Almtoft, K. P., Talasz, H., Öhman-Mägi, C., Lethaus, B., Tolba, R., Kloss, F., Foss, M. 2018. Effect of strontium surface-functionalized implants on early and late osseointegration: A histological, spectrometric and tomographic evaluation. *Acta Biomater.* 69, 385–394.
35. Prodinger, P. M., Foehr, P., Bürklein, D., Bissinger, O., Pilge, H., Kreutzer, K., Eisenhart-Rothe, R., Tischer, T. 2018. Whole bone testing in small animals: systematic characterization of the mechanical properties of different rodent bones available for rat fracture models. *Eur. J. Med. Res.* 23, 8.
36. Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E. 2013. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 3rd ed. Elsevier.
37. Saint-Jean, S. J., Camire, C. L., Nevsten, P., Hansen, S., Ginebra, M. P. 2005. Study of the reactivity and *in vitro* bioactivity of Sr-substituted alpha-TCP cement. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 16, 993–1001.
38. Sakkas, A., Wilde, F., Heufelder, M., Winter, K., Schramm, A. 2017. Autogenous bone grafts in oral implantology—is it still a “gold standard”? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int. J. Implant Dent.* 3, 23.

39. Salma, I., Petronis, S., Pilmane, M., Skagers, A., Zalite, V., Locs, J. 2015. Local recovery of Bone tissue in Osteoporotic Rabbit Hip after Implantation of HAP/TCP Bioceramic Granules. *27th European Conference on Biomaterials*. 409.
40. Schlickewei, C. W., Laaff, G., Andresen, A., Klatte, T. O., Rueger, J. M., Ruesing, J., Eppe, M., Lehmann, W. 2015. Bone augmentation using a new injectable bone graft substitute by combining calcium phosphate and bisphosphonate as composite: An animal model. *J. Orthop. Surg. Res.* 10, 116.
41. Slutskaa, L., Vetra, J. 1996. Letter to the editor: Biocompatibility and reactogenicity of materials: a semantic and logical analysis of definitions of their practical significance. *Cells and Materials*. 6(1–3), 137–142.
42. Sözen, T., Özişik, L., Başaran, N. C. 2017. An overview and management of osteoporosis. *Eur. J. Rheumatol.* 4(1), 46–56.
43. Sulaiman, S. B., Keong, T. K., Cheng, C. H., Saim, A. B., Idrus, R. B. H. 2013. Tricalcium phosphate/hydroxyapatite (TCP-HA) bone scaffold as potential candidate for the formation of tissue engineered bone. *Indian J. Med. Res.* 137(6), 1093–1101.
44. Thomsen, J. S., Ebbesen, E. N., Mosekilde, L. 2002. Zone-dependent changes in human vertebral trabecular bone: clinical implications. *Bone*. 30, 664–669.
45. Turner, A. S. 2001. Animal models of osteoporosis: necessity and limitations. *Eur. Cell Mater.* 1, 66–81.
46. Verberckmoes, S.C., De Broe, M.E., D’Haese, P.C. 2003. Dose-dependent effects of strontium on osteoblast function and mineralization. *Kidney Int.* 64(2), 534– 43.
47. Wanderman, N. R., Mallet, C., Giambini, H., Bao, N., Zhao, C., Kai-Nan, A., Freedman, B. A., Nassr, A. 2018. An Ovariectomy-Induced Rabbit Osteoporotic Model: A New Perspective. *Asian Spine J.* 12(1), 12–17.
48. Wang, W., Yeung, K. W. K. 2017. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact. Mater.* 2, 224–247.
49. Yamada, H. 1970. Strength of Biological Materials. *The Williams and Wilkins Company*. 297.
50. Yang, L. P., Dong, Y. P., Luo, W. P., Zhu, T., Li, Q. T., Zhang, L. J., Kong, J., Yuan, Z. W., Zhao, Q. 2018. Calbindin-D28K mediates 25(OH)D3/VDR-regulated bone formation through MMP13 and DMP1. *J. Cell Biochem.* 119, 8035–8047.
51. Zarins, J., Pilmane, M., Sidhoma, E., Salma, I., Locs, J. 2017. Local and systemic morphofunctional response of osteoporotic rabbits bone defect following implantation of strontium doped biphasic ceramic granules. *Solid State Phenomena*. 267, 124–131.

Autora publikācijas un tēzes par pētījuma tēmu

Publikācijas starptautiski recenzējamos zinātniskos izdevumos

1. Salms, G., **Ananjevs, V.**, Kasyanovs, V., Skagers, A., Salma, I., Vetra, J., Zalīte, V., Stīpniece, L., Petronis, S. 2016. Change of Biomechanical Parameters in the Lower Jaws of Rabbits with Experimental Osteoporosis after Implantation of Calcium-Phosphate Bioceramic Material in the Greater Trochanter Region. *Key Engineering Materials*. 721, 224–228.

2. **Ananjevs, V.**, Ananjeva, A., Vetra, J., Skagers, A., Salma, I., Locs, J., Kasyanov, V. 2018. Calcium Phosphate Bioceramic Material Local Influence on the Bone Biomechanical Properties at Rabbits with Experimental Osteoporosis. *International Journal of Engineering & Technology*. 7, 496–497.

3. **Ananjevs, V.**, Ananjeva, A., Vetra, J., Skagers, A., Salma, I., Neimane, L., Kasyanov, V. 2019. General influence of biphasic calcium phosphate on osteoporotic bone density. *Proceedings of the Latvian Academy of sciences. Section B*. 73(2), 185–188.

4. **Ananjevs, V.**, Abolins, A., Locs, J., Salma, I., Skagers, A., Vetra, J., Kasyanov, V. 2020. The Histomorphometry of Rabbit Bone Tissue with Experimental Osteoporosis after Implantation of Biphasic Calcium Phosphate Materials. *Key Engineering Materials*. 850, 249–253.

Publikācijas Latvijā recenzējamos zinātniskos izdevumos

1. **Ananjevs, V.**, Skaģers, A., Šalma, I., Šalms, G., Vētra, J., Vītiņš, V., Zālīte, V., Stīpniece, L., Kasjanovs, V. 2016. Osteoporotisku apakšžokļa kaulu biomehānisko rādītāju izmaiņas pēc lokālas pastiprināšanas ar bifāziskajiem kalcija fosfātu biokeramikas materiāliem augšstilba trochanter majus rajonā: eksperimentāls pētījums. *RSU zinātnisko rakstu krājums*. 258–261.

Tēzes starptautiskās zinātniskās konferencēs

1. **Ананьев В.**, Ветра Я. Шалма И., Шалмс Г., Касьянов В., Лочс Я. Изменения биомеханических показателей в нижних челюстях кроликов с экспериментальным остеопорозом после локального использования кальций-фосфатного биокерамического материала в районе большого вертела бедренной кости. *Сборник трудов Национального конгресса с международным участием “Паринские чтения 2016”* (Паринские чтения 2016, 5–6 мая 2016 г., Минск, Белоруссия), 20–23.

2. Šalms, Ģ., **Ananjevs, V.**, Kasjanovs, V., Skagērs, A., Šalma, I., Vētra, J., Zālīte, V., Stīpniece, L., Petronis, S. Change of Biomechanical Parameters in the Lower Jaws of Rabbits with Experimental Osteoporosis after Implantation of Calcium-Phosphate Bioceramic Material in the Greater Trochanter Region. *BALTMATTRIB, Abstract* (November 3–4, 2016, Riga, Latvia), 28.

3. **Ananjevs, V.**, Vetra, J., Skagers, A., Salma, I., Locs, J., Kasyanov, V. Calcium phosphate bioceramic material local influence on the osteoporotic bone biomechanical properties (experimental research). *14th Joint Symposium of the Rostock University and Rīga Stradiņš University* (24–26 May, 2018, Riga, Latvia).

4. **Ananjevs, V.**, Vetra, J., Skagers, A., Salma, I., Locs, J., Kasyanov, V. Change of the Bone Biomechanical Properties at Rabbits with Experimental Osteoporosis after Implantation of Calcium Phosphate Bioceramic Material. *8th World Congress of Biomechanics* (8–12 July, 2018, Dublinā, Īrija).

5. **Ananjevs, V.**, Locs, J., Abolins, A., Salma, I., Vetra, J., Skagers, A., Kasyanov, V. The histomorphometry of rabbits bone tissue with experimental osteoporosis after implantation of biphasic calcium phosphate materials. *Materials Science and Applied Chemistry: Abstract* (October 24, 2019, Riga, Latvia), 22.

Tēzes Latvijas zinātniskās konferencēs

1. **Ananjevs, V.**, Vētra, J., Skaģers, A., Kasjanovs, V., Šalma, I., Šalms, Ģ., Ločs, J. Osteoporotisku trušu kaulu biomehānisko rādītāju izmaiņas pēc lokālas pastiprināšanas ar bifāziskajiem kalcija fosfātu biokeramikas materiāliem. *Rīgas Stradiņa universitāte. 2017. gada zinātniskā konference: Tēzes* (Rīgā, 2017. gada 6.–7. aprīlī), 45.

2. **Ananjevs, V.**, Vētra, J., Kasjanovs, V., Skaģers, A., Šalma, I., Neimane, L. Bifāziska kalcija fosfāta biokeramikas materiāla vispārējā ietekme uz osteoporotisku kaulu minerālblīvumu: eksperimentāls pētījums. *Rīgas Stradiņa universitāte. 2018. gada zinātniskā konference: Tēzes* (Rīgā, 2018. gada 22.–23. martā), 24.

3. **Ananjevs, V.**, Ananjeva, A., Vētra, J., Skagers, A., Kasjanovs, V. Calcium Phosphate Bioceramic Materials General Influence on Osteoporotic Bone: Experimental Research. *Rīgas Stradiņa universitāte. 2019. gada starptautiskā konference – zināšanas praksei: Tēzes* (Rīgā, 2019. gada 1.–3. aprīlī), 514.

4. **Ananjevs, V.**, Grisulonoks, A., Ananjeva, A., Abolins, A., Salma, I., Salms, G., Vētra, J., Kasjanovs, V., Skagers, A. Histopathology of Rabbits Jaws with Experimental Osteoporosis and Implantation of Biphasic Calcium Phosphates (BCP) in Trochanter Major. *Rīgas Stradiņa universitāte. 2019. gada starptautiskā konference – zināšanas praksei: Tēzes* (Rīgā, 2019. gada 1.–3. aprīlī), 578.

Pateicības

Ar dziļu cieņu pateicība *Dr. med., Dr. habil. med.* profesoram **Andrejam Skaķeram** un *Dr. med.* docentei **Ilzei Šalmai** par atbalstu un padomiem mana promocijas darba tapšanā.

Ļoti pateicos zinātniskā darba vadītājiem – *Dr. habil. med.* profesoram **Jānim Vētram** un *Dr. habil. sc. ing.* profesoram **Vladimiram Kasjanovam** par darba vadīšanu, atbalstu un lielu pacietību darba tapšanas laikā.

Pateicos *Dr. med.* asociētajam profesoram **Arnim Āboliņam** par palīdzību kaulu paraugu morfoloģiskā pētījuma veikšanā.

Paldies RSU Stomatoloģijas Institūta Rentgenoloģijas nodaļas speciālistiem par lielo praktisko palīdzību kaulu paraugu datortomogrāfijas veikšanā. Īpaša pateicība *Dr. med.* asociētajai profesorei **Laurai Neimanei** par padomiem.

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

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

Paldies “Liepadent” zobārstniecības klīnikas vadītājam **Armandam Ginteram** par padomiem un palīdzību kaulu paraugu sagatavošanā biomehāniskai izpētei.

Vissirsnīgākais paldies un pateicība manai sievai **Aleksandrai**, dēlam **Savēlijam** un maniemi vecākiem par sapratni, atbalstu un rūpēm.