Utjecaj visokofrekventnih vibracijskih (akceleracijskih) snaga male amplitude na učinkovitost ortodontskog postupka u štakora

Kalajzić, Žana

Doctoral thesis / Disertacija

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:233490

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Žana Kalajzić

UTJECAJ VISOKOFREKVENTNIH VIBRACIJSKIH (AKCELERACIJSKIH) SNAGA MALE AMPLITUDE NA UČINKOVITOST ORTODONTSKOG POSTUPKA U ŠTAKORA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Žana Kalajzić

UTJECAJ VISOKOFREKVENTNIH VIBRACIJSKIH (AKCELERACIJSKIH) SNAGA MALE AMPLITUDE NA UČINKOVITOST ORTODONTSKOG POSTUPKA U ŠTAKORA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2018.

Doktorski rad izraden je na Odjelu za Ortodonciju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta Connecticut, Farmington, SAD pod vodstvom prof.dr. Sunila Wadhwe.

Mentor rada: prof.dr.sc. Dolores Biočina-Lukenda

Dragoj mentorici, prof.dr.sc. Dolores Biočina-Lukendi, iskreno zahvaljujem na ukazanom povjerenju i podršci tijekom izrade ovog doktorskoga rada.

Veliko hvala prof.dr.sc. Danki Grčević i dr.sc. Ivanu Iviću na svim stručnim savjetima, pažnji i pomoći pri pisanju disertacije.

Zahvaljujem osoblju Odjela za Ortodonciju, Stomatološkog fakulteta u Farmingtonu i voditeljima znanstvenih projekata, prof.dr. Flaviu Uribeu i prof.dr.Sunilu Wadhwi.

SADRŽAJ

1. UVOD....1
1.1 Ortodontski postupak....1
1.1.1 Građa zuba....1
1.1.2 Biomehanički principi ortodontskog postupka....6
1.1.3 Teorije ortodontskih mehanizama....8
1.1.4 Faze ortodontskog pomaka....10
1.1.5 Biološke promjene u dentalnom tkivu uzrokovane ortodontskim tretmanom...11
1.2 Metode regulacije i ubrzanja ortodontskog postupka....20
1.2.1 Farmakološke metode regulacije koštane pregradnje i ortodonskog postupka .20
1.2.2 Mehaničke metode regulacije ortodonskog postupka....22
2. HIPOTEZA....26
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA....27
4. MATERIJALI I METODE....28
4.1 Pokusne životinje....28
4.2 Ustroj pokusa....28
4.3 Postavljanje ortodontskih opruga....29
4.4 Primjena vibracijskih (cikličkih) stimulacija....30
4.5 Mikro-kompjuterizirana tomografija (micro-CT)....31
4.6 TRAP bojanje i kvantifikacija osteoklasta....32
4.7 Von Kossa bojanje i procjena mineralizacije u parodontnom ligamentu....33
4.8 Ugradnja 5-bromo-2-deoksi-uridina (BrdU) u parodontnom ligamentu i mjerenje stanične proliferacije....34
4.9 TUNEL metoda i kvantifikacija apoptotičnih stanica u parodontnom ligamentu....35
4.10 Bojanje na Picro-sirius Red i analiza kolagenih vlakana pod svjetlosnim i polariziranim mikroskopom....35
4.11 Procjena kvalitete kolagenih vlakana na neobojanim histološkim rezovima pomoću multifoton mikroskopa....36

4.12 Statistička obrada podataka 37
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA 38
5.1 Mjerenja pomaka kutnjaka nakon ortodontskog tretmana 38
5.2 Analiza djelovanja ortodontskog tretmana na koštanu gustoću metodom mikro-kompjuterizirane tomografije 40
5.3 Djelovanje cikličkih vibracijskih podražaja na aktivnost osteoklasta 42
5.4 Djelovanje cikličkih vibracijskih podražaja na mineralizaciju u parodontnom ligamentu 45
5.5 Djelovanje vibracijskih frekvencija na staničnu proliferaciju 47
5.6 Djelovanje vibracijskih frekvencija na oštećenja u parodontnom ligamentu 49
5.6.1 **Djelovanje vibracijskih frekvencija na apoptozu stanica u parodontnom ligamentu** 49
5.6.2 **Djelovanje vibracijskih podražaja na integritet kolagenskih vlakana u parodontnom ligamentu** 52
5.7 Razlike u pomaku (putovanju) vibracijske elektrode kod primjene frekvencija od 60Hz i 30Hz 56
6. RASPRAVA 58
6.1 Vibracijski podražaji smanjunju broj aktivnih osteoklasta 59
6.2 Vibracijski podražaji uzrokuju povećanje koštane gustoće 66
6.3 Vibracijski podražaji ne uzrokuju mineralizaciju parodontnog ligamenta 68
6.4 Vibracijski podražaji ne mijenjaju proliferaciju stanica unutar parodontnog ligamenta 68
6.5 Vibracijski podražaji u kombinaciji s ortodontskim postupkom izazivaju značajna stanična oštećenja u parodontnom ligamentu 69
6.6 Vibracijski podražaji u kombinaciji s ortodontskim postupkom uzrokuju značajna oštećenja kolagenih vlakana parodontnog ligamenta 70
6.7 Upotreba vibracijskih podražaja u suvremenoj ortodonciji 72
7. ZAKLJUČCI 73
8. SAŽETAK 75

9. SUMMARY 76
10. LITERATURA 77
11. ŽIVOTOPIS 88

POPIS KRATICA

AD	uočena gustoća (prema engl. *apparent density*)
AP	alkalna fosfataza (prema engl. *alkaline phosphatase*)
BMP	koštana oblikotvorna bjelančevina (prema engl. *bone morfogenetic protein*)
BMU	temeljna višestanična jedinica (prema engl. *basic multicellular unit*)
BV/TV	koštani obujam (prema engl. *bone volume/trabecular volume*)
BrdU	5-bromo-2-deoksi-uridin
cAMP	ciklički adenozin-monofosfat (prema engl. *cyclic adenosine monophosphate*)
CFU	jedinice koje formiraju kolonije (prema engl. *colony forming units*)
CD	diferencijacijski biljeg (prema engl. *cluster of differentiation*)
cFos	transkripcijski čimbenik odgovoran za sazrijevanje osteoklasta
cGMP	ciklički gvanozin-monofosfat (prema engl. *cyclic guanosine monophosphate*)
ClC-7	kloridni kanal
CO_2	ugljikov dioksid
COX	ciklooksigenaza (prema engl. *cyclooksygenase*)
CT	kompjuterizirana tomografija (prema engl. *computed tomography*)
CX	polukanal koneksin (prema engl. *connexin*)
D_3	1,25-dihidroksi-kalciferol
DAB	3,3-diaminobenzidin
DAPI	diamino fenil indol (prema engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*)
DC-STAMP	transmembranski protein specifičan za dendritičke stanice (prema engl. *dendritic cell-specific transmembrane protein*)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (prema engl. *deoxyribonucleic acid*)
Dkk1	bjelančevina iz obitelji Dickkopf
E11/gp38	transmembranska bjelančevina osteocita
EDTA	etilen-diaminotetra-octena kiselina (prem aengl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)
ERKs	kinaze regulirane izvanstaničnim signalima (prema engl. extracellular signal-regulated kinases)
FITC	flourescein-izotijocijanat (prema engl. *fluoresceinisothyocyanate*)
H+	protoni vodika
H_20_2	vodikov peroksid
H-ATPaza	vakuolska protonska pumpa
HMGB1	osteoklastni kemotaktični čimbenik grupe visoke pokretljivosti, *box 1 protein* (prema engl. *osteoclast chemotactic factor high mobility group box 1 protein)*
hPDLsc	matične stanice parodontnog ligamenta (prema engl.*human periodontal ligament stem cells*)
IL	interleukin
Int	hibridna kratica od Int (prema engl. *integration 1*)
Ki-67	pokazatelj stanične proliferacije

LRP	bjelančevina srodna receptoru za lipoproteine niske gustoće (prema engl. *low-density lipoprotein receptor-related protein*)
M-CSF	čimbenik rasta kolonija makrofaga (prema engl. *macrophage colony stimulating factor*)
MMP	metaloproteinaze međustanične tvari (prema engl. *matrix metalloproteinases*)
mRNA	prijenosnička ribonukleinska kiselina (prema engl. *messenger ribonucleic acid*)
Ni-Ti	nikal-titanij
NO	dušični oksid (od eng. *nitric oxid*)
OC	osteokalcin
OcS	površina kosti na kojoj se nalaze aktivni osteoklasti (prema eng. *osteoclast surface*)
OPG	osteoprotegerin
OPG-Fc	rekombinatni fuzijski osteoprotegerin
PDL	parodontni ligament (prema engl. *periodontal ligament*)
PGE1	prostaglandin E1
PEMF	pulsno elektromagnetsko polje (prema engl. *pulsed electromagnetic field*)
PTH	paratiroidni hormon
RANK	poticatelj receptora jezgrinog čimbenika kB (prema engl. *receptor activator of nuclar factor kB*)
RANKL	ligand poticatelja receptora jezgrinog čimbenika kB (prema engl. *receptor activator of nuclar factor kB ligand*)
Runx2	transkripcijski čimbenik povezan s bjelančevinom "runt" 2 (prema engl. *runt-related transcription factor 2*)
SD	standardna devijacija (prema engl. *standard deviation*)
SOST	gen odgovoran za kodiranje proteina sklerostina
SS	nehrđajući čelik (prema engl. *stainless steel*)
TD	gustoća tkiva (prema engl. *tissue density*)
TGF	transformirajući čimbenik rasta (prema engl. *transforming growth factor*)
TNF	čimbenik tumorske nekroze (prema engl. *tumor necrosis factor*)
TRAP	kisela fosfataza otporna na tartarat (prema engl. *tartarate-resistent acid phosphatase*)
TRITC	tetrametilrodamin (prema engl. *tetramethylrhodamine*)
TUNEL	obilježavanje terminalne deoksinukleotidil transferaze (prema engl. *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*)
VEGF	vaskularni endotelni čimbenik rasta (prem engl. vascular endothelial growth factor)
Wnt	hibridna kratica od Wg (prema engl. *wingless in Drosophila*)

1. UVOD

1.1 **Ortodontski postupak**

Ortodontski postupak način je medicinskog izravnavanja ili micanja zubi s ciljem njihova boljeg estetskog izgleda, ali i funkcionalnog poboljšanja. Boljim raspoređivanjem zagriznih sila preko svih zubi, ortodontski postupak može dugoročno djelovati i poboljšati zdravlje zubi, zubnoga mesa i temporomandibularnoga zgloba.

Ortodonski pomak strogo je kontroliran, reguliran i balansiran proces u kojemu dolazi do niza staničnih, biokemijskih i molekularnih mehanizama koji rezultiraju jakom pregradnjom alveolarne kosti, neophodnom da bi se zub pomaknuo u željenom pravcu.

Alveolarna koštana pregradnja tijekom ortodontskog tretmana sastoji se od dvije komponente:

1.) koštane razgradnje u smjeru u kojemu se zub pomiče, na tzv. strani kompresije i

2.) koštane formacije na strani suprotnoj od koštane razgradnje, koja se odvija na strani tenzije (1, 2).

Učinkovitost, odnosno brzina ortodontskog tretmana, uvelike ovisi o brzini koštane pregradnje (3). Ortodontski je postupak dugotrajan proces koji u prosjeku traje dvije do tri godine i rezultira značajnim nuspojavama kao što su bol, karijes, resorpcija zubnoga korijena, gingivitis, i sl. Iz tog se razloga u suvremenoj ortodontskoj praksi pokušavaju otkriti metode kojima bi se duljina ortodontskog postupka skratila i time olakšale nuspojave, što bi u konačnici pomoglo i pacijentu i liječniku.

1.1.1 Građa zuba

Zub je jedna od jedinstvenih struktura u ljudskome tijelu i među najsloženijima je. Zub tvore tri različita mineralizirana tkiva: dentin, zubna caklina i cement, a kao potporna struktura služi mu četvrta vrsta mineraliziranoga tkiva - alveolarna kost (4). Spoj između zuba i zubnog mesa jedino je mjesto u ljudskome tijelu gdje je struktura koja se sastoji od mineraliziranog tkiva direktno pokrivena mekim tkivom i ujedno je mjesto gdje može doći do značajnih patoloških promjena koje eventualno mogu uzrokovati gubitak potpornih struktura zuba.

Anatomski gledano, zub se sastoji od krune koja okružuje pulpnu komoricu i jednog ili nekoliko korijena unutar kojih se nalazi korijenski kanal (Slika 1.). Krunu oblaže zubna caklina koja zbog svoje specifične građe tvori najtvrđu poznatu biološku strukturu. Caklina je produkt stanica koje potječu od oralnog ektoderma pa su sastav i struktura cakline znatno različiti od dentina, cementa i kosti koji potječu od mezenhima. Građena je od prizmi (rodova) dugih kristala hidroksi-apatita između kojih su položeni međurodovi - gdje se kristali hidroksi-apatita pružaju pod drugačijim kutem. Caklinu formiraju ameloblasti koji diferenciraju iz stanica unutrašnjeg caklinskog epitela nizom diferencijacijskih i funcionalnih staničnih stadija koji se odvijaju za vrijeme sekrecije, mineralizacije i sazrijevanja caklinskog matriksa. Nakon erupcije zuba, ameloblasti odumiru, tako caklina, ukoliko dođe do njezinoga oštećenja, nema sposobnost regeneracije.

Glavnu i najveću strukturu kod zuba tvori dentin koji podržava zubnu caklinu i ujedno tvori zubne korijenove. Dentin okružuje pulpu koja zbog svoje krvožilne i živčane opskrbe i imunoloških i regenerativnih sposobnosti održava vitalnost dentina i stanica koje formiraju dentin, odontoblasta. Odontoblasti leže na periferiji zubne pulpe i luče, a potom i mineraliziraju komponente matriksa dentina čiju glavnu organsku komponentu tvori kolagen tipa 1 dok se anorganski dio, kao i u caklini, sastoji od kristala hidroksi-apatita. Odontoblast se sastoji od staničnoga tijela i staničnoga nastavka. Stanično je tijelo glavni izvor sinteze matriksa dentina i leži ispod predentina (nemineraliziranoga dentinskog matriksa), a stanični nastavak koji je smješten na distalnome kraju odontoblasta, kroz tubulus se produžuje u predentin i dentin.

Parodont, tkivo koje okružuje i podupire korijen zuba, sastoji se od cementa, parodontnoga ligamenta (PDL) i alveolarne kosti. Nakon izbijanja zuba, cervikalni je dio zuba u dodiru s epitelom zubnog mesa, što u kombinaciji s reduciranim zubnim epitelom na caklini formira spojni epitel. Kada je intaktno, to spojni epitel štiti parodont koji leži ispod njega od potencijalnih iritansa u oralnoj šupljini. Pulpa i parodont formiraju kontinuitet na mjestima duž korijena gdje krvne žile ulaze i izlaze iz pulpe na apikalnom otvoru i lateralnim i akcesornim kanalima.

Kolagena vlakna parodontnoga ligamenta vežu se s jedne strane za cement, koji oblaže dentin na korijenima, a s druge strane za alveolarnu kost. Iako je cement strukturni dio zuba, glavna mu je funkcija da pruža pričvrstak za vlakna parodontnoga ligamenta. Cement proizvode stanice cementoblasti i, kao u dentinu, glavna je komponenta organskoga matriksa kolagen tipa 1. Cement koji pokriva dio zuba bliže kruni acelularan je, a cement koji pokriva dio zuba prema apeksu je celularan i sadržava stanična tijela i nastavke cementoblasta koji bivaju uloženi u matriks i postaju cementociti. Neprekidno odlaganje cementa tijekom ljudskoga života omogućava neprekidan,

stalan pričvrstak parodontnome ligamentu u situacijama u kojima se zub pomiče kao rezultat dugotrajnih funkcionalnih promjena. Budući da je cement građom tvrđi od kosti, otporniji je na razgradnju (resorpciju) za vrijeme pomicanja zuba.

Parodontni ligament (PDL), kao i zubna pulpa, specijalizirano je vezivno tkivo čija je funkcija djelomično povezana uz prisutnost specijalno raspoređenih snopova kolagenih vlakana koja podupiru zub u alveoli i apsorbiraju sile okluzije koje se prenose na okolnu kost. PDL prostor je malen i varira od prosječnih 0,21 mm kod mladih zuba do 0,15 mm kod starih zuba. Ujednačenost njegove širine jedan je od kriterija koji se koriste za određivanje njegova zdravlja.

Na rubovima su parodontnoga prostora cementoblasti i osteoblasti. Između glavnih parodontnih vlakana isprepleteno je rahlo vezivno tkivo koje sadrži fibroblaste, matične stanice, makrofage, osteoklaste, krvne žile, živce, limfne žile i ostatna Malassezova tjelešca koja ponekad mogu formirati ciste. Zbog bogate krvne opskrbe, parodontni ligament prehranjuje cement i alveolarnu kost, a bogat je visoko osjetljivim živčanim vlaknima i neka od njih mogu poslužiti kao mehanoreceptori i zabilježiti promjene tlaka u ligamentu, koji se mijenja tijekom pomicanja zuba.

Kolagena vlakna luče ligamentni fibroblasti, a glavna je komponenta vlakana kolagen tipa 1, iako mogu biti prisutni i drugi tipovi kolagena, kao kolagen tipa 3 i tipa 12. Sinteza kolagena tipa 3 povećava se za vrijeme pregradnje ligamenta dok kolagen tipa 12 najvjerojatnije ima ulogu u regulaciji i organizaciji snopova kolagenih vlakana. Snopovi kolagenih vlakana koji bivaju uloženi u cement ili alveolarnu kost zovu se Sharpeyeva vlakna (Slika 1.2.B). Ta su vlakna potpuno mineralizirana u acelularnom cementu ili djelomično mineralizirana na mjestima ulaganja u acelularni cement i alveolarnu kost. Nekoliko različitih grupa snopova kolagenih vlakana mogu se naći na određenim mjestima unutar parodontnoga ligamenta i tvore tzv. glavna vlakna parodontnoga ligamenta, a mogu se podijeliti u ukupno pet vrsta:

1. Vlakna koja spajaju vrh jamice s cementom, idu koso i hvataju se na mjestima višim od hvatišta za alveolarnu kost, sprječavaju vertikalno (okluzijsko) pomicanje zuba.
2. Horizontalna vlakna, idu odmah ispod prvih i horizontalno spajaju alveolarnu kost s cementom, sprječavaju horizontalno (lateralno) pomicanje zuba.
3. Kosa vlakna su najbrojnija i polaze koso od alveolarne kosti prema cementu na koji se vežu niže od početnog polazišta na alveolarnoj kosti. Zbog svoje konfiguracije, ova vlakna služe kao 'šok upijači' i omogućuju da zub da podnese kompresivne sile za vrijeme žvakanja.

4. Apikalna vlakna smještena su radijalno oko apeksa korijena i opiru se silama u vertikalnom smjeru (okluzijskim i intruzijskim).
5. Interradikularna vlakna pružaju se radijalno i spajaju vrh jamice položen između korijena zuba i cementa koji se nalazi na mjestu furkacije, sprječavaju vertikalno (okluzijsko) pomicanje zuba.

Postoje i druga vlakna koja ne pripadaju usko parodontnome ligamentu, ali pomažu očuvanju integriteta ligamenta:

1. Transseptalna vlakna idu preko vrha jamice alveolarne kosti i povezuju cement jednoga zuba s cementom susjednoga zuba. Ova vlakna pomažu u održavanju proksimalnih površina zuba u kontaktu.
2. Dentogingivalna vlakna protežu se od cementa prema lamini propriji u gingivi i čuvaju integritet tih tkiva.
3. Alveogingivalna vlakna protežu se od vrha jamice alveolarne kosti prema lamini propriji u gingivi i čuvaju integritet tih tkiva.
4. Dentoperiostalna vlakna polaze od cementuma, pružaju se preko vrha jamice alveolarne kosti i idu prema njezinoj vanjskoj strani gdje se vežu za periosteum kosti na vanjskoj kortikalnoj ploči alveolarnoga nastavka.
5. Kružna vlakna idu kružno, okružuju vrat zuba, križaju se s drugim vlaknima u tom području i pomažu da gingiva bude u kontaktu sa zubom.

do otpuštanja i sinteze različitih neurotransmitera, citokina i čimbenika rasta. Te molekule mogu izazvati daljnje odgovore različitih vrsta stanica unutar i okolo zuba omogućujući tako uvjete za tkivnu razgradnju ili sintezu.

Ortodontska je sila definirana kao sila primijenjena na zub s ciljem da se izazove pomicanje zuba i uglavnom ima magnitudu manju od ortopedske sile. Ortopedska je pak sila definirana kao sila većih magnituda negoli ortodontska, koja se primjenjuje s ciljem izazivanja učinaka na cijeli maksilofacijalni kompleks. Iako nema jasnih granica između ortodontskih i ortopedskih sila, ortodontska mehanoterapija usmjerena je na pomicanje zuba modulirano aktivnom pregradnjom i adaptivnim promjenama u parodontnim tkivima. Za tu su svrhu potrebne sile od samo 20-150 grama, primijenjene na pojedini zub, dok se u kraniofacijalnoj ortopediji primjenjuju sile puno većih magnituda, većih od 300 grama, kako bi se promijenio oblik kostiju (6).

Optimalna bi se magnituda ortodontskih sila ugrubo mogla definirati kao minimalna sila potrebna da se zub najučinkovitije pomakne na željeno mjesto bez izazivanja ireverzibilnih tkivnih oštećenja, nuspojava ili nelagode kod pacijenta.

Tradicionalno, ortodontske se sile dijele na slabe i jake i smatra se kako su slabe sile lagodnije i u većoj mjeri fiziološke, negoli jake (5).

Neka istraživanja navode da ortodontske sile nikad nisu jednolično raspoređene unutar PDL-a, i da je uvijek prisutna određena razina traume, čak i kod primjene laganih sila (7)**.** Nadalje, postojećim je instrumentima jako teško precizno izmjeriti točnu količinu sila prisutnih na korijenima i različitim dijelovima zuba tijekom bilo kojega ortodontskog tretmana. Ali uglavnom se preferira primjena slabih sila budući da one ipak uzrokuju manja oštećenja tkiva i izazivaju tzv. frontalnu resorpciju alveolarne kosti. Za razliku od slabih, jake sile često dovode do nekroze i hijalinizacije unutar PDL-a i često dovode i do resorpcije korijena.

Koncept optimalnih ortodontskih sila mijenja se u skladu s ortodontskom strukom. Optimalna ortodontska sila klasično je definirana kao sila koja dovodi do promjena tkivnoga tlaka koji je jednak kapilarnome krvnom tlaku i zbog toga ne dolazi do okluzije kapilara na mjestima kompresije parodontnoga ligamenta. Sile manje od optimalnih ne dovode do nikakvih reakcija u tkivu, a sile veće od optimalnih dovode do tkivne nekroze i prevencije frontalne resorpcije alveolarne kosti (5)**.**

Zagovornici slabih ortodontskih sila (8) opisuju tzv. bezstanične zone unutar zona kompresije parodontnoga ligamenta.

Mnogi su autori proučavali intenzitete sila upotrijebljene kod ortodontskoga postupka i njihov učinak na tkiva (7, 9) i predlažu optimalni raspon sila pritiska na zubnokoštanu barijeru koja može proizvesti maksimalan pomak, a iznosi između 150 i 200 grama.

Sile pritiska ispod toga raspona nisu dovele do ortodontskoga pomaka, a sile iznad optimalnih bile su u stanju drastično usporiti i u konačnici potpuno zaustaviti ortodontski tretman.

Prema današnjim kriterijima, optimalna je sila entrinzički mehanički podražaj koji je u stanju evocirati stanični odgovor i održavati ravnotežu u pregradnji parodontnih potpornih struktura, a rezultira maksimalnom brzinom pomicanja zuba s minimalnim ireverzibilnim oštećenjima korijena, PDL-a i alveolarne kosti. Prema ovome konceptu, postoji sila određene magnitude i karakteristika (kontinuirana ili intermitentna, konstantna ili silazna) koja je u stanju uzrokovati maksimalnu brzinu pomaka bez ikakvih tkivnih oštećenja uz maksimalno zadovoljstvo pacijenta. Uzimajući u obzir sve navedeno, optimalna se sila najvjerojatnije razlikuje ovisno o svakome pojedinom zubu i pacijentu i to treba posebno razmatrati u svakodnevnoj ortodontskoj kliničkoj praksi (5).

1.1.3 Teorije ortodontskih mehanizama

Prema ukupnim dosadašnjim istraživanjima i saznanjima, moguće je navesti dva glavna mehanizma kojima se zub ortodontski pomiče:

1. Primjenom kompresije i tenzije na PDL
2. Savijanjem alveolarne kosti

<u>Teorija kompresije - tenzije</u>

Klasični histološki nalazi promjena koje se događaju kod ortodontskoga pomicanja zuba vode hipotezi da se zub miče u parodontnom prostoru stvarajući tzv. zonu 'kompresije' i zonu 'tenzije' (10). Na strani kompresije dolazi do određene dezorijentacije PDL vlakana i smanjenja njihove tvorbe.

Na strani tenzije, natezanje snopova kolagenih vlakana dovodi do povećane stanične proliferacije koja posljedično dovodi i do njihovog povećanja (11).

Zbog dezorijentacije kolagenih vlakana, na strani kompresije dolazi do znatnih staničnih i tkivnih oštećenja i do hijalinizacije koja je u početku karakterizirana piknotičkim jezgrama u stanicama, a potom i potpunim odumiranjem stanica ili bestaničnim zonama. U tim područjima zato dolazi do invazije makrofaga i osteoklasta iz okolnoga neoštećenog tkiva kojom se odstranjuje nekrotično tkivo, ali i susjedna kost. Taj se proces naziva indirektna resorpcija (12, 13).

Upalni proces također ima znatnu ulogu i može dovesti do diferencijacije stanica koje su u stanju izazvati tkivnu pregradnju i potaknuti osteoklastogenezu. Taj proces dovodi do frontalne resorpcije u kojoj se osteoklasti nižu na granici alveolarne kosti i komprimiranog PDL-a producirajući tako direktnu koštanu resorpciju (14).

Promjene tlaka i protoka krvi koje se događaju na strani kompresije i tenzije dovode do oslobađanja kemijskih medijatora koji započinju cijeli niz signalnih procesa. Oni dalje dovode do aktivacije stanica osteoklasta koji razgrađuju kost na strani kompresije, i do aktivacije stanica osteoblasta koji odlažu novu kost na strani tenzije (14).

Teorija savijanja alveolarne kosti

Začetnik teorije, znanstvenik Farrar, još je 1888. godine istraživao ulogu savijanja kosti kao ključnoga procesa koji dovodi do početka ortodontskoga pomaka zuba (5). Kasnije je teorija potvrđena pokusima na životinjama (11) i pacijentima (15).

Prema ovoj teoriji, ukoliko dođe do primjene ortodontske sile, snaga se sa zuba prenosi na ostale okolne strukture. Stvorene sile savijaju kost, zub i čvrste strukture PDL-a. Kako je alveolarna kost elastičnija negoli okolne strukture, puno se jače od njih savija pod utjecajem primjene sile. Savijanje alveolarne kosti posljedično uključuje niz aktivnih bioloških procesa koji rezultiraju pregradnjom kosti i obnovom staničnih oštećenja. Spomenuti su procesi ubrzani i naglašeni ako je kost održana u deformiranome položaju. Neki su istraživači (16-18) ukazali da u toku savijanja kosti postoji konkavna i konveksna konfiguracija kosti. Na područjima tenzije alveolarna kost ima konkavnu, a u područjima kompresije konveksnu konfiguraciju.

Istraživanja Bassetta i Beckera (16) navode da u parodontu dolazi do pojave električnih potencijala kao odgovora na primijenjenu mehaničku silu. Električni potencijali mogu pozitivno ili negativno nabiti makromolekule tako da otvaraju specifična mjesta na staničnoj membrani i pokreću prijenos

iona kroz membranu. Zengo je u svojim eksperimentima otkrio da je konkavna strana ortodontski tretirane kosti elektronegativna i u stanju je potaknuti osteoblastičku aktivnost, dok je konveksna strana alveolarne kosti elektropozitivna i ukazuje na povećanu osteoklastičnu aktivnost (17). Dakle, postoji neka vrsta veze između mehaničke stimulacije i električnoga stanja kosti koji u kombinaciji s primjenom ortodontske sile mogu igrati glavnu ulogu staničnih prijenosnika.

Poznavajući pojam piezoelektriciteta, po kojemu deformacija kristalnih struktura može izazvati promjene elektriciteta zbog promjene mjesta elektrona unutar kristala, Borgens je primijetio različit endogeni elektricitet u intaktnoj i deformiranoj, oštećenoj kosti i sugerirao da su koštane stanice, a ne koštani matriks, odgovorne za navedene promjene struja (19). Davidovitch je također pronašao određenu vrstu piezoelektriciteta koja se može pojaviti kao posljedica distorzije nekih struktura u parodontu, kao što su kolagen, hidroksi-apatit i koštane stanice (20).

Iako su istraživanja pokazala čitav niz histoloških, histokemijskih i imunokemijskih događanja, nijedna pak od navedenih hipoteza nije dala čist uvid u prave biološke mehanizme i njihov točan slijed koji se događa za vrijeme ortodontskoga procesa. U svakom slučaju, kao rezultat primijenjene ortodontske sile, različite stanice i izvanstanični matriks simultano se aktiviraju i rezultiraju intenzivnom pregradnjom tkiva. U ranim fazama ortodontskoga procesa dolazi do promjene protoka tekućina unutar PDL-a koja rezultira distorzijom stanica i matriksa. Kao odgovor na navedene promjene, dolazi do otpuštanja različitih citokina, čimbenika rasta i neuroprijenosnika koji dovode do aktivacije i diferencijacije stanica vezanih za koštanu pregradnju i tako i do funkcionalnog pomicanja zuba (10).

1.1.4 Faze ortodontskog pomaka

Prema Burstoneu, postoje tri faze u pomaku: početna faza, faza mirovanja (lag faza) i postlag faza (21).

U početnoj fazi ortodontskoga postupka dolazi do jako brzoga pomicanja zuba koje se događa zbog pomaka zuba unutar komprimiranog PDL prostora. Već u početnoj fazi dolazi do staničnih i tkivnih reakcija praćenih infiltracijom upalnih stanica i prisustvom osteoblastnih i osteoklastnih preteča. Odmah nakon početne faze, slijedi duža lag faza u kojoj nema značajnijega pomaka i koja je uzrokovana hijalinizacijom PDL-a. U toj se fazi lako može prepoznati zona kompresije u kojoj nema više normalne konfiguracije PDL vlakana. Promjena u protoku krvi zbog njihove konstrikcije

dovodi do odumiranja stanica i hijalinizacije koja može potrajati 4-20 dana. Pomak se ne događa sve dok se nekrotične naslage u cijelosti ne uklone, što se događa zbog aktivnosti i migracije makrofaga, gigantskih stanica i osteoklasta iz okolnih tkiva. U zonama tenzije, koštane obložne stanice odlažu novi, nemineralizirani matriks (osteoid), a novi se osteoblasti diferenciraju iz pericita oko PDL kapilara. Preosteoblasti dalje proliferiraju i putuju prema površini alveolarne kosti, duž Sharpeyevih vlakana.

Simultano, PDL fibroblasti u zonama tenzije također proliferiraju i luče matriks.

U trećoj fazi, u kojoj razlikujemo fazu ubrzanja, a zatim linearnu fazu, dolazi do pravoga pomicanja gdje se alveolarna kost uvelike resorbira i zub se pomiče u željenome pravcu. Ona počinje otprilike 40 dana nakon početnoga postavljanja ortodontskih opruga i karakterizirana je nepravilnom granicom alveolarne kosti koja ukazuje na frontalnu ili direktnu resorpciju. Indirektna resorpcija (eng. undermining resorption) najvjerojatnije se odvija uz nastojanje da se ukloni ishemična alveolarna kost koja priliježe odmah uz hijalinizirano tkivo PDL-a. I u ovoj se fazi mogu naći područja hijalinizacije, pogotovo ukoliko dođe do primjene opruga jakih sila, što ukazuje na to da je odstranjenje nekrotičnih naslaga dugotrajan i kontinuiran proces. U trećoj fazi ortodontskoga pomaka, u zonama tenzije mogu se jasno uočiti područja odlaganja nove kosti koja se sada i mineralizira.

Nedavna istraživanja pokazuju da se hijalinizacija češće i obimnije događa ukoliko dođe do primjene jakih sila na zub (22). Razvoj zona hijalinizacije, dakle, uvelike ovisi o magnitudi sile koja se primjenjuje, ali nije dokazano da postoji ikakva povezanost s brzinom pomaka. Jednom kad pomak zuba intenzivno krene, nakon faze mirovanja, koštana pregradnja ide određenim tokom i brzinom, neovisnom o magnitudi ortodontske sile.

1.1.5 Biološke promjene u dentalnom tkivu uzrokovane ortodontskim tretmanom

Signalne molekule i metaboliti prisutni u procesu ortodontskog pomaka

Rane faze u ortodontskom pomaku gotovo uvijek uključuju upalni proces karakteriziran vazodilatacijom i migracijom plazme i leukocita iz krvnih kapilara parodonta. Leukociti pak luče citokine koji međudjeluju (direktno ili indirektno) s postojećim stanicama koje se nalaze u parodontu. Parakrino ili autokrino, citokini djeluju s drugim sistemskim ili lokalnim signalnim molekulama, izazivaju sintezu i sekreciju prostaglandina, čimbenika rasta i drugih citokina koji

djeluju kao funkcionalna jedinica u intenzivnoj parodontnoj pregradnji. Dan ili dva kasnije, akutna upala prelazi u kroničnu, uz koju dominira i stanična proliferacija fibroblasta, endotelnih stanica, osteoblasta i stanica koštane srži.

Zbog aktivnosti enzima fosfolipaze dolazi do oslobađanja arahidonske kiseline, glavnoga fosolipida stanične membrane. Arahidonska kiselina može biti metabolizirana enzimom ciklooksigenazom čime se oslobađaju prostaglandini i tromboksani, ili enzimom lipooksigenazom kojime se oslobađaju leukotrieni. Brojne su studije pokazale ulogu prostaglandina u stimulaciji koštane resorpcije, povećavanjem broja osteoklasta i njihove aktivnosti.

U nekoliko minuta nakon postavljanja ortodontskih opruga, signalne molekule aktiviranih imunih i živčanih stanica unutar parodontnih tkiva vežu se za membranske receptore i dovode do enzimatske konverzije citoplazmatskoga cikličkog adenozin-monofosfata (cAMP) i cikličkoga gvanozin-monofosfata (cGMP). Oni su dokazani brojnim imunohistokemijskim bojanjima kod ortodontskih procesa i djeluju kao drugi glasnici s nizom staničnih enzima i mogu tako izazvati sintezu novih proteina, povećati koncentraciju unutarstaničnoga kalcija, aktivirati proteinske kinaze i izazvati procese fosforilacije koji dovode do niza staničnih odgovora vezanih uz proliferaciju, sintezu, sekreciju, kontrakciju, koštanu pregradnju i sl.

Aktivan oblik vitamina D, 1,25-dehidroksi-kolecalciferol, također je prepoznat kao važan čimbenik u tijeku ortodontskoga procesa. Snižene razine kalcija stimuliraju paratiroidni hormon da poveća reapsorpciju kalcija u bubrežnim kanalićima i hidroksilaciju 25-hidroksi-kolekalciferola u 1,25-dehidroksi-kolekalciferol, koji snažno potiče koštanu resorpciju stimulirajući diferencijaciju osteoklasta iz njihovih preteča i potičući aktivnost postojećih osteoklasta. Imajući u vidu da je vitamin D3 jedan od dijetalnih proizvoda, povećavanjem njegove koncentracije, može doći i do ubrzanoga ortodontskog tretmana.

Mehaničke sile uzrokuju naprezanje izvanstaničnoga matriksa (koji uključuje molekule kolagena, proteoglikana, laminina i fibronektina) i prenose se do staničnoga skeleta preko staničnih prijanjajućih molekula integrina. Zbog prianjanja na te receptore, događa se reorganizacija staničnoga skeleta, izlučivanje pohranjenih citokina, ribosomalna aktivacija i gensko prepisivanje. Mikrofilamentni snopovi, koji čine glavni sastojak staničnoga skeleta, završavaju na specifičnim mjestima stanične membrane i formiraju s izvanstaničnim matriksom spojne komplekse koji se nazivaju fokalni spojevi ili adhezijske naslage. U nedavnim je istraživanjima dokazano prisustvo integrina na osteoklastima vezanima za resorpciju kosti i odontoklastima tokom resorpcije korijena.

Na primijenjenu vanjsku mehaničku silu dolazi dakle do promjena oblika stanica i izvanstaničnoga matriksa i pregradnje (sinteza i razgradnja makromolekularnih komponenti) izvanstaničnoga matriksa koji također predstavljaju važan dio ortodontskoga procesa. Isto tako, dolazi do promjene određenih komponenti matriksa, npr. vrsta proteoglikana PDL-a, u zonama kompresije uočena je pojava epitopa 6-kondroitin-sulfata. Uočeno je i prisustvo određenih enzima koji sudjeluju u pregradnji izvanstaničnoga matriksa, kao što su matriks metaloproteinaze, serin proteaze, aspartat i cistein proteaze (5).

Vrste stanica odgovorne za početak i odvijanje ortodontskog pomaka

Većina tipova stanica vrlo je osjetljiva na mehaničke podražaje i ta činjenica predstavlja znanstveni temelj ortodoncije. Održavanje koštane mase i mehaničkoga integriteta skeleta tijekom života zavisi o ravnoteži između procesa koštane formacije i koštane razgradnje, odnosno o koštanoj pregradnji. Konstantno, tijekom životnoga vijeka, osteoklasti razgrađuju mineralizirano koštano tkivo, a osteoblasti ga zamjenjuju novom kosti pa je koštana pregradnja uvelike ovisna o funkcijama i ravnoteži stanica osteoblasta i osteoklasta.

Koštana pregradnja javlja se kao odgovor na mehanički podražaj, a točan mehanizam nije u potpunosti razjašnjen. Pretpostavlja se da osteociti, koštane stanice koje su uložene debelo u koštani matriks, imaju najvažniju ulogu.

Osteociti

Osteocit je zrela koštana stanica u potpunosti okružena matriksom kojega su nekad proizveli osteoblasti. Proces transformacije od osteoblasta do osteocita traje oko tri dana. Za vrijeme tog procesa, osteoblasti proizvode veliku količinu ekstracelularnoga matriksa, smanjuju stanični obujam za oko 70 %, smanjuju broj staničnih organela i razvijaju duge citoplazmatske produžetke koji izlaze iz njihova staničnog tijela. Svaki osteocit uložen je u prostor koji se prilagođava obliku osteocitnog tijela i koji nazivamo lakunom. Osteocitni citoplazmatski nastavci uloženi su u kanalikule i komuniciraju međusobno spojnim vezama (eng. gap junctions) koje su formirane prethodnim djelovanjem molekula koštanih koneksina (23). Tako osteociti komuniciraju i indirektno s udaljenim osteoblastima, koštanim obložnim stanicama i endotelnim stanicama krvnih žila u koštanoj srži (Slika 3.).

U rutinski pripravljenim histološkim rezovima, osteocitna je stanica transformirana mežuranjem izazvanim dekalciniranjem kosti i stanična je jezgra obično jedina uočljiva.

Osteociti su nekada bili nazivani pasivnima, neaktivnim stanicama, međutim, danas se zna da su osteociti metabolički aktivne i multifunkcionalne stanice, neophodne i važne u procesima mehanotransdukcije. Smanjena mehanička aktivnost, kao što su imobilizacija, mišićna slabost, bestežinsko stanje uzrokuju gubitak koštane mase, dok povećanje mehaničke aktivnosti potiče njezinu gustoću.

Osteocit reagira na mehanički stres lučenjem metaloproteinaza matriksa (MMP) pa je prazan prostor koji okružuje osteocite rezultat enzimatske razgradnje koštanoga matriksa MMP-ima. Povećan mehanički stres u osteocitima potiče molekularne mehanizme slične mehanizmima u aktivnim osteoblastima koji produciraju koštani matriks. Tako su dakle, osteociti odgovorni za reverzibilnu pregradnju perikanalikularnoga i perilakunarnog koštanog matriksa. Taj se proces zove osteocitna pregradnja.

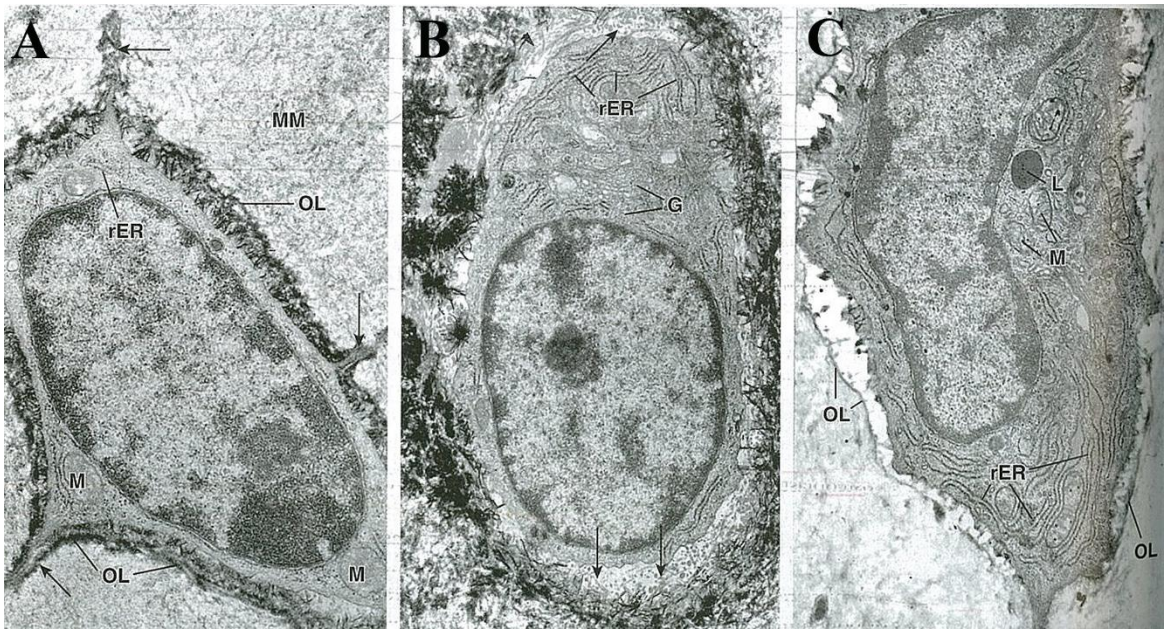
Metode elektronske mikroskopije pokazale su da osteociti prolaze kroz različite faze, ovisno o tome u kojoj su fazi osteocitne pregradnje.

Tako postoje tri njihove različite funkcionalne faze (Slika 3.).

1. Tihi osteocit - sadržava izrazito smanjenu količinu hrapave endoplazmatske mrežice i izrazito smanjen Golgijev aparat. Stanica osteocita u potpunosti popunjava lakunu pa je mineralizirani matriks u gotovo potpunome kontaktu sa staničnom membranom osteocita.

2. Aktivni (formativni) osteocit - odlaže koštani matriks i zapravo pokazuje karakteristike slične aktivnom osteoblastu. Količine hrapave endoplazmatske mrežice i Golgijevoga aparata u njima su povećane, a u neposrednoj okolini same stanice, unutar lakune se može uočiti i osteoid (nemineraliziran koštani matriks).

3. Resorptivni osteocit - kao i formativni, pokazuje povećanu količinu staničnih organela s jako naglašenim lizosomima.



Slika 3. Slike osteocita na elektronskom mikroskopu u tri različite funcionalne faze. A. Tihi osteocit - sadrži male količine hrapave endoplazmatske mrežice (rER) i nekoliko mitohondrija (M). Stanica popunjava lakunu; strelice pokazuju mjesta gdje se citoplazmatski izdanci pružaju u kanalikule. Poneki se kristal hidroksi-apatita može naći uz peristanični prostor, ili mineralizirani matriks (MM). Crnu liniju koja ukazuje na graničnu zonu lakune nazivamo osmiofilična lamina (OL). B. Aktivni (formativni) osteocit – sadrži veće količine hrapave endoplazmatske mrežice i više Golgijevog aparata (G). Mogu se zamijetiti male količine osteoida unutar stanične lakune. Unutar osteoida mogu se vidjeti nedovoljno mineralizirana kolagena vlakna (strelice). Lakune formativnog osteocita nisu omeđene osmiofiličnom laminom. C. Resorptivni osteocit – isto tako sadrži veće količine hrapave endoplazmatske mrežice (rER) i Golgijevog aparat (G), mitohondrije (M) i veće količine lizosoma (L). U lakunama nema kolagenih vlakana, ali se mogu naći male količine drugog vlaknastog materijala. Lakuna resorptivnog osteocita omeđena je osmiofiličnom laminom (OL) od susjednoga koštanog mineraliziranog matriksa (MM). Modificirano prema (23).

Nedavna istraživanja ukazuju da zdravi i umirući osteociti mogu komunicirati s osteoklastima i tako ih potaknuti na razgradnju kosti (24, 25).

Tijekom procesa stanične smrti i apoptoze osteocita, koja je pojačana tijekom starenja i u neaktivnim kostima, javljaju se apoptotična tijela koja sadržavaju molekule RANKL-a (26). Tako putem RANK-RANKL signalnog sustava dolazi do poticanja aktivnosti osteoklasta.

Osteoklasti

Osteoklast je glavna stanica odgovorna za koštanu razgradnju. Kao rezultat osteoklastične aktivnosti, na površini kosti, neposredno ispod osteoklasta, formira se plitko udubljenje ili jamica koje nazivamo Howshipova lakuna. Stanica osteoklasta ne ističe se samo svojom veličinom i količinom jezgara koje posjeduje (3-100), nego i po izrazitoj eozinofilnosti (23). Osteoklast pokazuje jaku biokemijsku reakciju na kiselu fosfatazu zbog brojnih lizosoma koje posjeduje u svojoj citoplazmi. Jedan od njih je kisela fosfataza otporna na tartarat, tzv. TRAP (od eng. tartarate-resistant acid phosphatase) koja se koristi kao klinički marker osteoklastične aktivnosti i diferencijacije (Slika 5.A.).

Osteoklasti nastaju fuzijom jednojezgrenih hematopoetskih stanica, uglavnom multipotentnih preteča monocitno/makrofagne loze, a njihova je tvorba u uskoj vezi sa stromalnim stanicama koštane srži. Stromalne stanice luče citokine, prijeko neophodne za diferencijaciju osteoklasta i makrofaga od njihovih preteča, od kojih su najvažniji stimulirajući čimbenik rasta kolonija makrofaga, m-CSF (od eng. macrophage colony-stimulating factor), čimbenik tumorske nekroze, (TNF - od eng. tumor necrosis factor) i neki interleukini (Slika 4.).

Stanice preteče osteoklasta izražavaju dva važna transkripcijska čimbenika, c-fos i jezgrin čimbenik, NF-kB. Poticatelj receptora jezgrinog čimbenika kB, RANK djeluje s ligandom poticatelja receptora jezgrinog čimbenika kB, RANKL (od eng. *receptor activator of nuclar factor kB ligand*), kojeg luče i izražavaju stromalne stanice na svojoj površini. Upravo je RANK-RANKL mehanizam vezanja neophodan i ključan za formiranje i diferencijaciju osteoklasta i njihovo sazrijevanje. Za vrijeme upalnih procesa, aktivirani T-limfociti mogu lučiti RANKL u membranskom i topljivom obliku, tako da upalni proces može potaknuti proces koštane razgradnje.

RANK-RANKL mehanizam može biti zakočen molekulom osteoprotegerina, OPG, koji inače služi kao receptor za RANKL. Luče ga uglavnom osteoblasti i reguliran je mnogim metaboličkim čimbenicima kao što su IL-1, TNF, TGF-β i vitamin D (27-30).

Prostaglandini, koji nastaju lučenjem potaknutih osteocita, potiču stvaranje RANKL-a. Istovremeno, aktivni osteoblasti u područjima odlaganja i formiranja nove kosti luče OPG koji inaktivira RANKL. Stoga, u područjima u kojima osteoblasti stvaraju novu kost nema nikakve osteoklastične aktivnosti, za razliku od susjednih područja u kojima je njihova aktivnost izrazita.

enzimi i vodikovi ioni koji razgrađuju i resorbiraju mineralnu i organsku komponentu koštanoga matriksa. Nabori membrane služe kako bi se povećala površina potrebna za egzocitozu proteolitičkih enzima i protonsku pumpu kojom se oslobađaju vodikovi ioni, ali isto tako služe i za endocitozu razgradnih produkata kosti. Lizosomi koji se nalaze u stanici osteoklasta sadržavaju hidrolitičke enzime koji se otpuštaju između nabora stanične membrane na nabranoj površini osteoklasta gdje počinju razgradnju kolagena i drugih proteina koštanoga matriksa. U tu skupinu enzima ubrajaju se cisteinska proteaza katepsin K i metaloproteinaze matriksa.

Kako bi se degradacija matriksa počela odvijati, neophodno je da prvo dođe do dekalcifikacije i zakiseljavanja matriksa snižavanjem pH čime je potrebno doći do otapanja minerala hidroksi-apatita. U tu svrhu, stanica osteoklasta sadrži karboničnu anhidrazu II koja iz ugljičnog dioksida i vode stvara ugljičnu kiselinu, a disocijacijom ugljične kiseline nastaju bikarbonatni anioni (HCO_3^-) i protoni vodika (H+). Vakuolska protonska pumpa (H-ATPaza) izbacuje stvorene protone H+ preko nabrane membrane osteoklasta u izvanstanični prostor uz kost, snižavajući vrijednost pH (pH~4.5), što potiče razgradnju mineralne i organske komponente koštanoga matriksa. Kloridni kanal (ClC-7) spojen s vakuolskom protonskom pumpom izbacuje kloridne ione u resorpcijsku jamicu i tako održava elektroneutralnost nabrane membrane. Višak bikarbonatnih aniona otklanja se pasivnom izmjenom s ionima klorida putem anionskog izmjenjivača na bazolateralnoj zoni osteoklasta.

Zakiseljavanjem matriksa i otapanjem minerala hidroksi-apatita omogućena je daljnja enzimatska razgradnja proteinskih komponenti matriksa.

Nabrana se zona na histološkim rezovima ne boji intenzivno kao ostatak stanice i često se vidi kao svijetli pojas neposredno uz kost, na mjestima resorpcije.

2. Zona prilijeganja prstenasta je zona oko nabrane zone kojom se osteoklast priljubljuje za kost. Ona sadrži brojne aktinske filamente koji su združeni vinkulinskim i talinskim proteinima, ali ne sadrži ostale stanične organele. Stanična membrana u zoni prilijeganja sadrži adhezijske molekule u koje se ubrajaju receptori integrina, vitronektina, fibrinogena. Te su molekule odgovorne za čvrstu vezu između stanične membrane osteoklasta i mineraliziranoga koštanog matriksa.

   Zona prilijeganja predstavlja mjesto gdje se odvijaju resorpcija i degradacija koštanoga matriksa.

Kad resorpcija određenoga dijela matriksa završi, osteoklast ulazi u proces apoptoze. Mnogi lijekovi korišteni za liječenje osteoporoze i inhibiciju osteoklastične aktivnosti (bisfosfonati, estrogeni) djeluju upravo na poticanje apoptoze osteoklasta.

1.2 **Metode regulacije i ubrzanja ortodontskog postupka**

1.2.1 Farmakološke metode regulacije koštane pregradnje i ortodonskog postupka

Eksperimentalne su studije pokazale da egzogenim, farmakološkim dodatkom osteoprotegerina (OPG), poznatoga inhibitora RANKL-a, može doći do usporavanja ortodontskog tretmana (31). Kako je dodavanjem rekombinatnog humanog OPG-a došlo do oporavka koštane gustoće u udovima imobiliziranih štakora (32), a sistemskom primjenom OPG-a do reduciranja koštane resorpcije (33) u različitim kliničkim manifestacijama kao što je Pagetova bolest, primarna osteoporoza, reumatoidni artritis, ostelitičke metastaze, gubitak kosti u menopauzi, znanstvenici su došli na ideju da bi lokalnom primjenom OPG-a moglo doći do značajne inhibicije osteoklastogeneze za vrijeme mehaničke modulacije koštane pregradnje kao što je ortodontski postupak, gdje je često potrebno minimalizirati nepotrebne i pretjerane pomake zuba. Tako su Dunn i suradnici koristeći rekombinantni fuzijski protein OPG-Fc u dozama od 5,0 mg/kg lokalnim injekcijama u nepčanu sluznicu blizu površine prvoga kutnjaka značajno usporili njegov ortodontski pomak na štakorima (34). Histološke su analize pokazale značajno smanjenje broja aktivnih osteoklasta (86%) na strani kompresije, a analize alveolarne kosti pokazale su povećanu koštanu gustoću kod OPG-om tretiranih životinja, čak i u odnosu na kontrolnu skupinu kod koje nije primijenjena ortodontska sila. Ta je studija otvorila vrata farmakološkoj modulaciji ortodontskoga tretmana i dala mogućnost potencijalnoj upotrebi i koristi od lokalnih inhibitora RANKL-a kod nekih manifestacija tijekom ortodontskog postupka, kao što su distalizacija kutnjaka i protrakcija i neki drugi funkcionalni i estetski problemi.

Isto tako, lokalnom primjenom RANKL-a došlo je do značajnog ubrzavanja ortodontskog postupka (35). Kanzaki i suradnici su za tu svrhu koristili metodu genskog transfera putem sustava virusnog vektora koji sadrži pcDNA-mRANKL kojega su lokalno injicirali u nekoliko navrata tijekom ortodontskog postupka na štakorima. Istraživači su otkrili da nakon lokalnog genskog transfera dolazi do povećane produkcije RANKL proteina u parodontnom tkivu, pogotovo u stanicama osteoblasta i fibroblasta unutar PDL-a, i to ne samo na strani kompresije, već na cijelome

parodontnom prostoru. Lokalnom primjenom virusnoga vektora koji sadrži RANKL gen i koji potiče lokalnu produkciju RANKL proteina u parodontnom tkivu, došlo je do značajnog ubrzanja ortodontskoga postupka, pogotovo u njegovim ranim fazama, bez izazivanja sistemskih nuspojava.

Budući da ortodontske sile stimuliraju produkciju prostaglandina, za očekivati je da prostaglandini mogu ubrzati i ortodontski tretman kao rezultat djelovanja prostaglandina na koštanu pregradnju. Naime, studije su pokazale da i inače tijekom ortodontskog tretmana dolazi do povećanja prostaglandina na strani kompresije (36). Primjenom inhibitora ciklooksigenaze (COX), enzima važnog u produkciji prostaglandina, došlo je do znatnoga smanjenja ortodontskog pomaka i broja osteoklasta na strani kompresije (37). Suprotno tome, neke su druge studije pokazale da lokalno primijenjen prostaglandin E1 (PGE1) uzrokuje povećanje koštane resorpcije i ubrzanje ortodontskog tretmana.

Paratiroidni hormon (PTH) snažan je regulator koštane pregradnje. Studije su pokazale da kontinuirana subkutana infuzija paratiroidnog hormona tijekom trinaest dana uzrokuje dvaput brži ortodontski pomak kutnjaka na štakorima i očekivani porast broja osteoklasta na strani kompresije parodontnoga ligamenta. Dodatak PTH tijekom trinaest dana u ovim eksperimentima nije sistemski utjecao na koštanu gustoću ili na serumske razine kalcija (38). Slični su rezultati dobiveni i lokalnim injiciranjem sporo-otpuštajućeg PTH (39).

Aktivni oblik vitamina D_3, [1,25 $(OH)_2D_3$], također je snažan stimulator osteoklastične aktivnosti. Već su davne 1988. godine Collins i suradnici pokazali da lokalnim injiciranjem 1,25-dihidroksi-kalciferola otopljenog u dimetil-sulfoksidu u parodontni ligament mačaka tijekom 21 dana dolazi do pomaka bržeg za 60%, a histološkim analizama pronašli su povećan broj osteoklasta koji ukazuje na resorptivni učinak vitamina D (40).

Slične su rezultate dobili Takano-Yamamoto i suradnici lokalnim injiciranjem aktivnog vitamina D_3 u submukozno područje nepca gdje su pokazali da je povećanje aktivnih osteoklasta na strani resorpcije ili kompresije bilo ovisno o dozi (41).

Primjena mnogih farmakoloških pripravaka pokazala je pozitivan učinak na ubrzanje ortodontskoga postupka. Međutim, zabilježene su mnoge nuspojave kao što su lokalna bol, izrazita resorpcija zubnih korijena i neke nuspojave vezane uz učinak lijeka, što je utjecalo na pronalaženje drugih metoda za ubrzanje ortodontskoga postupka.

1.2.2 Mehaničke metode regulacije ortodonskog postupka

Laserske zrake male energije poznate su po svome anaboličkom učinku, poticanju diferencijacije osteoblasta i ubrzanju koštanog odlaganja. Poznat je i njihov biostimulacijski učinak na zarašćivanje rana, proliferaciju fibroblasta i kondrocita, sintezu kolagena i regeneraciju živaca. Kawasaki i suradnici promatrali su učinak laserskih zraka na ortodontski postupak na štakorima (42). Ga-Al-As diodni laser korišten je lokalno za iradijaciju određenog područja po tri minute dnevno tijekom dvanaest dana.

U eksperimentalnoj skupini koja je bila izložena laserskim zrakama otkriveno je kako je ortodontski postupak brži (1,3 puta) negoli u kontrolnoj skupini. Količina odlaganja nove kosti mjerena kalceinskim bojanjem i dinamičkom histomorfometrijom, kao i stanična proliferacija, bili su znatno veći na strani tenzije dok je broj osteoklasta kod životinja u pokusu bio znatno veći na strani kompresije.

Jedna od metoda je i mehaničko opterećenje kosti neophodno za održanje koštane mase i integriteta. Povećanje mehaničkog opterećenja dovodi do povećanja koštanog odlaganja i obrnuto, gubitak opterećenja za vrijeme imobilizacije ili bestežinskog stanja dovodi do gubitka kosti.

Liskova i suradnici pokazali su da dinamičko, a ne statičko, opterećenje uzrokuje povećanje koštanog odlaganja kod kunića (43). Statičko opterećenje pak može inhibirati odlaganje (44).

Povećana duljina trajanja mehaničkog opterećenja ne povećava količinu formiranja kosti. Kako se vrijeme opterećenja povećava, tako tvorba nove kosti ima tendenciju zasićenja. U jednoj se, naime, studiji promatrao utjecaj skokova na morfološke i mehaničke promjene u kostima štakora. Životinje su bile podijeljene na kontrolnu skupinu i skupine od 5, 10, 20, 40 i 100 skokova na dan. Životinje s pet skokova dnevno imale su istu količinu formiranja nove kosti kao i životinje s visokim dnevnim brojem skokova (45).

Ta su zapažanja dovela do zaključka da su koštane stanice u stanju osjetiti i reagirati na mehaničke podražaje, ali njihova mehanosenzitivnost opada neposredno nakon primjene mehaničkoga opterećenja. Tako se nakon kontinuiranog opterećenja kost desenzitizira na mehaničke podražaje. Isto tako je dokazano da, ako se primijeni određeno vrijeme oporavka ili mirovanja između aplikacija opterećenja (otprilike osam sati), kost je u stanju nadoknaditi mehanosenzitivne sposobnosti (46).

Studije su pokazale da adolescenti koji se bave sportovima s visokofrekventnim mehaničkim naporima (gimnastika, odbojka) imaju puno veću gostoću kosti negoli adolescenti koji se bave plivanjem (47, 48). Druge studije, na ovcama, pokazale su da mehaničke sile malih amplituda, ali visokih frekvencija (sile vibracija), primijenjivane samo po 20 minuta na dan povećavaju koštanu gustoću bedrene kosti ovce za 34% u odnosu na kontrolne skupine. Te su vibracijske sile bile 20 puta veće od sila koje se odvijaju kod normalnih aktivnosti kao što je stajanje, pa je ukupno opterećenje koje je bilo primijenjivano samo po 20 minuta na dan bilo veće negoli cjelodnevno opterećenje kod nestimuliranih životinja (49).

Primjena cikličkih mehaničkih sila magnitude 5 Newton-a (N) pokazala je ubrzaniji rast i bržu osteogenezu u nepčanom šavu mladih kunića negoli kad su se primijenjivale statičke sile istih magnituda (50). Slično tome, primjena cikličkih mehaničkih sila na ploču rasta u novorođenih kunića izazvala je značajno povećanje broja proliferirajućih kondrocita u odnosu na kontrolnu skupinu, kao i značajno povećanje dimenzija same ploče rasta (51).

Svi ovi rezultati ukazuju da kratke doze cikličkih, intermitentnih mehaničkih sila mogu potaknuti stanične i molekularne odgovore u koštanom sustavu.

Mnoge su studije koristile različite oblike visokofrekventnih sila malih amplituda za ubrzanje ortodontskoga tretmana.

Stark i suradnici koristili su pulsno elektromagnetsko polje, PEMF (od eng. *pulsed electromagnetic field*) za ubrzanje ortodontskog tretmana na eksperimentalnim životinjama i za proučavanje učinka elektromagnetskog polja na koštanu fiziologiju i metabolizam i eventualnih sistemskih nuspojava (52).

Rezultati studije pokazali su značajno ubrzanje ortodontskog postupka tijekom desetodnevne primjene elektromagnetskog zračenja, kao i povećano odlaganje koštanog matriksa na strani tenzije između ortodontski tretiranih sjekutića životinja. To povećanje stanične aktivnosti bilo je popraćeno i povećanim brojem aktivnih osteoklasta u alveolarnoj kosti oko sjekutića. Primjećene su minimalne promjene seroloških parametara, uključujući proteinski metabolizam i mišićnu aktivnost. Rezultati studije potvrdili su da je moguće ubrzati ortodontski postupak primjenom elektromagnetskoga polja.

Darendelier i suradnici su 2007. godine dobili slične rezultate na eksperimentalnim štakorima. U njihovim eksperimentima uz ortodontske naprave, postavljeni su bili i neomidijsko-željezni

magneti između maksilarnih kutnjaka i sjekutića. Životinje u eksperimentalnoj skupini bile su izložene elektromagnetskome polju i u toj su skupini zabilježeni veći pomaci između sjekutića i maksilarnih kutnjaka (53). Čini se kako primjena statičkog elektromagnetskog polja nema učinka na brzinu ortodontskoga pomaka (54).

Neki su istraživači promatrali utjecaj vibracijskih mehaničkih sila na učinkovitost ortodontskoga pomaka. 2008. godine Nishimura i suradnici promatrali su utjecaj tzv. rezonantne vibracije na brzinu ortodontskoga pomaka maksilarnih kutnjaka (55). Rezonantnu vibraciju definirali su kao vibracijsku frekvenciju koja je jednaka prirodnoj, normalnoj frekvenciji prvoga maksilarnog kutnjaka štakora i za koju je najvjerojatnije da najučinkovitije može potaknuti stanične i molekularne odgovore u parodontnom tkivu, pa tako najučinkovitije djelovati i na ortodontski postupak povećavajući aktivnost stanica unutar parodontnoga ligamenta. Između lijevih i desnih prvih maksilarnih kutnjaka bila je postavljena ekspanzijska žičica čija je uloga bila da kutnjake pomiče prema sluznici obraza u trajanju od tri tjedna. Eksperimentalna skupina životinja bila je izložena vibracijskim podražajima prosječne frekvencije 60Hz u trajanju od osam minuta i to jednom tjedno. Za studiju je posebno napravljen vibracijski sistem po kojemu je bilo moguće primijenjivati vibracijske podražaje na kutnjake s konstantno mijenjanim frekvencijama i pomoću kojega je tako bilo moguće istodobno mjeriti rezonantnu frekvenciju i tu rezonantnu frekvenciju posebno koristiti za svaku individualnu životinju tijekom trajanja pokusa. Istraživači su otkrili ubrzanje ortodontskoga postupka za oko 15% i povećan izražaj RANKL-a u fibroblastima i osteoklastima parodontnoga ligamenta. Isto tako, zabilježili su povećan broj osteoklasta osam dana nakon početka pokusa. Ti su rezultati omogućili pretpostavku da vibracijski podražaji rezonantnih frekvencija mogu ubrzati ortodontski postupak i to vjerojatno djelujući putem RANK-RANKL mehanizma. Negativne strane studije su bile te što se nije znalo kolika je točno snaga vibracijskih podražaja korištena i to što su se za ortodonski postupak koristile ekspanzijske žičice koje mogu eventualno utjecati na rastezanje nepčane suture, pa tako i zamaskirati stvarni pomak uzrokovan ortodontskom napravom.

Uzimajući u obzir rezultate svih ovih studija i znajući da ciklički, vibracijski podražaji snaga malih amplituda mogu povećati gustoću dugih kostiju i potaknuti osteogenezu i pregradnju kosti, a istodobno imaju male ili nikakve nuspojave, došlo se do zaključka da bi se veću važnost trebalo davati pokusima kojima bi se istraživao utjecaj cikličkih vibracijskih podražaja zadanih frekvencija i određenih amplituda snaga.

2. HIPOTEZA

S obzirom na dosadašnje spoznaje, hipoteza je ovog istraživanja da ciklički vibracijski podražaji mogu ubrzati ortodonstki postupak na eksperimentalnim štakorima i uzrokovati veći pomak kutnjaka. Pretpostavka je da je taj učinak posljedica djelovanja na povećanu osteogenezu na strani tenzije popraćenom povećanom staničnom proliferacijom i koštanim parametrima kao i na povećanu ili ubrzanu resorpciju alveolarne kosti na strani kompresije parodontnog ligamenta zbog ubrzane osteoklastogeneze. Pretpostavljamo da će navedene promjene zavisiti o frekvenciji vibracijskih podražaja.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ovim istraživanjem želi se dokazati da upotrebom cikličkih vibracijskih podražaja određenih frekvencija, 30Hz i 60Hz dolazi do bržeg ortodontskog postupka *in vivo*.

Stoga su postavljeni slijedeći ciljevi:

a) precizno izmjeriti ortodontski pomak, odnosno pomake prvog kutnjaka metodom dvodimenzionalne mikro-kompjuterizirane tomografije u svim eksperimentalnim grupama

b) mjerenjem koštanih parametara alveolarne kosti unutar korijenova prvog kutnjaka metodom dvodimenzionalne mikro-kompjuterizirane tomografije procijeniti učinak vibracije na tvorenje kosti i koštanu pregradnju te pratiti pojavu mineralizacije parodontnog ligamenta tijekom ortodontskog postupka

c) lokalizirati aktivne osteoklaste na histološkim preparatima kutnjaka i postupcima histomorfometrije kvantitativno odrediti učinak vibracije na osteoklastogenezu među eksperimentalnim grupama

d) gledati učinak vibracije na stanje stanične proliferacije parodontnog ligamenta imunohistokemijskim postupkom ugradnje BrdU-a

e) promatrati učinak vibracije na vitalnost stanica i strukturne promjene kolagenih vlakana u parodontnom ligamentu posebnim bojanjima i metodom multifoton mikroskopa

f) za vrijeme primjene vibracijskih (cikličkih) stimulusa na eksperimentalnim životinjama registrirati pomaknuće (od eng. *displacement)* vibracijske elektrode potrebne za postizanje sile od 0,4N da bi se ustanovilo da li se ono mijenja kod 2 različite frekvencije i ustanoviti moguću povezanost količine pomaknuća sa razinom oštećenja, odnosno količinom apoptoze stanica u parodontnom ligamentu.

4. MATERIJALI I METODE

4.1 **Pokusne životinje**

U istraživanju su korištene ženke štakora soja Sprague-Dawley (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, SAD) stare sedam tjedana. Nakon dospijeća u vivarij Zdravstvenog centra Sveučilišta Connecticut, životinje su održavane u standardnim uvjetima, u skladu sa NIH-standardima za rukovanje i rad s laboratorijskim životinjama, uz režim 14 sati svjetla i 10 sati tame dnevno, standardnu prehranu i vodu *ad libitum*.

Ukupno je za istraživanje upotrijebljeno 35 životinja. Pokusi su izvođeni uz dozvolu Etičkoga povjerenstva za brigu o laboratorijskim životinjama (od eng. *Animal Care Committee*).

4.2 **Ustroj pokusa**

Kako je istraživanje bilo eksperimentalno, prije početka izvođenja pokusa bilo je potrebno odrediti eksperimentalne skupine, te nasumično razvrstati životinje iste dobi i spola. U postupak je uključeno pet skupina životinja:

- Skupina životinja tretirana samo ortodontskim oprugicama - TMO skupina (od eng. *tooth movement only*), devet životinja
- Skupina životinja tretirana ortodontskim oprugicama čiji su lijevi prvi maksilarni kutnjaci dodatno stimulirani vibracijom frekvencije 30Hz - TM30skupina (od eng. *tooth movement and 30Hz vibration*), devet životinja
- Skupina životinja tretirana ortodontskim oprugicama čiji su lijevi prvi maksilarni kutnjaci dodatno stimulirani vibracijom frekvencije 60Hz - TM60 skupina (od eng. *tooth movement and 60Hz vibration)*, devet životinja
- Skupina životinja čiji su lijevi prvi maksilarni kutnjaci stimulirani samo vibracijom frekvencije 30Hz - VBO skupina (od eng. *vibration only*), četiri životinje
- Sku*pina životinja koja nije tretirana* ortodontskim oprugicama niti dodatnim vibracijskim stimulacijama - kontrolna skupina (CTRL), četiri životinje

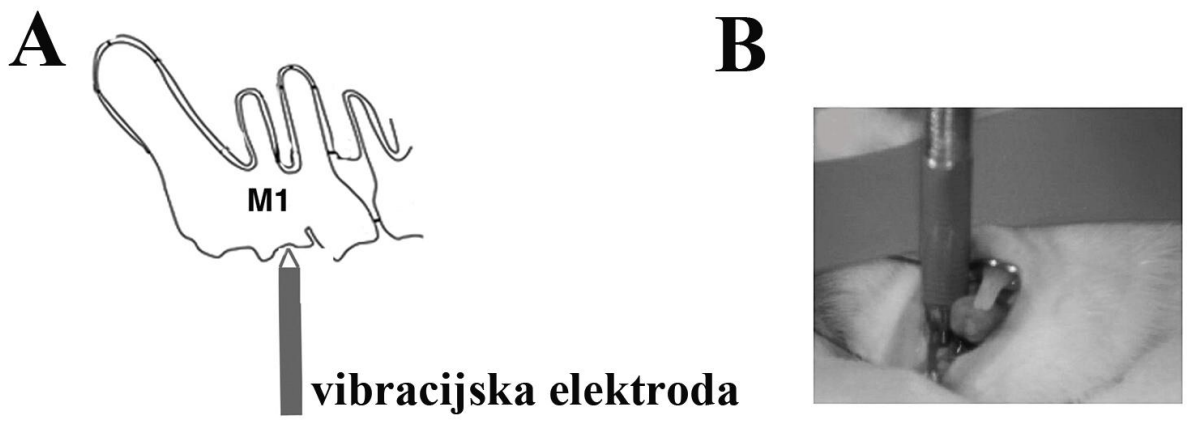
Zbog kontinuiranoga rasta inciziva, brazdice su nanovo bušene nakon tjedan dana, a opruge su s vrha inciziva pomaknute prema gingivi. Budući da se prvi kutnjak lagano pomicao prema sjekutićima, smanjivala se udaljenost između kutnjaka i sjekutića. Kako bi se postigla konstantna sila tenzije od 25g na prvi kutnjak, opruga je reaktivirana nakon tjedan dana tako da joj je završetak na sjekutiću nategnut malo proksimalnije prema usnici. Trajanje eksperimenta, odnosno ortodontskog postupka, bilo je četrnaest dana.

4.4 **Primjena vibracijskih (cikličkih) stimulacija**

Neposredno prije primjene vibracijskih podražaja, životinje su bile anestezirane ketaminom i ksilazinom, istom dozom kao i kod primjene ortodontskih opruga. Nakon duboke anestezije, tzv. opruga-podupirač namještena je između maksilarnih i mandibularnih kutnjaka što je omogućilo da čeljusti eksperimentalnih životinja budu stalno otvorene i da jezik bude pričvršćen uz donje incizive. Time je omogućen slobodan pristup maksilarnim kutnjacima. Za primjenu unilateralnih cikličkih vibracijskih podražaja korišten je elektromehanički aktivator na čijem je kraju bila postavljena vibracijska elektroda (Model 3230, Bose/EnduraTec, Minnetonka, MN), lagano postavljena okomito na okluzijsku površinu prvog lijevog maksilarnog kutnjaka (Slika 8.). Sila vibracijskih podražaja, odnosno sila kompresije na lijevi prvi kutnjak, iznosila je maksimalno 40g (0,4N), zapravo se ciklički kretala u rasponu od 0,1N – 0,4N. Sila kompresije primjenjene na krunu prvog kutnjaka kontrolirana je senzorom smještenim na vrhu vibracijske elektrode. Primijenjivane su dvije različite frekvencije - 30Hz (ciklusa/sekundi) i 60Hz, ovisno o eksperimentalnoj skupini.

Za pričvršćivanje elektrode na okluzijsku površinu lijevog prvog maksilarnog kutnjaka nije korišten kompozitni cement niti bilo kakav medij. Ukoliko bi došlo do skliznuća elektrode s kutnjaka, senzor bi na ekranu registrirao silu kompresije od 0N što bi zahtijevalo ponovno namještanje elektrode. Isti je senzor korišten za registriranje pomaknuća, odnosno izmještanja (od eng. *displacement*) vibracijske elektrode koji je prema prijašnjemu iskustvu različit kod različitih frekvencija. Taj je pomak bio izražen u mikrometrima i od uzastopnih mjerenja pri svakoj primjeni vibracijskih podražaja, korištena je srednja vrijednost za određenu životinju. Ukupno je praćeno šest životinja za frekvencije od 30Hz i šest zivotinja za frekvencije od 60Hz, u TM30 i TM60 eksperimentalnoj skupini.

Primjena vibracijskih podražaja trajala je po 10 minuta, a korištena je dva puta tjedno u razmaku od tri do četiri dana u cjelokupnom trajanju ortodontskoga tretmana koji je iznosio četrnaest dana. To je zahtijevalo ukupno pet obrada po svakoj eksperimentalnoj životinji.



Slika 8. Primjena vibracijskih podražaja na eksperimentalnim životinjama. A. Shematski prikaz vibracijske elektrode elektromehaničkog aktivatora koja je postavljena okomito na okluzijsku površinu prvoga maksilarnog kutnjaka (M1). Putem elektrode su dostizani i bili kontrolirani ciklički vibracijski podražaji od 30 ili 60Hz, raspona sile 0,1 – 0,4N. B. Vibracijska elektroda postavljena na maksilarnom kutnjaku na anesteziranoj životinji. Opruga podupirač omogućavala je da čeljusti životinja budu neprestano otvorene i fiksirane u jednom položaju, te da jezik bude udaljen od elektrode i površine za vibraciju. Trajanje vibracijskih stimulusa bilo je 10 minuta, dvaput tjedno.

4.5 **Mikro-kompjuterizirana tomografija (micro-CT)**

Nakon završetka pokusa, odnosno nakon četrnaest dana ortodontskog postupka, životinje su žrtvovane gušenjem ugljikovim dioksidom (CO_2), a potom i cervikalnom dislokacijom. Nakon izdvajanja maksila i odstranjenja mekih tkiva s koštanih površina, maksile su fiksirane u 10%-tnom formalinu na $+4^0$ C u trajanju od pet dana. Tako pripremljeni uzorci skenirani su postupkom mikro-CT-a (od eng. *micro-focus X-ray computed tomography*). Za vrijeme fiksacije, opruge su ostavljene aktivirane na kutnjacima kako ne bi došlo do eventualnog relapsa, odnosno vraćanja zuba u prvobitan položaj. Neposredno prije skeniranja odstranjene su žičice i opruge da ne bi stvarale sjenu metala na snimkama. Snimljen je niz serijskih dvodimenzionalnih sagitalnih radiografskih snimki maksila da bi se precizno izmjerila udaljenost između prvih i drugih lijevih maksilarnih kutnjaka, što je pokazivalo učinkovitost ortodontskoga postupka. Mikro-CT analiza svakog uzorka

obavljena je uz pomoć osoblja mikro-CT ureda Zdravstvenog centra Sveučilišta u Connecticutu. Snimanje je obavljeno korištenjem 55 kV i 145 mA, prikupljanjem 1000 projekcija po rotaciji integracijskoga vremena od 300 ms. Trodimenzionalne slike konstruirane su uz standardnu konvoluciju i algoritme sa Shepp i Logan filterskim sustavom, pri rezoluciji od 16μm.

Skenirane slike rekonstruirane su pomoću SkyScan Recon programa i analizirane pomoću SkyScan CTAnalyser v. 1.10 2010 programa.

Mjerenja su obavljena na tri uzastopne sagitalne snimke koje su najbolje prikazivale strukturu distobukalnoga i meziobukalnog korijena, odnosno na tri snimke koje su prikazale najveću količinu zubne pulpe u ta dva korijena, što je zapravo definiralo središnjicu navedenih korijena. Precizno gledajući, na izabranim je snimkama povučena linija između najproksimalnije točke na kruni drugog maksilarnog kutnjaka i najdistalnije točke na kruni prvog maksilarnog kutnjaka. Za statističku obradu uzeta je srednja vrijednost na temelju tri različita mjerenja kod svake životinje.

Kako ortodontski postupak izaziva resorpciju alveolarne kosti i osteopeniju, posebna je pažnja posvećena analizi alveolarnih koštanih parametara. Određeni su sljedeći parametri:

koštani obujam (BV/TV, od eng. *bone volume/trabecular volume*; %), gustoća tkiva (TD, od eng. *tissue density*) te uočena gustoća (AD, od eng. *apparent density*).

Regija interesa za analizu ovih parametara sastojala se od prostora koji u vertikalnoj ravnini polazi od najviše točke bifurkacije do dna apeksa. U transverzalnoj ravnini, taj je prostor omeđen rubovima lingvalne i bukalne strane kortikalne kosti maksile, a u sagitalnoj se ravnini pruža 200 μm od proksimalne strane distobukalnog i distolingvalnog korijena prema meziobukalnom i meziolingvalnom korijenu.

4.6 **TRAP bojanje i kvantifikacija osteoklasta**

Nakon fiksacije, maksile su dekalcinirane 14%-tnom otopinom etilen-diaminotetra-octene kiseline (EDTA) u trajanju od četiri tjedna, dehidrirane u rastućim koncentracijama etanola i na kraju izložene ksilolu. Uzorci su uklopljeni u parafin na 56^{o}C. Maksile, odnosno prvi maksilarni molari, mikrotomom (Leica, tip mikrotoma) izrezani su uzdužno na debljinu reza od 5 μm.

Bojanje na TRAP (od eng. *tartarat-resistant acid phosphatase*) provedeno je korištenjem tvorničkog seta kemikalija za bojanje leukocitne kisele fosfataze (Sigma Chemical, St Louis, MO)

prema uputama proizvođača. Kao pozadinsko bojanje korišten je hematoksilin. Samo TRAP pozitivne višejezgrene stanice s dvije ili više jezgri po stanici u izravnome dodiru s koštanom površinom smatrane su aktivnim osteoklastima. Aktivni osteoklasti brojani su na definiranoj površini alveolarne kosti, na strani kompresije distobukalnoga korijena prvoga maksilarnog kutnjaka. Definirana površina sastojala se od kvadrata usporednoga sa sagitalnom osi distobukalnoga korijena. Jedna strana toga kvadrata prilijegala je na granicu između alveolarne kosti i parodontnog ligamenta i pružala se od početka bifurkacije do dna apeksa, a druga, okomita strana kvadrata, iznosila je 200 μm i pružala se proksimalno. Uz broj osteoklasta izračunat je i parameter površine kosti na kojoj su se nalaze aktivni osteoklasti - OcS (od eng. *osteoclast surface*). Taj je parameter dobiven dijeljenjem ukupne površine aktivnih osteoklasta s ukupnom površinom kosti u zadanom kvadratu. Histomorfometrijske analize izvedene su pomoću kompjuterskog programa Osteomeasure Software (OsteoMetrics, Inc., Decatur, GA).

4.7 **Von Kossa bojanje i procjena mineralizacije u parodontnom ligamentu**

Maksile na kojima je trebalo procijeniti mineralizaciju obrađene su za smrznuto uklapanje. Nakon fiksacije u 10%-tnome formalinu na $+4^0$ C u trajanju od pet dana, nedekalcinirane su maksile oprane u fiziološkoj otopini i potom uložene u 30%-tnu otopinu saharoze preko noći. Sljedećega dana, maksile su orijentirane i uklopljene u medij za smrznuto uklapanje (Shandon Cryomatrix embedding resin, Thermo Fisher Sceintific, Kalamazoo, MI, USA), a potom su zajedno s medijem uronjene u 2-metil-butan (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA), prethodno ohlađen na suhom ledu. Uklopljena tkiva čuvana su na -20^0C. Rezanje smrznutih nedekalciniranih maksila, odnosno prvih maksilarnih molara, omogućeno je uporabom tzv. tungsten noža (TC-65; Leica, Inc. Nussloch, Germany) na kriostatu (Leica CM1900 Cryostat, D-69226; Leica, Inc., Nussloch, Germany). Njime su kutnjaci uzdužno izrezani na debljinu reza od 5 μm zajedno s tzv. Cryofilm-vrpcom (Cryofilm type II (C) (Section Lab Co. Ltd, Japan) koja je omogućila da hladni rez prione za nju i tako onemogući razmsrkavanje tkiva. Filmovi sa zalijepljenim rezovima potom su prenešeni na mikroskopsko stakalce.

Neposredno prije bojanja, rezovi su oprani u destiliranoj vodi i izloženi 5%-tnoj otopini srebrnoga nitrata. Nakon dva ciklusa izlaganju UV uređaju (UV Stratalinker 1800) (30 sek svaki ciklus), rezovi su nekoliko puta iznova oprani u destiliranoj vodi, a potom obojani na hematoksilin. Prisustvo kalcijevih soli, odnosno minerala, bilo je popraćeno smeđocrnom bojom. Nakon

nanošenja pokrovnoga stakalca, obojani rezovi analizirani su na svjetlosnome mikroskopu (Zeiss Axiovert 200 M) i uslikani digitalnim fotoaparatom Axiocam MRc.

4.8 Ugradnja 5-bromo-2-deoksi-uridina (BrdU) u parodontnom ligamentu i mjerenje stanične proliferacije

Kako bi učinak vibracije na proliferaciju stanica u parodontnom ligamentu bio vidljiv, životinjama u VBO-skupini tri sata prije zadnje primjene vibracijske stimulacije frekvencije 30 Hz, odnosno tri sata prije žrtvovanja, injiciran je BrdU intraperitonealno u dozi od 0,1mg/g tjelesne težine.

Analiza proliferacije provedena je imunohistokemijskim bojanjem na BrdU korištenjem seta kemikalija za bojanje (Zymed Laboratories–Invitrogen Corporation, Carlsbad, Calif) prema uputama proizvođača.

Deparafinirani histološki rezovi 10 minuta su inkubirani 3%-tnom otopinom vodikovoga peroksida (H_20_2) kako bi se blokiralo endogene peroksidaze, a potom su 10 minuta inkubirani tvornički pripravljenom otopinom tripsina na 37^0C. Nakon 30 minuta inkubacije tvornički pripravljenom otopinom za denaturaciju DNA, i inkubacije otopinom za blokiranje nespecifičnih mjesta, tkiva su izložena biotiniliranom mišjem protutijelu anti-BRDU tijekom sat vremena. Nakon pranja, preparati su obrađivani avidin–peroksidazom 10 minuta, a reakcija je razvijena pomoću 3,3-diaminobenzidina (DAB) tijekom jedne do dvije minute. Potom su preparati obojani hematoksilinom. Negativne kontrole bile su pripravljene tako da se umjesto primarnog protutijela koristila otopina za blokiranje nespecifičnih mjesta. Obojani rezovi analizirani su na svjetlosnome mikroskopu (Zeiss Axiovert 200 M), a proliferirajuće su stanice uslikane digitalnim fotoaparatom Axiocam MRc.

Za kvantifikaciju proliferacije, analizirane su višestruke slike parodontnog ligamenta koje su obuhvatile regiju od apeksa distobukalnog korijena preko bifurkacije sve do apeksa miziobukalnoga korijena prvoga maksilarnog molara. Izračunat je ukupan broj proliferirajućih i neproliferirajućih stanica za navedenu regiju. Indeks (omjer) proliferacije dobiven je dijeljenjem broja proliferirajućih stanica s ukupnim brojem stanica.

Za svaku životinju izabrana su nasumično tri različita reza od kojih se izračunala srednja vrijednost. Razina proliferacije mjerena je na lijevom i desnom prvom maksilarnom molaru pa je napravljen t-test između lijeve i desne strane. Na taj je način izbjegnuta moguća pogreška

uzrokovana različitim unosom (od eng. *intake*) pripravka BrdU-a.

4.9 TUNEL metoda i kvantifikacija apoptotičnih stanica u parodontnom ligamentu

Analiza apoptoze stanica u parodontnom ligamentu izvedena je TUNEL metodom (od eng. *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*) na deparafiniranim histološkim rezovima korištenjem seta kemikalija za bojanje DeadEnd Fluorometric TUNEL System Kit (Promega Corp., Madison, WI, # G3250) prema uputama proizvođača. Metoda se temelji na detekciji DNA fragmenata koji su proizašli kao rezultat procesa apoptoze. Kao pozadinsko bojanje korištena je nuklearna boja DAPI (od eng. *4',6-Diamidino-2-Phenylindole*) kako bi se obilježile sve stanice.

Obojani rezovi analizirani su određenim filterima (FITC i DAPI) na fluorescentnom mikroskopu (Zeiss Axiovert 200 M) i potom uslikani digitalnim fotoaparatom Axiocam MRc. Za kvantifikaciju apoptotičnih stanica, analizirane su višestruke slike parodontnoga ligamenta kojima je obuhvaćena regija od apeksa distobukalnog korijena preko bifurkacije sve do apeksa miziobukalnoga korijena prvoga maksilarnog molara. Izračunat je udio apoptotičnih stanica u ukupnom broju stanica (DAPI pozitivnih stanica) u parodontnome ligamentu.

Za svaku životinju nasumično su izabrana tri različita reza od kojih je izračunata srednja vrijednost. Ukupno su analizirane tri životinje u svakoj eksperimentalnoj grupi.

4.10 Bojanje na Picro-sirius Red i analiza kolagenih vlakana pod svjetlosnim i polariziranim mikroskopom

Picro-sirius Red boja specifično se veže za kolagena vlakna različitoga promjera zbog čega je korištena za razlikovanje kolagena tipa 1 i kolagena tipa 3. Pod svjetlosnim mikroskopom sva su kolagena vlakna obilježena crvenom bojom, ali pod polariziranim svjetlom, određena se vlakna mogu točno odrediti (kolagen tipa 1 boji se žutom bojom, kolagen tipa 3 zelenom bojom), kao i njihova orijentacija.

Neposredno prije bojanja, deparafinirani histološki preparati kutnjaka oprani su nekoliko puta u destiliranoj vodi, a potom su izloženi 0,1%-tnoj otopini Sirius red F3B-a u zasićenoj pikričkoj kiselini sat vremena. Nakon dva kratka pranja u 0,01 molarnoj otopini hidroklorne kiseline,

preparati su dehidrirani pranjem u 100%-tnom alkoholu tri puta po tri minute i potom izloženi ksilolu prije stavljanja pokrovnog stakalca.

Osušeni preparati, odnosno kolagena vlakna, analizirani su najprije svjetlosnim mikroskopom (Zeiss Axiovert 200M) i uslikani Axiocam MRc digitalnim fotoaparatom, a nakon toga su analizirani i pod polariziranim svjetlom na istom mikroskopu kako bi se bolje vidjela orijentacija pojedinih (tankih i debelih) kolagenih vlakana, a posebno građa i orijentacija debljih vlakana popraćena žutom bojom.

4.11 **Procjena kvalitete kolagenih vlakana na neobojanim histološkim rezovima pomoću multifoton mikroskopa**

Multifoton mikroskop koristi svjetlo dugih valnih duljina za ekscitaciju flurofora unutar ispitivanoga tkiva (u ovome slučaju kolagena). Flurofori u tkivu absorbiraju energiju ekscitacije dva fotona dugih valnih duljina koji moraju doći simultano kako bi ekcitirali elektron iz tkiva u više energetsko stanje. U tom slučaju, elektron emitira fluorescentni signal koji se detektira posebnim senzorima. 2-foton mikroskop varijanta je multifoton mikroskopa koji za ekscitaciju koristi infracrvene lasere. Oni izrazito smanjuju raspršivanje signala u tkivu i omogućuju snimanje (penetraciju) tkiva u debljini od 1mm. Pozadinski signal u 2-foton mikroskopiji jako je nizak pa je metoda detekcije vrlo senzitivna.

Biološki materijali kao kolagen, mikrotubuli i mišićni miozin mogu producirati tzv. SHG (od eng. second harmonic generation) signal. Kako bi došlo do produkcije SHG signala potreban je prolazak laserskoga svjetla kroz materijal (tkivo) koji ima specifičnu, noncentrosimetričnu (kristalografski pojam) molekularnu strukturu. Signal koji se potom dobije ima točno dvostruko manju valnu duljinu, odnosno dvostruko veću frekvenciju, nego svjetlo koje se koristi za eksitaciju, i ne gubi na snazi za vrijeme ekscitacije. Kolagen zbog svoje specifične molekularne orijentacije može producirati SHG signal kod određene ekscitacije i tako je moguća njegova detekcija u 2-foton mikroskopiji bez da se tkivo dodatno boji ili obilježava fluorescentnim bojama.

Deparafinirani, a potom hidrirani histološki preparati kutnjaka uzeti iz svih pokusnih skupina slikani su multi-foton mikroskopom (Ultima IV, Prairie Technologies, Middleton, WI). Duž cijele su debljine preparata uzorci skenirani u razmacima od 1μm ekcitacijom valne dužine 900nm. Kolagena vlakna snimljena su tehnikom SHG, a signal dobiven tom tehnikom detektiran je pomoću filtera propusnih opsega 435 - 485nm. Projekcije su rekonstruirane korištenjem kompjuterskoga

programa Fiji image analysis.

4.12 Statistička obrada podataka

Broj životinja po eksperimentalnoj grupi određen je pri planiranju istraživanja te naznačen uz svaku legendu slike. Svi pokusi ponovljeni su barem tri puta. Rezultati mjerenja prikazani su kumulativno za sve pokusne životinje u odgovarajućim pokusima. Mjerama deskriptivne statistike izračunata je srednja vrijednost (mean) i standardna devijacija (SD). Za analizu razlika između skupina korišten je statistički test jednosmjerne analize varijance (1-way ANOVA) uz Bonferroni post-hoc test. Za analizu promjena pomaknuća vibracijske elektrode pri 30 i 60Hz frekvencije, korišten je nesparen t-test. Rezultati analize kolagenih vlakana tumačeni su kvalitativno. Pri testiranju su p-vrijednosti manje od 0,05 smatrane statistički značajnima. Statistička obrada podataka provedena je kompjuterskim programom GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1 **Mjerenja pomaka kutnjaka nakon ortodontskog tretmana**

Kako bi se proučio učinak vibracijskih podražaja na brzinu i učinkovitost ortodontskoga tretmana, potrebno je ustanoviti količinu proksimalnoga pomaka prvoga maksilarnog kutnjaka (pomak prema sjekutiću) u svim eksperimentalnim skupinama. Po završetku ortodontskoga tretmana, odnosno 14 dana nakon postavljanja ortodontskih opruga, obavljena su mjerenja pomaka kutnjaka na fiksiranim maksilama metodom mikro-kompjuterizirane tomografije. Na izabranim dvodimenzionalnim mikro-CT snimkama mjerene su udaljenosti između najproksimalnije točke na kruni drugoga maksilarnog kutnjaka i najdistalnije točke na kruni prvoga maksilarnog kutnjaka što je definiralo intermolarnu udaljenost (1M-2M) (Slika 9.). Navedene su udaljenosti u kontrolnoj i VBO skupini iznosile gotovo uvijek nula mm.

Statistička obrada napravljena je nakon određivanja prosječnih vrijednosti na tri odabrane mikro-CT snimke za svaku životinju. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost uz SD (standardna devijacija) i u kontrolnoj su skupini iznosile 0,0150±0,0300 mm, u VBO skupini 0±***0*** mm, u TMO skupini 0,4863±0,1776 mm, u TM60 skupini 0,4529±0,1664 mm i u TM30 skupini 0,2424±0,1394 mm.

Bonferroni post hoc test pokazao je statistički značajan porast intermolarnih udaljenosti u TMO i TM60 skupini u odnosu na kontrolnu i VBO skupinu, ali ne i statistički značajnu razliku između TM30 i kontrolne i VBO skupine. Također, ustanovljena je statistički značajna razlika između TMO i TM30 skupine i TM60 i TM30 skupine, ali ne između TM0 i TM60 skupine (ANOVA, $p<0,001$) (Slika 10).

Iz navedenih je podataka moguće zaključiti da ortodontski tretman uvjetovan postavljanjem opruga konstantne sile od 25grama na prvi maksilarni kutnjak u neprekidnom trajanju od 14 dana, uzrokuje znatan pomak prvoga kutnjaka prema sjekutiću u skupinama životinja koje su bile izložene ortodontskom tretmanu. Vibracijski podražaji izazvani frekvencijama 30Hz i 60Hz izazvali su smanjenje pomaka, odnosno usporavanje ortodontskog tretmana.

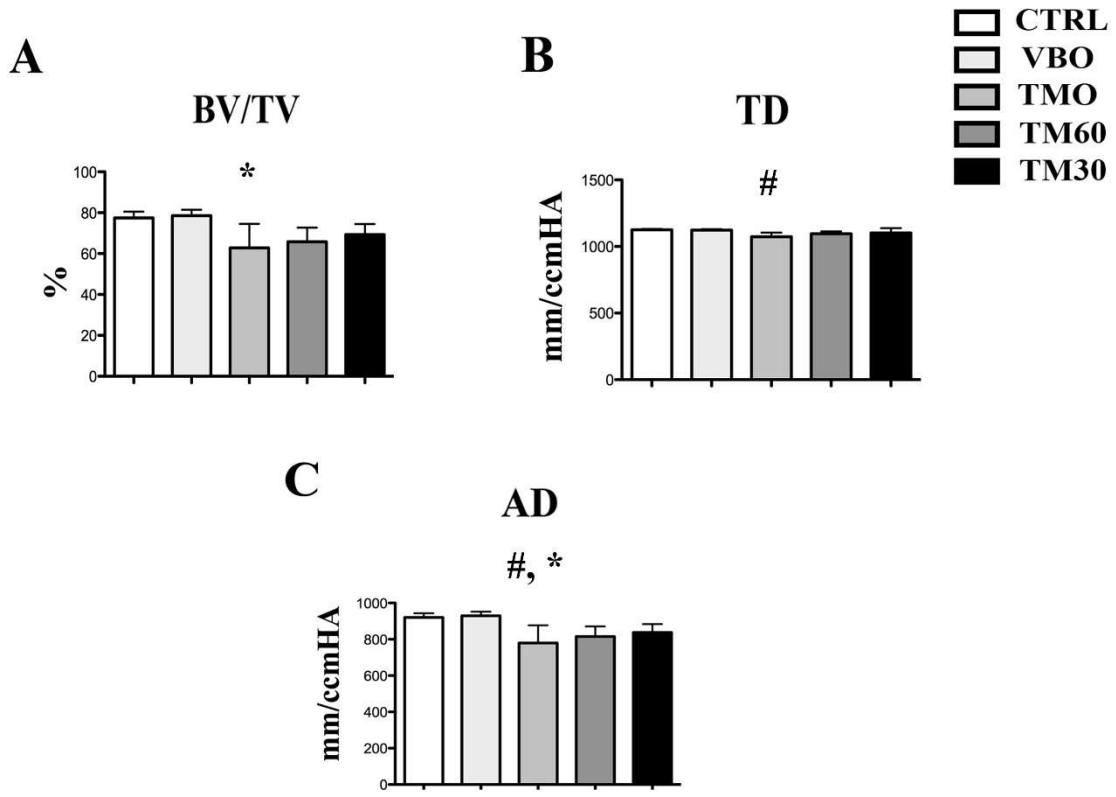
Statistički značajne manje vrijednosti intermolarnog pomaka u TM30 skupini ukazale su da ciklički vibracijski podražaji od 30Hz znatno usporavaju, odnosno onemogućuju ortodontski pomak zuba, dok taj učinak nije toliko izražen kod frekvencija od 60Hz.

5.2 Analiza djelovanja ortodontskog tretmana na koštanu gustoću metodom mikro-kompjuterizirane tomografije

Nakon što su izmjerene intermolarne udaljenosti i nakon što je ustanovljeno da ciklički vibracijski podražaji smanjuju intenzitet pomaka i usporavaju ortodontski tretman, željelo se metodom mikrokompjuterizirane tomografije dalje kvantitativno karakterizirati morfološke promjene u alveolarnoj kosti, odnosno promjene u njezinoj gustoći. Alveolarna je kost analizirana u području prvoga lijevog maksilarnog kutnjaka, odnosno analizirano je područje alveolarne kosti najjače podvrgnuto silama kompresije za vrijeme ortodontskog tretmana, samim time i najjače podvrgnuto koštanoj resorpciji. Kao pokazatelji koštane gustoće, odabrani su sljedeći koštani parametri: trabekularni ili koštani obujam (udio alveolarne kosti u odnosu na ukupan obujam tkiva, BV/TV), gustoća tkiva (TD) i uočena gustoća (AD). Navedeni su parametri izmjereni u svim eksperimentalnim skupinama i međusobno uspoređeni. Analiza je pokazala značajno smanjenje koštane gustoće, odnosno smanjenje koštanoga obujma (BV/TV), gustoće tkiva (TD) i uočene gustoće (AD) u eksperimentalnoj skupini podvrgnutoj samo ortodontskom tretmanu bez dodatnih vibracijskih podražaja (TMO) u odnosu na kontrolnu ili VBO skupinu (Slika 11). To potvrđuje činjenicu da ortodontski tretman izaziva značajnu resorpciju alveolarne kosti i osteopeniju.

Međutim, Bonferroni post hoc test pokazao je da smanjenje tih parametara nije bilo statistički značajno i u skupinama životinja čiji su kutnjaci bili izloženi dodatnim vibracijskim podražajima uz ortodontski tretman (TM60 i TM30) kada su njihove vrijednosti bile uspoređene sa kontrolnom ili VBO skupinom.

Iz navedenih se podataka može zaključiti da vibracijski podražaji onemogućavaju koštanu resorpciju koja je vrlo opsežna i intenzivna tijekom ortodontskoga pomaka ili oporavljaju resorpciju novom formacijom alveolarne kosti aktivacijom stanica osteoblasta. Iz navedenih statističkih podataka može se uočiti kako je taj učinak puno izraženiji kod vibracijskih frekvencija od 30Hz.



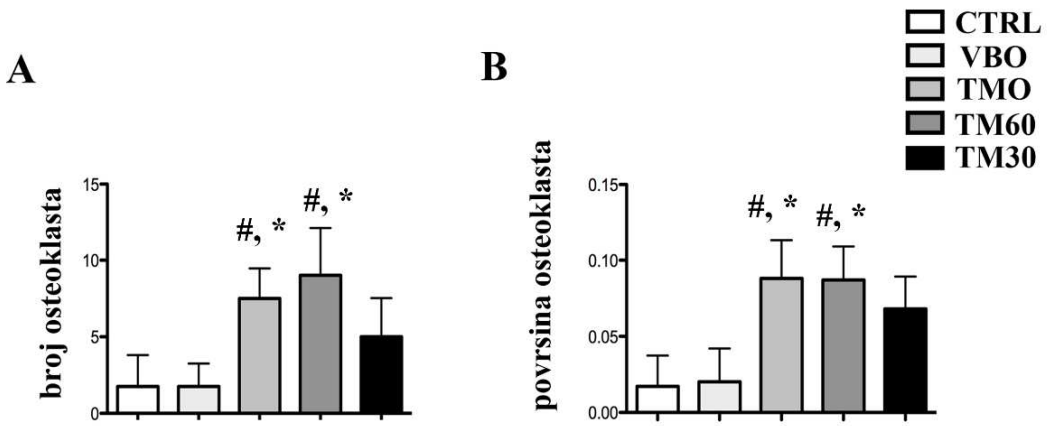
Slika 11. Grafički prikaz mikro-CT analize alveolarne kosti 14 dana nakon ortodontskog postupka. A. Koštani obujam - obujam alveolarne kosti podijeljen s ukupnim obujmom tkiva, BV/TV (jednosmjerna analiza varijance, 1way ANOVA, p=0,0098). B. Gustoća tkiva, TD (od eng. tissue density) –(jednosmjerna analiza varijance, 1way ANOVA, p<0,05). C. Uočena gustoća, AD (od eng. apparent density) – (jednosmjerna analiza varijance, 1way ANOVA, p<0,05).
*Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost uz standardnu devijaciju (n=4-9). # statistička značajnost prema kontrolnoj (CTRL) skupini, * -statistička značajnost prema VBO skupini.*

5.3 **Djelovanje cikličkih vibracijskih podražaja na aktivnost osteoklasta**

Aktivnost osteoklasta kvantitativno je određena histomorfometrijskom metodom brojanja diferenciranih osteoklasta na histološkim rezovima životinja iz svih eksperimentalnih skupina. Kako je TRAP enzim proizvod zrelih osteoklasta, tako su diferenciranim osteoklastima smatrane samo višejezgrene TRAP-obojane stanice u izravnom kontaktu s definiranom površinom resorbirane kosti. Uz broj aktivnih osteoklasta, kao parametar njihove aktivnosti, mjerena je i površina kosti koju su resorbirali aktivni, diferencirani osteoklasti - OcS (od eng. osteoclast surface).

Oba su parametra mjerena na strani resorpcije, odnosno na strani kompresije alveolarne kosti. Analiza je pokazala povećanje broja TRAP-pozitivnih osteoklasta na histološkim prerezima kutnjaka u skupini životinja izloženoj ortodontskom tretmanu, što je u skladu s pojačanom koštanom pregradnjom za vrijeme ortodontskog tretmana. Ona je neophodna da bi došlo do ortodontskoga micanja (Slika12.). Iako je uočena velika varijabilnost broja osteoklasta na pojedinim rezovima unutar skupina, test je pokazao značajnu razliku u broju osteoklasta između kontrolne skupine i TMO skupine i između kontrolne skupine i TM60 skupine, ali nije pokazao i značajnu razliku između kontrolne i TM30 skupine. To ukazuje da vibracijski podražaji pri frekvencijama od 30Hz smanjuju broj aktivnih osteoklasta za vrijeme ortodontskog postupka (Slika 13.A).

Analiza mjerenja površine kosti koja je resorbirana zrelim osteoklastima pokazala je slične rezultate. Bonferonni post hoc test ukazao je na značajnu razliku između kontrolne i TMO skupine i između kontrolne i TM60 skupine, ali nije pokazao i značajnu razliku između kontrolne i TM30 skupine. To ukazuje da je resorptivna aktivnost osteoklasta za vrijeme ortodontskoga tretmana znatno smanjena ukoliko dođe do primjene cikličkih vibracijskih frekvencija od 30Hz (Slika 13.B).



Slika 13. Histomorfometrijska analiza alveolarne kosti na strani kompresije 14 dana nakon ortodontskog postupka.

A. Kvantifikacija broja aktivnih osteoklasta. TMO i TM60 skupine pokazale su značajan porast broja aktivnih osteoklasta u zadanoj regiji interesa prema kontrolnoj (CTRL) i VBO skupini, dok je u TM30 skupini zabilježen njihov manji broj i nije bilo statistički značajne razlike prema istim skupinama, indicirajući da vibracijski podražji od 30Hz smanjuju broj aktivnih osteoklasta (jednosmjerna analiza varijance, 1way ANOVA, p=0,002). B. Kvantifikacija površine alveolarne kosti nastanjene osteoklastima. TMO i TM60 skupine pokazale su značajan porast u površini alveolarne kosti koja je nastanjena aktivnim osteoklastima u odnosu na kontrolnu (CTRL) i VBO skupinu, dok je u TM30 skupini zabilježen manji porast bez statistički značajne razlike (jednosmjerna analiza varijance, one-way ANOVA, p<0,0001).

*Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost uz standardnu devijaciju (n=4-9). # statistička značajnost prema kontrolnoj (CTRL) skupini, * -statistička značajnost prema VBO skupini.*

5.4 Djelovanje cikličkih vibracijskih podražaja na mineralizaciju u parodontnom ligamentu

Nakon što je ustanovljeno da vibracijski podražaji usporavaju ortodontski pomak kutnjaka i koštanu resorpciju, željelo se dalje ustanoviti potiču li vibracijski podražaji u parodontnom ligamentu diferencijaciju osteoblasta prema krajnje diferenciranim stanicama koje luče mineral. Bojanjem histoloških rezova na Von Kossu ispitivano je odvija li se proces mineralizacije u parodontnome ligamentu nakon primjene vibracijskih podražaja i onemogućava li tako pomak prvoga maksilarnog kutnjaka prema sjekutiću.

Von Kossa bojanjem dolazi do reakcije precipitacije u kojoj ioni željeza reagiraju s fosfatima u hidroksi-apatitu, a pod djelovanjem ultraljubičastog svjetla odvija se degradacija željeznoga fosfata u elementarno željezo, koje se lako detektira tamnosmeđom bojom na histološkim rezovima. Prisustvo željeza na rezovima ukazuje na prisustvo minerala u tkivu.

Bojanje je izvedeno na smrznutim rezovima kutnjaka koji ne zahtijevaju dekalciniranje tkiva potrebno za parafinsko uklapanje i koji omogućuju maksimalnu količinu minerala u tkivu. Analizirane su TMO i TM30 skupine.

Nakon histološkoga bojanja, detaljno su pregledani rezovi tkiva i osobita je pažnja posvećena istraživanju parodontnoga ligamenta. Izrazita količina minerala bila je prisutna u alveolarnoj kosti, dentinu i zubnoj caklini, ali niti u jednom rezu nije se moglo ustanoviti prisustvo minerala u parodontnome ligamentu životinja u skupini izloženoj vibracijskim podražajima (Slika 14.).

To ukazuje da vibracijski podražaji ne potiču diferencijaciju stanica u parodontnome ligamentu prema krajnje diferenciranim osteoblastima koji luče mineral i da mineralizacija parodontnog ligamenta nije razlog usporavanja, odnosno onemogućavanja ortodontskoga tretmana.

5.5 **Djelovanje vibracijskih frekvencija na staničnu proliferaciju**

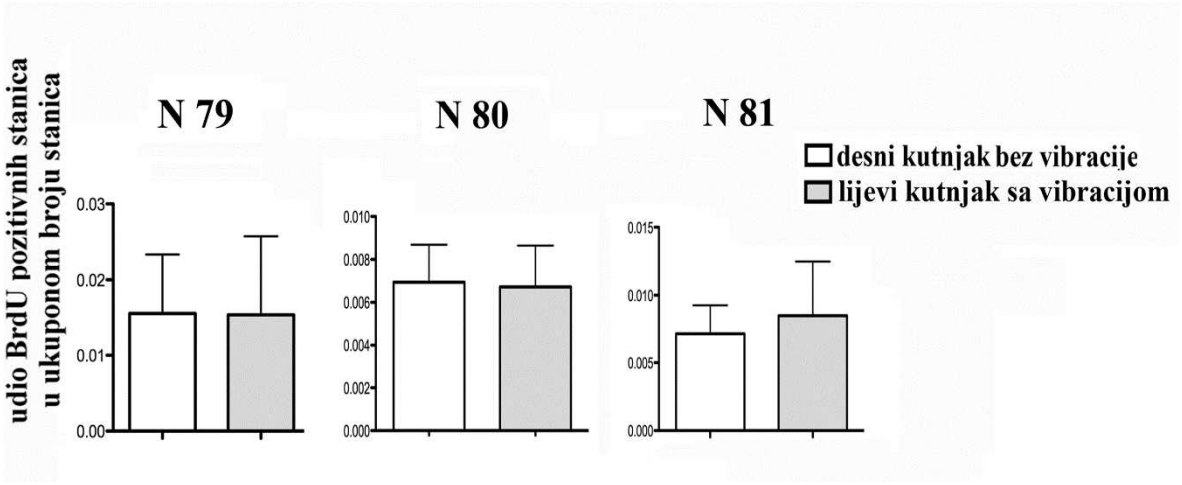
U eksperimentima je cilj bio i istražiti kako vibracijski podražaji djeluju na staničnu proliferaciju u parodontnom ligamentu. Kako su neka in vitro istraživanja (58-60) pokazala da primjena vibracijskih podražaja na staničnim kulturama može djelovati na proliferaciju stanica i diferencijaciju prema stanicama koje izražavaju osteoblastne biljege, u ovome se istraživanju željelo promatrati kakav učinak vibracijski podražaji imaju na staničnu proliferaciju parodontnoga ligamenta in vivo. Učinak vibracije na proliferaciju promatran je samo u VBO skupini jer ortodontski tretman inicijalno izaziva znatno povećanje stanične proliferacije u parodontnome ligamentu i na strani kompresije (resorpcije) i na strani tenzije (koštane formacije) (61). Nadalje, zbog različitih skupina životinja, neophodno bi bilo uspoređivati proliferaciju između različitih životinja, a kako svaka životinja može imati različit priljev bromodeoksi-uridina, proliferacija je promatrana u skupini životinja izloženoj samo vibracijskim podražajima i to uspoređivanjem proliferacije u parodontnome ligamentu lijevoga kutnjaka na kojemu su bili primijenjeni vibracijski podražaji, s proliferacijom u parodontnome ligamentu kontralateralnoga desnog kutnjaka na kojemu nije došlo do primjene vibracijskih frekvencija. Iz tih su razloga uključene samo VBO skupine.

Životinjama je injiciran bromodeoksi-uridin (BrdU) tri sata prije žrtvovanja. Bromodeoksi-uridin je sintetski nukleotid i ujedno je analog timidinu pa se ugrađuje u novosintetiziranu DNA kao zamjena timidinu za vrijeme S-faze staničnoga ciklusa, za vrijeme koje se DNA replicira. BrdU ugrađen u stanice koje aktivno repliciraju njihovu DNA, odnosno u fazi proliferacije, detektiran je imunohistokemijskim bojanjem, upotrebom specifičnog antitijela na BrdU na histološkim rezovima lijevih i desnih maksilarnih kutnjaka.

Kod eksperimentalnih životinja primijećena je razlika u broju proliferirajućih stanica u kontralateralnoj, nevibriranoj strani, ali studentov t-test nije pokazao značajnu razliku u broju proliferirajućih stanica u parodontnom ligamentu između lijevoga i desnog maksilarnog kutnjaka niti u jednoj ispitivanoj životinji (Slika 15.).

Dobiveni rezultati ukazuju da vibracijske frekvencije ne utječu na staničnu proliferaciju u parodontnome ligamentu i najvjerojatnije ne potiču diferencijaciju osteoblastnih preteča u zrele osteoblaste, koji bi eventualno mogli utjecati na povećano formiranje novonastale kosti i tako onemogućiti ili usporiti ortodontski pomak kutnjaka.

Isto tako, može se zaključiti da vibracijski podražaji ne povećavaju proliferaciju parodontnoga ligamenta i možda je to razlog zašto ne dolazi do ubrzanja ortodontskog pomaka.



Slika 15. Grafički prikaz djelovanja vibracijskih podražaja na staničnu proliferaciju u parodontnom ligamentu u tri različita štakora.

Niti u jednoga od ispitivanih štakora (N79, N80, N81) vibracijski podražaji od 30Hz nisu prouzročili značajno povećanje ili smanjenje proliferacije stanica parodontnoga ligamenta. Broj proliferirajućih (BrdU obilježenih) stanica analiziran je u višestrukim zonama parodontnog ligamenta i njihov je zbroj bio podijeljen s ukupnim brojem stanica za svaki rez. Analiza je napravljena na prvom lijevom kutnjaku, koji je bio podvrgnut vibracijskim podražajima, i kontralateralnom desnom, koji je služio kao kontrola. Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost tri različita reza uz standardnu devijaciju. T-test nije pokazao statistički značanju razliku između broja proliferirajućih stanica u parodontnom ligamentu vibriranog i nevibriranog maksilarnog kutnjaka niti u jednoj od ispitivanih životinja (N79 p=0,9817, N80 p=0,8941, N81 p=0,6376).

5.6 **Djelovanje vibracijskih frekvencija na oštećenja u parodontnom ligamentu**

U istraživanjima su korištene dvije različite frekvencije samo kod jedne, određene snage njihove amplitude od 0,4N. Jedan od razloga za odabir 0,4 N bio je taj što je vibracijska elektroda primjenjivana za aplikaciju vibracijskih podražaja ograničena rasponom aplikacije 0,1N - 10N, pa nije postojala mogućnost testiranja snage manje od 0,1N. Kako je u nizu preliminirarnih pokusa ustanovljeno da je 1N ekstremno visoka snaga za primjenu jer dolazi do velikog trzanja glave, a elektroda nije dozvoljavala primjenu nižu od 0,1N, odabrana je snaga od 0,4N. Dodatni je razlog što se smatralo da snaga koja se primjenjuje na kutnjake mora biti većih magnituda negoli snaga koja se primjenjuje za vibraciju dugih kostiju zbog činjenice da parodontni ligament zbog svojih elastičnih osobina služi kao ublaživač i u ovome slučaju ne omogućava jednak prijenos na alveolarnu kost, kao što se to odvija na dugim kostima. Stoga je odabrana relativno visoka amplituda snage od 0,4N.

Kako je prethodno ustanovljeno da kod frekvencija od 30Hz dolazi do znatnog usporavanja ortodontskoga tretmana, daljnje je istraživanje usmjereno na djelovanje vibracijskih podražaja na staničnu smrt i integritet kolagenih vlakana u parodontnom ligamentu.

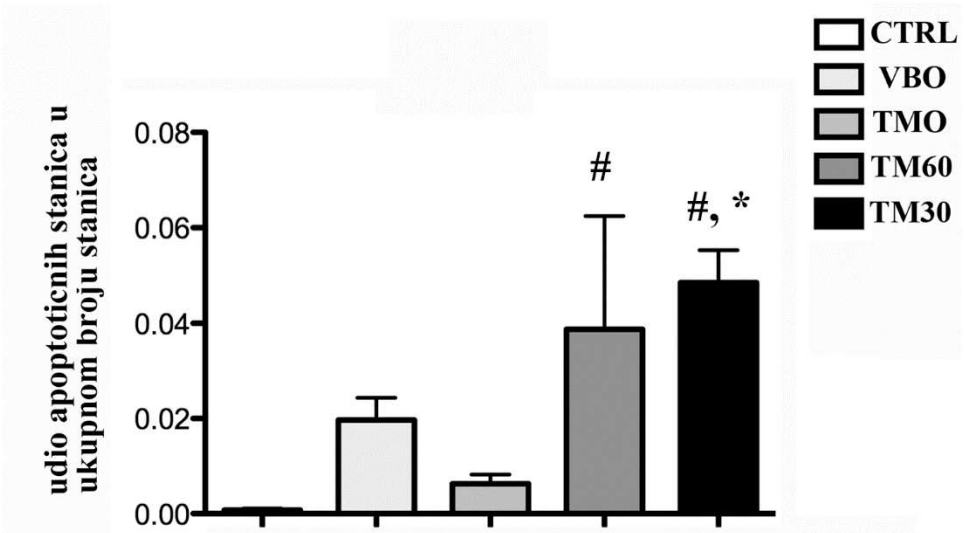
5.6.1 **Djelovanje vibracijskih frekvencija na apoptozu stanica u parodontnom ligamentu**

Kako bi se odredio stupanj staničnih oštećenja u parodontnom ligamentu, provedena je metoda TUNEL na histološkim rezovima kutnjaka iz svih eksperimentalnim skupina.

Za vrijeme apoptoze ili programirane smrti stanica dolazi do fragmentacije DNA u kojoj se kidaju fosfo-diesterske veze između nukleotida. Enzim terminalna deoksi-nukleotidil transferaza koja se nalazi u kitu za bojanje, prepoznaje mjesta prekida i ujedno katalizira dodavanje dUTP-a, vezanog za fluorescentnu boju, na prekinute krajeve. Nedavno je dokazano kako TUNEL metoda nije specifična samo za detekciju procesa apoptoze, već i nekrotične stanice i stanice s ozbiljnim DNA oštećenjima mogu također biti obilježene ovom metodom. Pri ovome je istraživanju procijenjeno da je TUNEL metoda visoko pouzdana za određivanje staničnih oštećenja.

Nakon analize histoloških rezova, bilo je moguće uočiti izrazit fluorescentni signal u nekim skupinama. Naime, u kontrolnoj su skupini životinja apoptotične stanice bile jako rijetke i raspršene unutar parodontnog ligamenta.

fluorescentnom bojom) u parodontnom ligamentu (PDL-u). Međutim, u VBO, TM60 i TM30 skupini, broj apoptotičnih stanica bio je povećan. Izrazito povećanje broja apoptotičnih stanica, prisutnih u malim grupama (prikazane bijelim strelicama), primijećeno je u TM30 skupini (E). Ovaj nalaz ukazuje na vrlo štetan utjecaj vibracijskih frekvencija 30 Hz na stanice PDL-a.



*Slika 17. Grafički prikaz kvantifikacije apoptotičnih stanica unutar parodontnog ligamenta. Statistički značajno povećanje broja apoptotičnih stanica zabilježeno je u TM60 i TM30 skupini. Obje skupine su pokazale značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu (CTRL) (jednosmjerna analiza varijance, 1 way ANOVA, p=0,0016). TM30 skupina je pokazala statističku značajnost i prema TMO skupini. # -statistička značajnost prema kontrolnoj skupini (CTRL), *- statistička značajnost prema TMO skupini.*

Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost tri različita histološka reza uz standardnu devijaciju.

5.6.2 **Djelovanje vibracijskih podražaja na integritet kolagenskih vlakana u parodontnom ligamentu**

Kako bi se odredilo kakva je struktura kolagenskih vlakana u parodontnom ligamentu, korištene su dvije različite metode detekcije: bojanje histoloških rezova na Picrosirius Red i analiza neobojanih histoloških rezova multifoton mikroskopom.

Analiza kolagenih vlakana parodontnog ligamenta na histološkim rezovima pod svjetlosnim mikroskopom pokazala je normalnu strukturu vlakana bez ikakvih značajnih oštećenja u kontrolnoj i VBO skupini. Detaljno su analizirana mjesta tenzije parodontnog ligamenta, odnosno distalni dio distobukalnog korijena prvog lijevog maksilarnog kutnjaka, jer tu su očekivane najveće promjene. Nije bilo moguće opaziti veće promjene u strukturi i smjeru pružanja vlakana u navedene dvije skupine, osim što su u VBO skupini vlakna pokazala malo deblju morfologiju (Slika 18.).

Analiza kolagenskih vlakana pod polariziranim svjetlom u te dvije skupine pokazala je slična obilježja (Slika 19.).

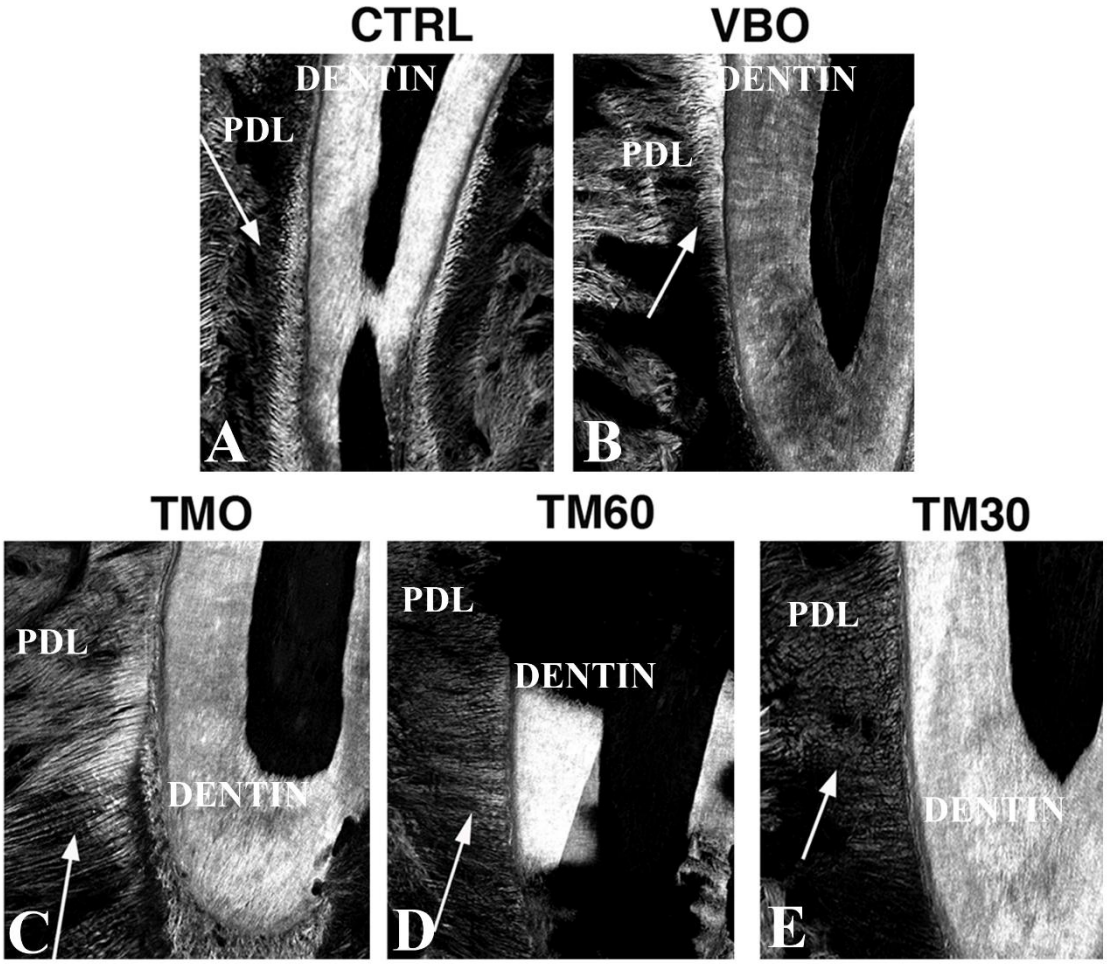
Kolagena vlakna u parodontnom ligamentu u skupinama životinja koje su bila izložene ortodontskom tretmanu pokazala su lagano povećanje u duljinu. U TMO skupini mjestimično je bilo moguće primijetiti i njihova značajna zadebljanja, najvjerojatnije kao odraz njihove adaptacije na mehaničke sile istezanja prisutne za vrijeme ortodontskog tretmana. Te je karakteristike osobito bilo moguće primijetiti pod polariziranim svjetlom pod kojime su žuta vlakna pokazala izrazita zadebljanja, osobito na područjima spoja vlakana s dentinom ili alveolarnom kosti, odnosno zadebljanja tzv. Sharpeyjevih vlakana.

U TMO skupini nije bilo moguće ustanoviti nikakav prekid u kontinuitetu vlakana.

Međutim, u TM60 opaženi su lagani prekidi u kolagenskim vlaknima, osobito zamjetljivi pod polariziranim svjetlom koje se manifestiralo valovitim prekidom žutih vlakana.

U TM30 skupini pak, prekidi kolagenih vlakana bili su jako izraženi tako da na pojedinim rezovima gotovo da nije bilo prisutno žutih (debelih kolagenih) vlakana. Analiza pod svjetlosnim mikroskopom u TM30 skupini također je pokazala izrazito smanjenje debljine crveno obojenih vlakana, kao i prekide u njihovu kontinuitetu.

Analiza multifotom mikroskopom pokazala je slične rezultate (Slika 20.). Kako je analiza multifotom mikroskopom jače osjetljiva u detekciji strukture kolagenih vlakana, u VBO skupini



Slika 20. Analiza kolagenih vlakana multifon mikroskopom.

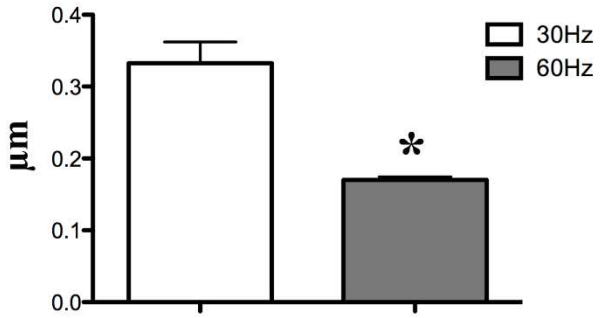
U VBO skupini (B) mogu se zamijetiti mjestimična zadebljanja kolagenih vlakana unutar parodontnoga ligamenta u odnosu na CTRL skupinu, poglavito u području hvatanja za cement i dentin.

U TMO skupini (C) vlakna su izrazito zadebljana gotovo cijelom dužinom. U TM60 i TM30 (D,E) skupini, vlakna su jako oštećena i stanjena i može se primijetiti prekid u njihovu kontinuitetu.

5.7 Razlike u pomaku (putovanju) vibracijske elektrode kod primjene frekvencija od 60Hz i 30Hz

Nakon što je ustanovljeno da 30Hz vibracijske frekvencije izaziva puno veća oštećenja u parodontnom ligamentu negoli frekvencija od 60Hz i da značajno više usporava ortodontski tretman, željelo se dalje ustanoviti postoje li razlike u tzv. displacementu vibracijske elektrode, odnosno pomaku koje vibracijska elektroda producira putujući na kutnjak da bi izazvala jednaku stalnu produkciju energije od 0,4N. To putovanje elektrode bilo je automatski registrirano elektromehaničkim aktivatorom i za svaku primjenu vibracijskih podražaja dobivena je prosječna vrijednost putovanja elektrode koje se odvijalo za ukupnoga vremena trajanja primjene svakoga vibracijskog podražaja (10 minuta).

Budući da je analizirano šest različitih životinja kod obje frekvencije, dobiveno je ukupno šest vrijednosti za svaku primjenu vibracijskih podražaja kod obje frekvencije jer je ukupno analizirano šest različitih životinja kod vibracijskih frekvencija 60Hz i šest životinja kod frekvencija od 30Hz. Za svaku životinju izračunata je srednja vrijednost i upotrijebljen je nesparen t-test za statističku obradu. T-test je pokazao značajnu razliku između obje primijenjene frekvencije ($p<0.0001$), ukazujući da 60Hz vibracijske frekvencije izazivaju puno manje pomake elektrode (srednja vrijednost = 0,1701μm) od 30Hz (srednja vrijednost = 0,3323μm), odnosno veće je putovanje potrebno kod frekvencije od 30Hz da elektroda primijeni istu silu pritiska od 0,4N na okluzijsku površinu prvog kutnjaka. Naknadno je zaključeno da su najvjerojatnije zbog ovoga nalaza oštećenja veća kod frekvencije od 30Hz u parodontnom ligamentu.



Slika 21. Grafički prikaz putovanja elektrode kod primjene vibracijskih podražaja od 30 Hz i 60Hz. Statistički značajno manje putovanje elektrode (od eng. displacement) zabilježeno je kod frekvencija od 60Hz (nesparen t-test, n=6, p<0,0001).

Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost za određenu frekvenciju uz standardnu devijaciju.

6. RASPRAVA

Naši su pokusi pokazali da vibracijski podražaji usporavaju ortodontski pomak.

Vibracijski podražaji prethodno su pokazali svoju veliku korisnost u povećanju koštane gustoće, ubrzanju cijeljenja i sl. Znajući da mogu stimulativno djelovati na poticanje osteogeneze, smatrali smo da će na taj način dovesti do ubrzanja odlaganja nove kosti na strani tenzije i ubrzanja koštane pregradnje tijekom ortodontskog pomaka. Međutim, u našoj studiji nisu pokazali sposobnost ubrzanja ortodontskog pomaka, nego njegova kočenja i usporavanja.

Pravi razlog zašto je došlo do usporavanja pomaka uporabom vibracijskih podražaja nije u potpunosti jasan, ali jedan od najvjerojatnijih razloga je značajan pad broja aktivnih osteoklasta, pa time i koštane resorpcije, neophodne da bi došlo do ortodontskog pomaka, koja ujedno ima i jaku ulogu u brzini pomaka. Smanjenjem broja aktivnih osteoklasta i resorpcije dolazi do smanjenja ortodontskog pomaka.

Ortodontski relaps nakon uspješnoga tretmana predstavlja velik klinički problem u suvremenoj ortodonciji. Događa se zbog ponovne resorpcije kosti na suprotnoj strani, bivšoj strani tenzije i tako omogućava pomak zuba u početnu, originalnu poziciju. Uzevši u obzir rezultate naše studije, vibracijski podražaji bi mogli imati veliku ulogu u kliničkoj praksi te bi se mogli koristiti za spriječavanje ortodontskog relapsa.

Model koji korišten u našoj studiji bolji je od modela kojima su se istraživači prethodno koristili jer smo koristili kombinaciju Renovog i Yoshimatsuovog (56, 57) modela, tzv. mizijalni pomak kutnjaka kod kojega se ne može dogoditi lažno pozitivan nalaz i veća vrijednosti pomaka, kao što je to bio slučaj u studiji u kojoj je zbog širenja nepčane suture ekspanzijskom žičicom došlo i do većih vrijednosti pomaka koje su zamaskirale pravi učinak vibracijskih sila (55). Za razliku od prethodnih studija, koristili smo vibracijske podražaje točno zadanih frekvencija i poznatih snaga koji su pokazale učinak na količinu pomaka ovisan o dozi, a za analizu tkiva koristili smo jako senzitivne metode i po prvi put gledali učinak na strukturu i vitalnost stanica parodontnog ligamenta kod obje zadane frekvencije.

Jedna je od vrlo negativnih nuspojava ortodontskog postupka je i resorpcija zubnoga korijena koja vjerojatno nastaje zbog pretjerane i neregulirane aktivnosti osteoklasta ili cementoklasta. Kako su vibracijski podražaji u našoj studiji pokazali kočenje aktivnosti osteoklasta, uporabom vibracijskih naprava u ortodonciji može se suzbiti ta nuspojava ortodontskog postupka.

6.1 **Vibracijski podražaji smanjunju broj aktivnih osteoklasta**

Prema našim dosadašnjim saznanjima i iskustvima pokusa koji su trenutno u tijeku, moguće je da se radi o nekoliko uzroka inhibicije osteoklastogeneze:

Regulacija osteoklastogeneze putem osteocita

U prvih nekoliko sati nakon postavljanja opruga, na strani kompresije, u području alveolarne kosti koja prilježe neposredno uz mjesto gdje je parodontni ligament maksimalno pritisnut, jedna od prvih promjena koja se može uočiti je značajna apoptoza osteocita.

Osteocitna apoptoza doseže maksimum između 24 i 48 sati nakon uspostavljanja ortodontske sile na zub, a osteoklastična aktivacija počinje malo kasnije, tek nakon 72 sata (62). Moglo bi se dakle zaključiti kako je za osteoklastogenezu neophodno da prethodno dođe do smrti osteocita (63).

Nedavno je objavljeno da osteociti imaju jako veliku ulogu u regulaciji tvorbe kosti, ali isto tako i u koštanoj resorpciji, pa tako djeluju kao dirigenti cjelokupnog procesa koštane pregradnje. Poznato je također da osteociti izražavaju niz molekula koje utječu na tvorbu kosti. Jedna u njihovu nizu je Dkk1, izražena i u osteoblastima, a druga je Sost, izražena specifično i jedino na ostecitima. Proizvod Sost gena, sklerostin, jako antagonizira nekoliko članova obitelji proteina, tzv. koštanog morfogenetskog proteina (BMP). U konačnici se i sklerostin i Dkk1 vežu na LRP receptore i tako sprečavaju aktivaciju Wnt signaliziranja. BMP i Wnt ključni su u procesu sazrijevanja osteoblasta jer potiču migraciju multipotentnih mezenhimskih preteča prema osteoblastnoj lozi. Tako osteociti, putem Wnt-a i BMP antagonista, imaju mogućnost regulacije tvorbe kosti i aktivnosti osteoblasta (63).

Osteociti su donedavno bili smatrani 'umirovljenim' stanicama osteoblastne loze, uklopljenima u koštani matriks i potrebnima jedino za održavanje matriksa. Međutim, poznato je da osteociti imaju vrlo razgranat sustav međusobne komunikacije. Naime, svaki osteocit leži u svojoj lakuni, nemineraliziranom prostoru koji se proteže oko staničnoga tijela i koji je neophodno potreban za priljev i opskrbu osteocita hranidbenim tvarima. Iz staničnoga tijela proteže se oko pedeset staničnih nastavaka, isto tako postavljenih u pojedinačne kanaliće položene u mineralizirani koštani matriks (64).

Morfologija osteocita određena je izražajem gena važnih u procesu tvorbe neurona i dendrita, kao što su E11/gp38, CD44 i fimbrin, koji osteocitima daju karakterističnu morfologiju. Stanični

nastavci susjednih osteocita komuniciraju jedni s drugima putem kanalića i tako održavaju međustanični kontakt preko staničnih spojeva (od eng. gap junctions).

Nije jasno kako proteini izlučeni iz osteocita dosežu druge stanice. Proteini manjih veličina, do 70 kDa ili promjera do 7nm, vjerojatno putuju tekućinom kanalikularnoga sustava. Za transport membranskih proteina najvjerojatnije mora postojati neposredan kontakt staničnih dendritičnih nastavaka i plazma membrane ciljne stanice.

Što točno uzrokuje početak resorpcije kosti, još uvijek nije jasno. Apoptoza osteocita najvjerojatnije ima jako veliku ulogu u poticanju susjednih stanica, osteocita i drugih stanica osteoblastne loze, da promijene izražaj pro- i anti-osteoklastogenetskih gena. Tako može doći do neposrednog poticanja osteoklastogeneze induciranjem stromalnih i osteoblastnih stanica na lučenje RANKL-a. Ili, još bitnije, osteociti mogu i sami lučiti RANKL. Nedavne su studije potvrdile ovu pretpostavku (24, 25). Jedna je od navedenih studija pokazala da miševi kojima nedostaje RANKL u osteocitima pokazuju osteopetrotična obilježja.

Za početak razvoja osteoklasta, topljivi RANKL najvjerojatnije nema veliku ulogu (65), koliko je značajan neposredan kontakt između membranskog RANKL-a izraženoga na osteocitnim dendritima i RANK-a na pretečama osteoklasta (66).

Jedan je od mogućih čimbenika osteoklastni kemotaktični čimbenik grupe visoke pokretljivosti, box 1 protein – HMGB1 (od eng. *osteoclast chemotactic factor high mobility group box 1 protein*), kojega luče umirući osteociti i koji povećava izražaj RANKL-a, TNF-a, IL6, a smanjuje izražaj OPG-a.

Nadalje, apoptotična tijela izlučena od apoptotičnih osteocita mogu potaknuti lokaliziranu koštanu resorpciju (26). Isto tako, okolni osteociti, smješteni neposredno uz umiruće osteocite, mogu lučiti povećane količine VEGF-a, što ukazuje da signali koji dolaze iz apoptotičnih osteocita mogu promijeniti izražaj molekula na susjednim osteocitima, važni su za angiogenezu, vaskularizaciju i potencijalni priljev preteča osteoklasta (67).

Postoji još jedan mehanizam kojim osteociti neposredno mogu razgrađivati kost. Naime, osteociti izolirani iz životinja koje su se netom okotile izražavaju povećane količine enzima kojeg inače izražavaju zreli osteoklasti u procesu aktivne resorpcije kosti, kao što su enzim TRAP i katepsin K. Ta saznanja ukazuju da osteociti mogu resorbirati mineralizirani matriks preko molekularnih mehanizama sličnih ili identičnih onima u osteoklastima (68).

Osteociti luče i OPG koji je reguliran preko Wnt/β-katenin puta pa miševi kojima nedostaje β-katenin u osteocitima pokazuju osteoporotična obilježja zbog povećanog broja osteoklasta i izražene koštane resorpcije (69).

Tijekom razvoja zubi, dentalni folikul luči makrofagni čimbenik stimulacije kolonija (m-CSF) koji ima značajnu ulogu u procesu nicanja zubi kada je neophodna opsežna resorpcija alveolarne kosti pogotovo u početnim fazama izbijanja zuba (4). Nedavno je otkrivena određena količina m-CSF-a u osteocitima, što isto ukazuje na njihov veliki potencijal u procesima resorpcije (70).

Prema svemu navedenom, dosadašnja saznanja ukazuju da su osteociti jako moćni regulatori koštane resorpcije i da posredno ili neposredno reguliraju diferencijaciju i djelovanje osteoklasta, kako u fiziološkim, tako i u patofiziološkim uvjetima.

Mehanička stimulacija, koja je kritična za održavanje koštane mase, sprječava ili usporava proces apoptoze (71, 72)**.**

Aktivacija Wnt signaliziranja rani je odgovor osteocita na mehaničku stimulaciju (73) i potiče opstanak osteocita aktivirajući ERKs (74).

Apoptotični osteociti nađeni su u neaktivnoj, neopterećenoj kosti, kod fizičke neaktivnosti, duge imobilizacije, kod astronauta, ljudi starije dobi i motorne paralize u kojima je, istodobno ili neposredno nakon određenog vremena, zapažena velika aktivacija osteoklasta, razgradnja i osteoporoza. Brzi pad osteocitne vitalnosti koji se javlja kod neaktivnih kostiju ukazuje da su osteociti prvi koji reagiraju na promjene mehaničkih sila opterećenja (65).

Jedno od mogućih objašnjenja zašto dolazi do usporavanja ortodontskoga pomaka u našim eksperimentima najvjerojatnije je vezano uz antiresorptivni učinak kojeg imaju vibracijski podražaji malih magnituda.

Naime, dokazano je da vibracijski podražaji potiču anabolički učinak u gotovo svim kostima (75-77), te da vibracijski podražaji oporavljaju kost kod ovarijektomijom potaknute osteoporoze u miša (78) i smanjuju aktivnost osteoklasta u adolescentnom mišu (79).

Isto tako, kod žena u postmenopauzi tretiranih vibracijskim podražajima u trajanju od šest mjeseci, gustoća kostiju kuka i kralješnice bila je veća u usporedbi s placebo grupom (80, 81). Djeca s cerebralnom paralizom i nepokretnošću koja prati ovu bolest, također imaju veću koštanu gustoću u

trabekularnoj kosti tibije i spinalnim regijama nakon šestomjesečne upotrebe vibracijskih podražaja (82).

Iako anabolički i antiresorptivni potencijal vibracijskih podražaja velike frekvencije niske amplitude postaje sve značajniji i evidentniji, točan mehanizam stanične i molekularne regulacije trenutno je nepoznat.

Prostaglandin E2 (PGE2), čija je sinteza regulirana enzimom ciklooksigenazom-2 (Cox-2), važna je signalna molekula koju osteociti otpuštaju kao odgovor na mehaničku stimulaciju (83). PGE2 može djelovati i na osteoblaste i osteoklaste i imati stimulativni i inhibicijski učinak. PGE2 stimulira diferencijaciju osteoklasta u kulturama koštane srži i slezene, a taj učinak ovisi o dozi (84-86). Sat nakon izlaganja vibracijskim podražajima, nađena je povećana količina Cox-2 prijenosničke ribonukleinske kiseline (mRNA) u MLO-Y4 stanicama, ali i značajan pad u količini PGE2, što je u skladu s rezultatima istraživanja koji su pokazali da vibracijske sile smanjuju PGE2 u osteoblastima, dok je Cox-2 povišen, ovisno o primijenjenim frekvencijama (87).

Cherian i suradnici nedavno su pokazali da je povećanje PGE2 koje se javlja nakon promjene tekućinskog protoka posredovano otvaranjem polukanala koneksina 43 (Cx43) (88). Buduće bi studije trebale detaljnije razjasniti mehanizme snižavanja PGE2 izazvane vibracijom. Kako PGE2 stimulira formaciju osteoklasta i njihovu aktivaciju, biološki značaj sniženog otpuštanja PGE2 tijekom vibracije vezan je uz antiresorptivni učinak, što rezultira smanjenim brojem osteoklasta.

Mehanička stimulacija može utjecati na osteoklastogenezu putem kontakta sa stromalnim i osteoblastičnim stanicama, i to promjenama u RANKL/OPG omjeru. Pritisak na stromalne stanice i mikrogravitacije na osteoblaste povećava njihovu mogućnost da potaknu formaciju osteoklasta (89).

S druge strane pak, promjena tekućinskog protoka osteocita koja se javlja tijekom mehaničkih stimulusa snižava RANKL/OPG omjer u stromalnim stanicama koštane srži i u samim osteocitima, a povećcan OPG onemogućava osteoklastogenični potencijal (90). Isto tako, uz promjene OPG-a dolazi i do promjena drugih topivih čimbenika kao što su VEGF i TGFβ koji također mogu spriječiti ili smanjiti osteoklastogenezu. Osteoklastogenezu onemogućava i smanjen RANKL u osteocitnim stanicama (91).

Nedavne su studije pokazale da mehaničkom stimulacijom može doći do aktivacije osteoklasta direktnim kontaktom osteocita i preteča osteoklasta, ili bez njega. Naime, topivi čimbenici koje

osteociti luče kao odgovor na promjenu tekućinskog protoka u stanju su smanjiti tvorbu osteoklasta i njihovu aktivnost in vitro. Pokusi su pokazali da osteociti mogu lučiti tvari ili čimbenike sa sposobnošću difuzije koji su u stanju regulirati osteoklastogenezu na određenoj udaljenosti u odnosu na same osteocite. Ti su pokusi pokazali da mehanički stimulirani osteociti utječu i na potporne stanice (stromalne, osteoblaste, osteocite) i izazivaju tzv. osobinu indukcije osteoklasta putem topivih čimbenika što rezultira promjenama lokalnoga kemijskog okruženja potpornih stanica (91, 92). Otpuštanje tih topivih čimbenika barem je dijelom ovisno o aktivaciji puta dušičnog oksida (NO) u osteocitima mehaničkom stimulacijom (91).

U našim pokusima, smanjena osteoklastogeneza, popraćena sniženim brojem aktivnih osteoklasta, mogla bi biti vezana uz sve ove čimbenike, topive ili difuzijske.

Ali isto tako, možda tijekom primjene vibracijskih podražaja dolazi do inhibicije osteocitne apoptoze koja je moćan i važan okidač procesa aktivacije osteoklasta. Mehaničke sile vibracije primijenjivane tijekom naših pokusa možda su usporile ili onemogućile, različitim medijatorima, proces apoptoze osteocita koja se javlja na dijelu alveolarne kosti neposredno uz stranu kompresije parodontnoga ligamenta. To bi značilo da smanjena apoptoza i količina apoptotičnih tijela koji su nosioci RANKL-a onda izravno utječu na inhibiciju formacije osteoklasta.

Zašto dolazi do apoptoze osteocita na strani kompresije parodontnog ligamenta tijekom ortodontskog tretmana nije dovoljno jasno, ali postoje neke naznake po kojima promjena u sintezi dušičnog oksida (NO) u osteocitima kao rezultat promjene protoka tekućina lakunarnog i kanalikularnoga sustava može imati važnu ulogu kao okidač procesa apoptoze. Naime, na strani kompresije, tijekom postavljanja ortodontskih opruga, dolazi do smanjenja fiziološkog naprezanja što može dovesti do lokalne staze ekstracelularne tekućine u kanalikularnom sustavu osteocita i smanjene razine NO-a. Staza tekućine u kombinaciji s produkcijom NO-a i TNF-a izaziva apoptozu osteocita na strani kompresije (93-95). Naime, dokazano je da su međustanična spojišta u MLO-Y4 osteocitima pojačana (96) i da je izražaj nekih molekula, kao što su Sost i RANKL, znatno promijenjen ili pak snižen primjenom vibracije niskih frekvencija. Isto tako, i resorpcija može biti smanjena primjenom stanične medije skupljene od kulture osteocita izložene vibraciji (97).

RANKL se nalazi prvenstveno u membranskoj formi, vezan na membranu, ali može biti izlučen preko tzv. ectodomain shedding-a. Rezultati na staničnim kulturama pokazali su da trideset minuta nakon vibracijskog podražaja dolazi do značajnog snižavanja RANKL-a u staničnoj mediji skupljenoj od vibriranih stanica. Zbog relativno kratkog vremena nakon kojega je ova promjena

zapažena, može se pretpostaviti kako je vibracija izazvala smanjenje otpuštanja RANKL-a s membrane, a ne inhibiciju sinteze novog RANKL proteina.

Moguće je kako razine RANKL-a, kojega luče apoptotična tijela osteocita, bivaju snižene upravo zato što vibracijski podražaji sprječavaju apoptozu osteocita, a samim time i količinu i difuziju membranskog RANKL-a u apoptotičnim tijelima pa je konačan rezultat inhibicija resorpcije kosti. Naime, neke su studije pokazale da vibracijski stimulusi i mehaničko opterećenje mogu značajno sniziti broj apoptotičnih kondrocita zglobne hrskavice femura u životinja koje su prethodno bile tretirane prednizolonom, a prednizolon izaziva apoptozu kondrocita i osteoblasta. a time i osteoporozu. Taj je učinak bio dokazan smanjenjem stanica pozitivnih na kaspazu-3. Kod kontrolnih životinja, broj apoptotičnih kondrocita bio je vrlo nizak. Upotrebom prednizolona, gotovi svi kondrociti bili su pozitivni na kaspazu-3, jedan od glavnih biljega stanične apoptoze. Kad su životinje bile pod mehaničkim opterećenjem ili izložene silama vibracije, udio apoptotičnih kondrocita znatno je opao (98). Isto tako, pokusi na kokošjim kalvarijskim kulturama izoliranih osteocita, mehanički stimuliranih tzv. pulsirajućim promjenama tekućinskog protoka u protočnim komoricama u trajanju od jednog sata (5Hz, 0.7 Pa), pokazale su smanjenje udjela apoptotičnih osteocita i smanjenje aktivnosti kaspaze-3 i kaspaze-7 za 25% (99). Apoptoza osteocita u tim kulturama bila je prethodno potaknuta različitim koncentracijama tumor-nekrotizirajućeg čimbenika (TNFα). Točan mehanizam kojim mehanička stimulacija u TNF tretiranim kulturama osteocita može smanjiti osteocitnu apoptozu nepoznat je, ali najvjerojatnije je dušični oksid (NO) jako važan u cijelome procesu. Osteociti, naime, vrlo brzo, u roku nekoliko minuta, proizvode male količine dušičnog oksida (93) koji inhibira apoptozu inhibicijom kaspaze-3 (100, 101).

Čini se kako mehanički ili vibracijski podražaji mogu spriječiti ili oporaviti apoptozu nekih stanica, pogotovo ako je apoptoza prethodno bila potaknuta određenim čimbenicima. Dokazano je da mehaničko opterećenje ili vibracija visokih frekvencija sprječavaju ili oporavljaju apoptozu osteocita (102). Tako je vrlo moguće da vibracijski podražaji sprječavaju apoptozu osteocita koja se javlja u tijeku ortodontskog postupka i koja prethodi aktivaciji osteoklasta.

Moguće je da vibracijom dolazi i do promjena izvanstaničnoga matriksa i promjena provodljivosti kanalikularnog i lakunarnog sustava u kojima onda dolazi do promjena u difuziji topivih molekula proizvedenih u osteocitima važnih za okidanje procesa aktivacije osteoklasta.

Osteociti su, dakle, stanice koje imaju veliku ulogu u regulaciji koštane mase zbog orkestriranja ravnotežom između tvorbe kosti i njezine razgradnje, kao odgovora na mehaničke podražaje.

Djelovanje vibracijskih podražaja neposredno na osteoklaste i preteče osteoklasta

Moguće je kako je jedan od razloga zbog kojega dolazi do kočenja osteoklastogeneze i usporavanja ortodontskoga tretmana u našim pokusima, neposredan učinak vibracije na osteoklastogenezu i diferencijaciju osteoklasta od njihovih preteča bez indirektnog utjecaja na osteocite. Naime, Kulkarni i suradnici pokazali su da mehanička vibracija direktno inhibira tvorbu osteoklasta od monocitnih prekursora in vitro, odnosno mišje stanične linije RAW264.7 (103). Kultiviranje stanica RAW264.7 i njihovo tretiranje RANKL-om u trajanju od pet dana rezultiralo je formiranjem TRAP-pozitivnih multinuklearnih stanica. Kada su te stanice stimulirane vibracijskim podražajima u trajanju od jednog sata i frekvencijama od 4Hz, dolazi do značajnog inhibiranja tvorbe osteoklasta koje je evidentirano smanjenjem broja multinuklearnih, zrelih osteoklasta u kulturi. Isti su autori uočili da vibracijski podražaji značajno snižavaju izražaj DC-STAMP gena u RAW264.7 vibriranim stanicama i da je i količina DC-STAMP proteina u vibriranim kulturama bila značajno smanjena. Proces formiranja osteoklasta uključuje nekoliko faza, kao što su preživljavanje preteča osteoklasta, sazrijevanje mononuklearnih pre-osteoklasta, fuzija multinuklearnih zrelih osteoklasta i aktivacija osteoklasta koji resorbiraju kost. Otkriveno je nekoliko proteina koji utječu na staničnu fuziju zrelih osteoklasta, a jedan od njih, dendritični stanično-specifični transmembranski protein - DC-STAMP izravno je povezan s fuzijom osteoklasta in vivo.

Wu i suradnici dobili su slične rezultate (104). Nakon primjene cikličkih vibracijskih podražaja malih amplituda i velikih frekvencija, stanične linije RAW264.7, nakon dodavanja RANKL-a, imale su smanjen broj zrelih osteoklasta. Isto tako, autori su otkrili smanjen broj aktinskih prstenova, struktura koje su važne za staničnu adheziju osteoklasta i njihovu funkciju. Otkrili su i smanjenu visinu osteoklasta, odnosno udaljenost između bazolateralne membrane i nabrane membrane, pokazujući tim da vibracija može ozlijediti aktinski citoskeletalni okvir osteoklasta.

Uz to su, nakon primjene vibracije, autori zabilježili nižu razinu gena specifičnih za osteoklaste, kao što su katepsin K, metalopeptidaza matriksa-9 (MMP-9) i TRAP, a isto tako i nižu razinu c-Fos proteina, jednoga od najznačajnijih transkripcijskih čimbenika osteoklasta koji služi kao ključ regulacije u njihovom sazrijevanju.

Rezultati ovih studija pokazali su da vibracijski podražaji mogu direktno djelovati na diferencijaciju osteoklasta, neovisno o utjecaju drugih koštanih stanica.

Postoje i druge studije u kojima su korištene ljuske zlatnih ribica (*Carassius auratus*), kao model za

proučavanje djelovanja vibracijskih podražaja (105). Ljuske zlatnih ribica sadržavaju osteoblaste, osteoklaste i matriks koji uz hidroksi-apatit sadrži i kolagen tipa 1, i zbog tih osobina predstavljaju jako dobar in vitro model za proučavanje djelovanja različitih čimbenika na pojedine stanice, ili osteoblaste, ili osteoklaste, kao i na njihov međusoban odnos. Koristeći odljuštene ljuske zlatnih ribica u in vitro sustavu (organ kultura), autori su testirali različita vibracijska ubrzanja i potom analizirali promjene u koštanom metabolizmu mjereći aktivnost određenih enzima koji su specifični ili za osteoblaste, kao što je alkalna fosfataza, ili osteoklaste, kao što je TRAP. Na taj su način htjeli istražiti utjecaj vibracijskih podražaja pojedinačno na osteoblaste i pojedinačno na osteoklaste. Nakon izlaganja ljuski različitim ubrzanjima vibracijskih podražaja, zabilježen je postupni porast aktivnosti alkalne fosfataze koji je pratio porast ubrzanja. Odgovor osteoklasta, praćen aktivnošću enzima TRAP, na mala ubrzanja (0,5-1-G) bio je preblag da bi smanjenje osteoklastične aktivnosti bilo jače izraženo nakon većih ubrzanja (2-G). Bila je to jedna od prvih studija koja je pokazala da uz ispitivanje aktivnosti osteoblasta stimulacijom vibracijskim stimulusima, treba istovremeno promatrati i direktan utjecaj na aktivnost osteoklasta.

6.2 **Vibracijski podražaji uzrokuju povećanje koštane gustoće**

Naši su pokusi pokazali da ortodontski pomak uzrokuje značajno smanjenje koštane gustoće u alveolarnoj kosti na strani kompresije, što je normalna pojava koja se javlja kao rezultat ortodontskoga postupka. Koštana gustoća mjerena je koštanim obujmom (BV/TV), gustoćom tkiva (TD) i uočenom gustoćom (AD). Vibracijski podražaji obje upotrebljavane frekvencije (30Hz i 60Hz) uzrokovali su povećanje sva tri navedena parametra, odnosno povećanje gustoće kosti i oporavak resorpcije. Povećanje koštane gustoće na strani kompresije jedan je od razloga zašto je došlo do usporavanja ortodontskog postupka kod štakora. Taj je učinak bio jače izražen kod frekvencija od 30Hz.

Razlozi zbog kojih je došlo do povećanja koštane gustoće na strani kompresije alveolarne kosti najvjerojatnije su povezani uz prethodno spomenutu inhibiciju osteoklastogeneze, ali moguće je da se radi i o direktnom djelovanju vibracijskih podražaja na formaciju kosti i aktivaciju osteogeneze i stanica osteoblasta.

Kako je ranije spomenuto, dokazano je da vibracijski podražaji frekvencije 30Hz povećavaju osteocitno lučenje signala osteogeneze i povećavaju razinu alkalne fosfataze u osteoblastima što upućuje na to da te frekvencije imaju osteogeni ili anabolički učinak, dok su frekvencije od 90Hz

pokazale suprotan učinak (106).

To se može povezati i s našim pokusima u kojima su vibracijski podražaji frekvencije 30Hz povezani s većom gustoćom kostiju i manjim brojem osteoklasta, dok vibracijski podražaji frekvencije 60Hz imaju još uvijek anabolički, ali slabiji učinak na iste parametre.

Iz naših se pokusa može zaključiti da vibracijski podražaji pokazuju o dozi/frekvenciji ovisan učinak.

Kao dodatak ovome, nedavna je studija pokazala da vibracijski podražaji frekvencija od 5, 10 i 20Hz značajno smanjuju količinu sklerostina u osteocitima u alveolarnoj kosti za vrijeme ortodontskog postupka (107). U njoj se može vidjeti da sklerostin luče osteociti i da sklerostin inhibira tvorbu kosti putem Wnt signaliziranja. Tako gubitak sklerostina izaziva povećanje koštane mase i trenutno se ta saznanja koriste eksperimentalno za tretman osteoporoze putem antisklerostinskih antitijela. Kako vibracijski podražaji snižavaju razine sklerostina u osteocitima, tako dolazi do aktivacije Wnt-a koji potiče osteoblaste i proces osteogeneze i formiranja nove kosti.

Međutim, brojne su studije pokazale da vibracijski podražaji imaju izravan utjecaj na aktivnost i diferencijaciju osteoblasta naglašavajući tako njihov anabolički ili osteogeni učinak (60, 108).

Jing i suradnici (60) pokazali su da mehanički vibracijski podražaji od 30Hz u primarnim kulturama osteoblasta izoliranima iz kunića uzrokuju povećanje njihove proliferacije, povećanje broja pseudopodija i povećano prianjanje osteoblasta uz podlogu pločica, razvijeniji citoskelet i više mikrofilamenata, kao i povećanje formiranja mineralizacijskih nodula. Isti su vibracijski podražaji u kulturama osteoblasta izazvali povećavanje izražaja gena tipičnih za osteogenezu i njihovih proteina, kao što su alkalna fosfataza (AP), osteokalcin (OC), Runx2, BMP2, OPG,Wnt3a, Lrp6 i βkatenin. I*n vivo* istraživanja iste grupe autora s titanskim implantatima pokazala su da vibracijski podražaji u trajanju od 6 ili 12 tjedana stimuliraju osteointegraciju, urastanje kosti i brzinu koštane formacije u defektima stvorenima na bedrenoj kosti kunića.

Iz navedenoga se može primijetiti izravan i izrazit učinak vibracije na proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta i njezin značaj za osteogenezu.

Nadalje, dokazano je da vibracijski podražaji visokih frekvencija mogu stimulirati angiogenezu u normalnim i osteoporotičnim štakorskim kostima i tako naglasile važnost vaskularizacije u procesima osteogeneze, odnosno njihove uloge u adaptaciji kod povećane potrebe za stanicama pretečama osteoblastične loze.

Do usporavanja ortodontskoga postupka upotrebom vibracijskih podražaja došlo je dakle ili zbog kočenja osteoklastogeneze i aktivnosti osteoklasta, ili pak stimulacijom tvorbe kosti djelovanjem na osteoblaste, ili zbog istovremenog djelovanja na oba sustava.

6.3 **Vibracijski podražaji ne uzrokuju mineralizaciju parodontnog ligamenta**

Naši su pokusi pokazali da parodontni ligament izložen vibracijskim podražajima ne pokazuje znakove mineralizacije i da stanice parodontnog ligamenta ne diferenciraju prema krajnje diferenciranim osteoblastima koji mineraliziraju matriks, što je bilo evidentirano Von Kossa bojanjem histoloških rezova parodontnoga ligamenta. Neke su pak studije na ljudskim matičnim stanicama parodontnoga ligamenta (hPDLsc) pokazale da vibracijski podražaji velikih frekvencija, malih amplituda, mogu u tim stanicama povećati izražaj gena osteogeneze, kao što su alkalna fosfataza, osteokalcin, osteriks, runx2 i skleraksis, a otkrili su i povećanu proizvodnju kolagena tipa 1. Njihovi rezultati upućuju na to da pod utjecajem vibracijskih podražaja matične stanice parodontnoga ligamenta pokazuju osteoblastični diferencijacijski potencijal, vjerojatno mijenjajući svoj citoskelet (59).

Uzimajući u obzir ove nalaze, pretpostavili smo kako su možda diferencijacija stanica unutar parodontnog ligamenta prema krajnje diferenciranim osteoblastima i mineralizacija parodontnoga ligamenta razlozi zbog kojih dolazi do kočenja ortodonskoga postupka. Ali, naši pokusi nisu išli u prilog ovoj teoriji. Vjerojatno je osteogeni potencijal stanica parodontnog ligamenta pod utjecajem vibracijskih sila ovisan o dozi i frekvenciji samih vibracija, a u našim je pokusima sila bila stalna, 0,4 N, uz dvije frekvencije, 30 i 60Hz.

6.4 **Vibracijski podražaji ne mijenjaju proliferaciju stanica unutar parodontnog ligamenta**

Učinak vibracijskih podražaja na staničnu aktivnost i proliferaciju nije dovoljno jasan. Neke studije govore u prilog tome da vibracijski podražaji mogu izazvati povećanje stanične proliferacije, dok druge studije pokazuju suprotne rezultate. Tako su Zhang i suradnici svojim pokusima pokazali smanjenje proliferacije matičnih stanica parodontnoga ligamenta pod utjecajem vibracije (59), dok su Jiang i suradnici proučavali djelovanje mehaničke vibracije na proliferaciju fibroblasta prednjega križnog ligamenta i otkrili su da su vibracijske sile djelovale na proliferaciju i metabolizam fibroblasta i da je taj učinak ovisan o frekvenciji i dozi (109). Vibracije frekvencija od

20Hz najpovoljnije su djelovale na povećanje stanične proliferacije i proizvodnju izvanstaničnog matriksa, uključujući kolagen tipa 1 i 3, fibronektin, elastin, tenascin, vimentin itd. Slične rezultate dobili su Gaston i suradnici (110).

Cilj je njihove studije bio istražiti utjecaj vibracijskih podražaja na proliferaciju i apoptozu stanica fibroblasta glasnica. Stanične kulture fibroblasta u bioreaktoru bile su izložene frekvencijama 200Hz u trajanju od 8 sati nakon čega su bile imunobojane na marker stanične proliferacije, Ki-67, i podvrgnute metodi utvrđivanja stanične apoptoze, TUNEL. Otkriveno je statistički značajno povećanje stanične proliferacije dok do apoptoze fibroblasta nije došlo. Očekivali smo kako će doći do povećanja proliferacije stanica u parodontnom ligamentu i u našim pokusima, i da bi to povećanje proliferacije moglo dovesti do bržeg i učinkovitijega ortodontskog postupka. Međutim, nismo ustanovili da vibracijski podražaji od 30Hz povećavaju ili utječu na staničnu proliferaciju. I ovdje možemo utvrditi da je stanična proliferacija možda ovisna o frekvenciji i dozi primijenjenih vibracijskih podražaja. Naime, u svojim smo pokusima koristili samo dvije frekvencije, 30 i 60Hz, jakosti 0,4N, što je poprilično velika sila za parodontni ligament i koja je prouzročila značajna oštećenja stanica. Međutim, prijeko je neophodno bilo koristiti snage većih jakosti kako bi bili sigurni da se vibracijski podražaji prijenose i na alveolarnu kost. Parodontni ligament inače služi kao ublaživač ili jastuk koji se svakodnevno prilagođava i upija sile koje se javljaju pri žvakanju. Zato smo trebali koristiti sile veće od onih koje se upotrebljavaju pri upotrebi vibracija čitavog tijela, tzv. *whole body vibration,* za stimulaciju dugih kostiju gdje nemamo ublaživač na površini kosti.

6.5 Vibracijski podražaji u kombinaciji s ortodontskim postupkom izazivaju značajna stanična oštećenja u parodontnom ligamentu

Jedan od mogućih razloga zašto je došlo do usporavanja ortodontskoga postupka u našim istraživanjima možda je povezan s apoptozom stanica parodontnoga ligamenta. Otkrili smo da sam ortodontski postupak, kao i vibracijski podražaji kad se upotrebljavaju bez ortodontskoga postupka, nisu znatno utjecali na povećavanje stanične apoptoze. Ali, ukoliko se vibracijski podražaji koriste istovremeno uz ortodontski postupak, dolazi do značajnoga povećanja broja apoptotičnih stanica unutar parodontnoga ligamenta, što bi značilo da vibracijski podražaji navedenih parametara oštećuju parodontni ligament tijekom ortodontskoga postupka. Moguće objašnjenje najvjerojatnije leži u snazi vibracijskih sila koje su iznosile 0,4 N i moguće je kako je ta snaga prevelika. Dodatni

pokusi s manjim snagama vjerojatno bi pružili bolji uvid. Vibracije frekvencija 30Hz pokazale su veći postotak oštećenja ili stanične smrti. Naša su istraživanja također pokazala da kod manjih frekvencija vibracije, npr. 30Hz, putovanje vibracijske elektrode iznosi puno više negoli putovanja elektrode kod većih frekvencija, 60Hz. To veće putovanje elektrode i pritisak na kutnjak koji je potreban da se postigne ista snaga primjene od 0,4N, vjerojatno je uzrok većih oštećenja kod frekvencije od 30Hz.

Smjer djelovanja vibracijske elektrode bio je okomit na smjer djelovanja i aktivacije ortodontske opruge, što je također jedan od čimbenika koji su mogli štetno djelovati na stanične strukture parodontnoga ligamenta. Bilo bi dobro u budućim istraživanjima, uz ispitivanje različitih doza i frekvencija, istražiti i djelovanje različitih smjerova postavljanja vibracijske elektrode, npr, možda ih postaviti tako da usmjeravaju silu vibracije u smjeru u kojem je postavljena i ortodonska sila. Nadalje, možda bi zbog ovako štetnoga djelovanja vibracijskih podražaja na stanice parodontnoga ligamenta, vibracijske podražaje trebalo usmjeriti samo na alveolarnu kost i tako izbjeći izlaganje parodontnoga ligamenta velikim silama vibracije koje su nužne u ovom okluzijskom smjeru postavljanja da bi se sile vibracije mogle prenijeti i na alveolarnu kost. Međutim, nedavne studije sa sličnim eksperimentalnim modelom na miševima kod kojih su korištene manje snage vibracijskih podražaja i različite frekvencije od 5, 10 i 20Hz, također su pokazale usporavanje ortodontskoga postupka iako autori nisu zabilježili nikakva oštećenja parodontnoga ligamenta ili značajniju apoptozu stanica (107).

Tako, čini se, bez obzira na dozu i frekvenciju vibracijskih podražaja, dolazi do usporavanja ortodontskoga postupka koje je najvjerojatnije izazvano djelovanjem prvenstveno na alveolarnu kost i kočenjem formiranja i aktiviranja osteoklasta, a promjene koje se javljaju u parodontnom ligamentu samo su popratne.

6.6 Vibracijski podražaji u kombinaciji s ortodontskim postupkom uzrokuju značajna oštećenja kolagenih vlakana parodontnog ligamenta

Sve metode detekcije koje smo koristili za utvrđivanje strukture kolagenih vlakana pokazale su da, ako se vibracijski podražaji koriste istovremeno s ortodontskim postupkom, dolazi do značajnih oštećenja kolagenih vlakana i ta oštećenja ovise o primijenjenoj frekvenciji, slično kao i razina stanične apoptoze.

Zanimljivo je da, ukoliko su se vibracijski podražaji koristili odvojeno, odnosno bez ortodontskoga postupka, učinak je bio suprotan, naime, vibracijski podražaji pokazali su zadebljanja kolagenih vlakana pa je moguće da se vibracijski podražaji mogu koristiti za cijeljenje kolagenih vlakana pri nekim drugim oštećenjima, poremećajima ili bolestima. Slična zapažanja zabilježena su kad je korištena samo ortodontska sila, naime, ortodontska sila uzrokovala je izrazita zadebljanja kolagenih vlakana, što ukazuje na njihov veliki adaptacijski potencijal na sile istezanja.

Moguće objašnjenje zašto dolazi do oštećenja kolagenih vlakana ukoliko se vibracijski podražaji koriste tijekom ortodontskoga postupka leži vjerojatno u većoj snazi upotrebljavanih vibracija i smjeru njihovog djelovanja, tzv. okluzijskom smjeru, iz sličnih razloga kao i kod apoptoze.

Frekvencije od 30Hz izazvale su veća oštećenja negoli one od 60Hz i razlog je vjerojatno u većem putovanju vibracijske elektrode pri toj frekvenciji.

Moguće je kako su dezintegracija i dezorganizacija kolagenih vlakana koje su zapažene u našem istraživanju također razlog usporavanja ortodontskoga postupka. Naime, neke su studije pokazale da je za normalan ortodontski postupak potrebna specijalna orijentacija kolagenih vlakana koja su organizirana u listovima, a ne u snopovima, kako je ranije bilo tumačeno. Potrebno je da na mjestu kompresije dođe do određenih udaljenosti ili razmaka između listova vlakana kako bi se na tim mjestima omogućila pravilna dinamika fluida potrebna za početak ortodontskoga pomaka (111). Ukoliko vibracijski podražaji poremete organizaciju tih listova vlakana, vjerojatno ne može doći do pravilnoga početka ortodontskoga pomaka zuba.

U drugoj studiji autori su gledali kako *diabetes mellitus* utječe na brzinu ortodontskoga postupka (112). Ustanovili su da štakori s dijabetesom pokazuju veće razine metaloproteinaze matriksa (MMP-1) i nižu razinu kolagena tipa 1. MMP-1 je odgovoran za pravilnu razgradnju kolagenih vlakana, a štakori s dijabetesom trebaju puno više vremena za pravilnu pregradnju kolagenih vlakana koja je neophodna u početku ortodontskoga postupka. Ta usporena pregradnja kolagena bila je popraćena produženom pregradnjom alveolarne kosti i zakašnjelim djelovanjem osteoklasta, kao i zakašnjelim uklanjanjem nefunkcionalnih osteoklasta. Čini se kako je za pravilno djelovanje osteoklasta prethodno potrebna normalna organizacija kolagenih vlakana unutar parodontnoga ligamenta. Iz navedenoga se može zaključiti da pacijenti s dijabetesom imaju sporiji ortodontski postupak, vjerojatno zbog nepravilne pregradnje kolagenih vlakana. Tako je i u našim pokusima moguće da vibracijom dolazi do oštećenja i dezorijentacije kolagenih vlakana u parodontnome ligamentu koja posljedično dovodi do nepravilne i usporene funkcije osteoklasta. Upravo

nepravilna organizacija kolagenih vlakana može biti jedan od razloga sporijega ortodontskog postupka kod štakora izloženih vibracijskim podražajima.

6.7 Upotreba vibracijskih podražaja u suvremenoj ortodonciji

Sudeći prema svim saznanjima iz naših istraživanja i rezultatima kliničkih studija koje su trenutno u tijeku, koje nisu pokazale da vibracijski podražaji mogu ubrzati ortodontski postupak (113), možemo ustanoviti da je u suvremenoj ortodontskoj praksi potrebno uložiti veliki oprez kod primjene vibracijskih naprava trenutno popularnih na tržištu i korištenih se za ubrzanje ortodontskoga tretmana.

Kako većina studija ukazuje da vibracijski podražaji koče ortodontski pomak i negativno djeluju na osteoklastogenezu i aktivnost osteoklasta, postoje naznake kako bi vibracijske naprave mogle biti korisne za prevenciju i terapiju relapsa koji se javlja neposredno nakon uklanjanja ortodontskih opruga i predstavlja velik problem u ortodonciji, a ne za ubrzanje ortodontskoga tretmana. Jaka resorpcija zubnoga korijena javlja se ukoliko se koriste jake sile ortodontskih opruga koje se primjenjuju konstantno, a ne intermitentno i sl. Kako je resorpcija zubnoga korijena posljedica pojačane aktivnosti cementoklasta i odontoklasta, stanica vrlo sličnih osteoklastima, postoje naznake da bi vibracijski podražaji mogli biti jako korisni za prevenciju i ublažavanje resorpcije korijena. Nedavne studije na eksperimentalnim životinjama potvrdile su i ove naznake (114).

U budućnosti su potrebne dodatne eksperimentalne studije koje bi trebale detaljnije istražiti točne mehanizme djelovanja vibracija na specifične stanične loze, ovisnost djelovanja o njihovim različitim dozama i frekvencijama, kao i način njihove primjene.

Budući da su vibracijske metode poprilično neinvazivne i relativno jednostavne i jeftine za primjenu, postavljaju temelj praktičnom terapijskom modelu u suvremenoj medicini i stomatologiji.

7. ZAKLJUČCI

- Preciznim mjerenjem ortodontskog pomaka metodom mikrokompjuterizirane tomografije ustanovljeno je da ciklički vibracijski podražaji usporavaju i onemogućuju ortodontski postupak. Taj učinak je ovisan o dozi, odnosno frekvencije od 30Hz imaju jači učinak nego frekvencije od 60Hz.

- Analizom alveolarnih koštanih parametara ustanovljeno je da vibracijski podražaji povećavaju gustoću alveolarne kosti i onemogućuju koštanu resorpciju koja se javlja tijekom ortodonskog pomaka. I taj učinak je ovisan o dozi, pa vibracijske frekvencije od 30 Hz imaju jači učinak negoli frekvencije od 60Hz.

- Histološkom analizom aktivnosti osteoklasta, ustanovljen je značajno manji broj i površina aktivnih osteoklasta na strani resorpcije alveolarne kosti kod vibracijskih frekvencija 30Hz što upućuje da vibracijski podražaji mogu izravno utjecati na broj i aktivnost stanica koje su odgovorne za koštanu resorpciju nužnu tijekom ortodontskog postupka.

- Posebnim bojanjem histoloških rezova ustanovljeno je da vibracijski podražaji ne povećavaju diferencijaciju stanica PDL-a prema osteoblastičnim stanicama koje luče mineral, odnosno nije ustanovljena mineralizacija ili kalcifikacija PDL-a koja bi mogla zakočiti ortodontski pomak, a histološkim metodama identifikacije ugradnje bromodeoksi-uridina nije ustanovljena povećana stanična proliferacija PDL-a što potvrđuje nalaz bojanja.

- Histološkom analizom apoptotičnih odnosno nekrotičnih stanica unutar PDL-a u svim eksperimentalnim skupinama ustanovljeno je da vibracijski podražaji povećavaju razinu oštećenih stanica u parodontnom ligamentu, a osobito ukoliko se primjenjuju u kombinaciji s ortodontskim tretmanom. Vibracijske frekvencije od 30Hz imaju značajno veći učinak na stanična oštećenja nego frekvencije od 60Hz. Bojanjem kolagenih vlakana PDL-a i analizom pod svjetlosnim i polariziranim mikroskopom dokazano je da vibracijski podražaji primijenjeni u istraživanju mogu oštetiti kolagena vlakna PDL-a pogotovo ako se koriste kao dodatak ortodontskom tretmanu. Frekvencije od 30Hz pokazale su puno jači učinak nego frekvencije od 60Hz, a sličan rezultat dokazan je i multifotonskom mikroskopijom. Navedene promjene mogle bi biti uzrokom usporenja ortodontskog tretmana.

- Mjerenjem pomaknuća vibracijske elektrode kod obje frekvencije korištene u istraživanju ustanovljene su značajno veće vrijednosti kod frekvencija od 30Hz što ukazuje da je potrebno

puno veće putovanje elektrode i tako veći okluzijski pritisak na tkiva pri frekvenciji od 30Hz da bi se postigla ista snaga kao i kod frekvencije od 60Hz. Ovaj nalaz može objasniti i veća tkivna ostećenja zabilježena kod frekvencije od 30Hz , sile 0,4N.

8. SAŽETAK

Svrha provedenog istraživanja bila je ispitati kako vibracijski podražaji, kao neinvazivne i relativno jednostavne fizikalne metode, djeluju na ortodontski postupak.

Ortodontski model primjenjen je na štakorima kojima su prvi maksilarni kutnjaci bili pomicani prema sjekutićima, mizijalno, u trajanju od 2 tjedna. Vibracijski podražaji primijenjivani su 2 puta tjedno u trajanju od 10 minuta okomito na okluzijsku površinu kutnjaka. Koristili smo dvije vibracijske frekvencije, 30 i 60Hz, jednake sile djelovanja od 0,4N.

Obje korištene frekvencije pokazale su usporenje ortodontskog pomaka. To usporenje najvjerojatnije je bilo izazvano djelovanjem vibracijskiih podražaja na aktivnost osteoklasta i kočenje resorpcije alveolarne kosti. Resorpcija je vrlo važna i neizbježna pojava tijekom ortodontskog pomaka. Kao nuspojava zabilježena su značajna ostećenja stanica i dezorganizacija kolagenskih vlakana unutar parodontnog ligamenta najvjerojatnije izazvana prevelikom silom vibracijskih frekvencija (0,4N). Sve navedene promjene bile su jače izražene kod frekvencije od 30Hz nego od 60Hz.

U budućnosti su potrebne dodatne studije koje bi detaljnije istražile utjecaj čitavog raspona vibracijskih sila i frekvecija na alveolarnu kost i koštanu pregradnju koja se javlja tijekom ortodontskog postupka.

Rezultati ove studije upućuju na zaključak da vibracijski stimulusi, zbog potencijalnog kočenja aktivnosti osteoklasta i resorpcije kosti, mogu imati korisnu primjenu pri prevenciji ortodontskog relapsa koji se javlja neposredno nakon završetka ortodontskog tretmana i predstavlja veliki klinički problem u ortodonciji.

9. SUMMARY

"*Effect of cyclical forces on the periodontal ligament and alveolar bone remodeling during orthodontic tooth movement*"

In this study we wanted to investigate how cyclical (vibratory forces), as noninvasive and relatively simple and nonexpensive psysical methods, could affect orthodontic tooth movement in rats.

Two different vibrational frequences, 30 and 60Hz, at the force of 0.4Newton were applied oclusally twice a week for 10 minutes in experimantal rats where the first left maxillary molars were moved mesially for 2 weeks.

Both vibrational frequencies inhibited the amount of tooth movement. That effect was probably caused by the inhibition of osteoclastic activity and alveolar bone resorption that is important and necessary event during the orthodontic tooth movement. We also found that vibratory forces caused increased number of apoptotic cells and marked disorganization of the collagen fibril structure within the periodontal ligament, probably due to the excessive force levels used in these experiments. All changes were more prominent with 30Hz vibrational frequencies.

Future studies should include additional analysis that would evaluate the effect of the whole range of vibrational forces and frequencies on the alveolar bone and resorption during the ortodontic tooth movement. Those studies should also evaluate more carefully the frequency and the point of their application (vibrating the alveolar bone directly insead of the tooth crown).

Based on the results from this study, vibratory forces, because of their inhibitory effect on osteoclastic activity and bone resorption and decceleration of tooth movement, could have a significant impact and clinical use in the prevention of the orthodontic relapse, unwanted orthodontic event that occurs immediately after the termination of treatment and present an enormous problem in orthodontics.

10. LITERATURA

1. Henneman S, Von den Hoff JW, Maltha JC. Mechanobiology of tooth movement. Eur J Orthod. 2008;30(3):299-306.

2. Pavlin D, Goldman ES, Gluhak-Heinrich J, Magness M, Zadro R. Orthodontically stressed periodontium of transgenic mouse as a model for studying mechanical response in bone: The effect on the number of osteoblasts. Clin Orthod Res. 2000;3(3):55-66.

3. Proffit W. Contemporary Orthodontics. 2007.

4. Hand AR. Fundamentals of Oral Histology and Physiology. 2014.

5. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2006;129(4):469 e1-32.

6. Mao JJ, Wang X, Kopher RA. Biomechanics of craniofacial sutures: orthopedic implications. Angle Orthod. 2003;73(2):128-35.

7. Storey E. The nature of tooth movement. Am J Orthod. 1973;63(3):292-314.

8. Reitan K. Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. Am J Orthod. 1967;53(10):721-45.

9. Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Optimum force magnitude for orthodontic tooth movement: a systematic literature review. Angle Orthod. 2003;73(1):86-92.

10. Davidovitch Z. Tooth movement. Crit Rev Oral Biol Med. 1991;2(4):411-50.

11. Baumrind S. A reconsideration of the propriety of the "pressure-tension" hypothesis. Am J Orthod. 1969;55(1):12-22.

12. Kardos TB, Simpson LO. A new periodontal membrane biology based upon thixotropic concepts. Am J Orthod. 1980;77(5):508-15.

13. Yee JA, Kimmel DB, Jee WS. Periodontal ligament cell kinetics following orthodontic tooth movement. Cell Tissue Kinet. 1976;9(3):293-302.

14. Mostafa YA, Weaks-Dybvig M, Osdoby P. Orchestration of tooth movement. Am J Orthod. 1983;83(3):245-50.

15. Grimm FM. Bone bending, a feature of orthodontic tooth movement. Am J Orthod. 1972;62(4):384-93.

16. Bassett CA, Becker RO. Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress. Science. 1962;137(3535):1063-4.

17. Zengo AN, Bassett CA, Pawluk RJ, Prountzos G. In vivo bioelectric petentials in the dentoalveolar complex. Am J Orthod. 1974;66(2):130-9.

18. Pollack SR, Salzstein R, Pienkowski D. The electric double layer in bone and its influence on stress-generated potentials. Calcif Tissue Int. 1984;36 Suppl 1:S77-81.

19. Borgens RB. Endogenous ionic currents traverse intact and damaged bone. Science. 1984;225(4661):478-82.

20. Davidovitch Z, Finkelson MD, Steigman S, Shanfeld JL, Montgomery PC, Korostoff E. Electric currents, bone remodeling, and orthodontic tooth movement. I. The effect of electric currents on periodontal cyclic nucleotides. Am J Orthod. 1980;77(1):14-32.

21. Burstone CJ. The biomechanics of tooth movement. Vistas in orthodontics. 1962.

22. von Bohl M, Maltha JC, Von Den Hoff JW, Kuijpers-Jagtman AM. Focal hyalinization during experimental tooth movement in beagle dogs. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2004;125(5):615-23.

23. Pawlina W. Histology: a text and atlas. 2016.

24. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. Nat Med. 2011;17(10):1231-4.

25. Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. Nat Med. 2011;17(10):1235-41.

26. Kogianni G, Mann V, Noble BS. Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. J Bone Miner Res. 2008;23(6):915-27.

27. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. Endocr Rev. 1999;20(3):345-57.

28. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature. 1997;390(6656):175-9.

29. Tsukii K, Shima N, Mochizuki S, Yamaguchi K, Kinosaki M, Yano K, et al. Osteoclast differentiation factor mediates an essential signal for bone resorption induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3, prostaglandin E2, or parathyroid hormone in the microenvironment of bone. Biochem Biophys Res Commun. 1998;246(2):337-41.

30. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(7):3597-602.

31. Kanzaki H, Chiba M, Takahashi I, Haruyama N, Nishimura M, Mitani H. Local OPG gene transfer to periodontal tissue inhibits orthodontic tooth movement. J Dent Res. 2004;83(12):920-5.

32. Ichinose Y, Tanaka H, Inoue M, Mochizuki S, Tsuda E, Seino Y. Osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin reduced bone loss induced by mechanical unloading. Calcif Tissue Int. 2004;75(4):338-43.

33. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell. 1997;89(2):309-19.

34. Dunn MD, Park CH, Kostenuik PJ, Kapila S, Giannobile WV. Local delivery of osteoprotegerin inhibits mechanically mediated bone modeling in orthodontic tooth movement. Bone. 2007;41(3):446-55.

35. Kanzaki H, Chiba M, Arai K, Takahashi I, Haruyama N, Nishimura M, et al. Local RANKL gene transfer to the periodontal tissue accelerates orthodontic tooth movement. Gene Ther. 2006;13(8):678-85.

36. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. J Bone Miner Res. 2002;17(2):210-20.

37. de Carlos F, Cobo J, Diaz-Esnal B, Arguelles J, Vijande M, Costales M. Orthodontic tooth movement after inhibition of cyclooxygenase-2. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2006;129(3):402-6.

38. Soma S, Iwamoto M, Higuchi Y, Kurisu K. Effects of continuous infusion of PTH on experimental tooth movement in rats. J Bone Miner Res. 1999;14(4):546-54.

39. Soma S, Matsumoto S, Higuchi Y, Takano-Yamamoto T, Yamashita K, Kurisu K, et al. Local and chronic application of PTH accelerates tooth movement in rats. J Dent Res. 2000;79(9):1717-24.

40. Collins MK, Sinclair PM. The local use of vitamin D to increase the rate of orthodontic tooth movement. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1988;94(4):278-84.

41. Takano-Yamamoto T, Kawakami M, Kobayashi Y, Yamashiro T, Sakuda M. The effect of local application of 1,25-dihydroxycholecalciferol on osteoclast numbers in orthodontically treated rats. J Dent Res. 1992;71(1):53-9.

42. Kawasaki K, Shimizu N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. Lasers Surg Med. 2000;26(3):282-91.

43. Liskova M, Hert J. Reaction of bone to mechanical stimuli. 2. Periosteal and endosteal reaction of tibial diaphysis in rabbit to intermittent loading. Folia Morphol (Praha). 1971;19(3):301-17.

44. Robling AG, Duijvelaar KM, Geevers JV, Ohashi N, Turner CH. Modulation of appositional and longitudinal bone growth in the rat ulna by applied static and dynamic force. Bone. 2001;29(2):105-13.

45. Umemura Y, Ishiko T, Yamauchi T, Kurono M, Mashiko S. Five jumps per day increase bone mass and breaking force in rats. J Bone Miner Res. 1997;12(9):1480-5.

46. Robling AG, Burr DB, Turner CH. Recovery periods restore mechanosensitivity to dynamically loaded bone. J Exp Biol. 2001;204(Pt 19):3389-99.

47. Courteix D, Lespessailles E, Peres SL, Obert P, Germain P, Benhamou CL. Effect of physical training on bone mineral density in prepubertal girls: a comparative study between impact-loading and non-impact-loading sports. Osteoporos Int. 1998;8(2):152-8.

48. Fehling PC, Alekel L, Clasey J, Rector A, Stillman RJ. A comparison of bone mineral densities among female athletes in impact loading and active loading sports. Bone. 1995;17(3):205-10.

49. Rubin C, Turner AS, Mallinckrodt C, Jerome C, McLeod K, Bain S. Mechanical strain, induced noninvasively in the high-frequency domain, is anabolic to cancellous bone, but not cortical bone. Bone. 2002;30(3):445-52.

50. Kopher RA, Mao JJ. Suture growth modulated by the oscillatory component of micromechanical strain. J Bone Miner Res. 2003;18(3):521-8.

51. Othman H, Thonar EJ, Mao JJ. Modulation of neonatal growth plate development by ex vivo intermittent mechanical stress. J Biomech. 2007;40(12):2686-93.

52. Stark TM, Sinclair PM. Effect of pulsed electromagnetic fields on orthodontic tooth movement. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1987;91(2):91-104.

53. Darendeliler MA, Zea A, Shen G, Zoellner H. Effects of pulsed electromagnetic field vibration on tooth movement induced by magnetic and mechanical forces: a preliminary study. Aust Dent J. 2007;52(4):282-7.

54. Tengku BS, Joseph BK, Harbrow D, Taverne AA, Symons AL. Effect of a static magnetic field on orthodontic tooth movement in the rat. Eur J Orthod. 2000;22(5):475-87.

55. Nishimura M, Chiba M, Ohashi T, Sato M, Shimizu Y, Igarashi K, et al. Periodontal tissue activation by vibration: intermittent stimulation by resonance vibration accelerates experimental tooth movement in rats. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2008;133(4):572-83.

56. Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. The rat as a model for orthodontic tooth movement--a critical review and a proposed solution. Eur J Orthod. 2004;26(5):483-90.

57. Yoshimatsu M, Shibata Y, Kitaura H, Chang X, Moriishi T, Hashimoto F, et al. Experimental model of tooth movement by orthodontic force in mice and its application to tumor necrosis factor receptor-deficient mice. J Bone Miner Metab. 2006;24(1):20-7.

58. Zhang C, Li J, Zhang L, Zhou Y, Hou W, Quan H, et al. Effects of mechanical vibration on proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. Arch Oral Biol. 2012;57(10):1395-407.

59. Zhang C, Lu Y, Zhang L, Liu Y, Zhou Y, Chen Y, et al. Influence of different intensities of vibration on proliferation and differentiation of human periodontal ligament stem cells. Arch Med Sci. 2015;11(3):638-46.

60. Jing D, Tong S, Zhai M, Li X, Cai J, Wu Y, et al. Effect of low-level mechanical vibration on osteogenesis and osseointegration of porous titanium implants in the repair of long bone defects. Sci Rep. 2015;5:17134.

61. Uribe F, Kalajzic Z, Bibko J, Nanda R, Olson C, Rowe D, et al. Early effects of orthodontic forces on osteoblast differentiation in a novel mouse organ culture model. Angle Orthod. 2011;81(2):284-91.

62. Moin S, Kalajzic Z, Utreja A, Nihara J, Wadhwa S, Uribe F, et al. Osteocyte death during orthodontic tooth movement in mice. Angle Orthod. 2014;84(6):1086-92.

63. Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. Calcif Tissue Int. 2014;94(1):25-34.

64. Bonewald LF. The amazing osteocyte. J Bone Miner Res. 2011;26(2):229-38.

65. Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, et al. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. J Bone Miner Res. 2006;21(4):605-15.

66. Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Hayashi M, Hayashi N, Aoki S, et al. RANKL subcellular trafficking and regulatory mechanisms in osteocytes. J Bone Miner Res. 2013;28(9):1936-49.

67. Kennedy OD, Herman BC, Laudier DM, Majeska RJ, Sun HB, Schaffler MB. Activation of resorption in fatigue-loaded bone involves both apoptosis and active pro-osteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations. Bone. 2012;50(5):1115-22.

68. Qing H, Ardeshirpour L, Pajevic PD, Dusevich V, Jahn K, Kato S, et al. Demonstration of osteocytic perilacunar/canalicular remodeling in mice during lactation. J Bone Miner Res. 2012;27(5):1018-29.

69. Kramer I, Halleux C, Keller H, Pegurri M, Gooi JH, Weber PB, et al. Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis. Mol Cell Biol. 2010;30(12):3071-85.

70. Harris SE, MacDougall M, Horn D, Woodruff K, Zimmer SN, Rebel VI, et al. Meox2Cre-mediated disruption of CSF-1 leads to osteopetrosis and osteocyte defects. Bone. 2012;50(1):42-53.

71. Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS. The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. J Bone Miner Res. 1998;13(8):1243-50.

72. Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. J Clin Endocrinol Metab. 1997;82(9):3128-35.

73. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. Bone. 2008;42(4):606-15.

74. Almeida M, Han L, Bellido T, Manolagas SC, Kousteni S. Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. J Biol Chem. 2005;280(50):41342-51.

75. Rubin C, Turner AS, Muller R, Mittra E, McLeod K, Lin W, et al. Quantity and quality of trabecular bone in the femur are enhanced by a strongly anabolic, noninvasive mechanical intervention. J Bone Miner Res. 2002;17(2):349-57.

76. Judex S, Lei X, Han D, Rubin C. Low-magnitude mechanical signals that stimulate bone formation in the ovariectomized rat are dependent on the applied frequency but not on the strain magnitude. J Biomech. 2007;40(6):1333-9.

77. Garman R, Gaudette G, Donahue LR, Rubin C, Judex S. Low-level accelerations applied in the absence of weight bearing can enhance trabecular bone formation. J Orthop Res. 2007;25(6):732-40.

78. Oxlund BS, Ortoft G, Andreassen TT, Oxlund H. Low-intensity, high-frequency vibration appears to prevent the decrease in strength of the femur and tibia associated with ovariectomy of adult rats. Bone. 2003;32(1):69-77.

79. Xie L, Jacobson JM, Choi ES, Busa B, Donahue LR, Miller LM, et al. Low-level mechanical vibrations can influence bone resorption and bone formation in the growing skeleton. Bone. 2006;39(5):1059-66.

80. Rubin C, Recker R, Cullen D, Ryaby J, McCabe J, McLeod K. Prevention of postmenopausal bone loss by a low-magnitude, high-frequency mechanical stimuli: a clinical trial assessing compliance, efficacy, and safety. J Bone Miner Res. 2004;19(3):343-51.

81. Verschueren SM, Roelants M, Delecluse C, Swinnen S, Vanderschueren D, Boonen S. Effect of 6-month whole body vibration training on hip density, muscle strength, and postural control in postmenopausal women: a randomized controlled pilot study. J Bone Miner Res. 2004;19(3):352-9.

82. Ward K, Alsop C, Caulton J, Rubin C, Adams J, Mughal Z. Low magnitude mechanical loading is osteogenic in children with disabling conditions. J Bone Miner Res. 2004;19(3):360-9.

83. Cherian PP, Cheng B, Gu S, Sprague E, Bonewald LF, Jiang JX. Effects of mechanical strain on the function of Gap junctions in osteocytes are mediated through the prostaglandin EP2 receptor. J Biol Chem. 2003;278(44):43146-56.

84. Tanabe N, Maeno M, Suzuki N, Fujisaki K, Tanaka H, Ogiso B, et al. IL-1 alpha stimulates the formation of osteoclast-like cells by increasing M-CSF and PGE2 production and decreasing OPG production by osteoblasts. Life Sci. 2005;77(6):615-26.

85. Coetzee M, Haag M, Kruger MC. Effects of arachidonic acid, docosahexaenoic acid, prostaglandin E(2) and parathyroid hormone on osteoprotegerin and RANKL secretion by MC3T3-E1 osteoblast-like cells. J Nutr Biochem. 2007;18(1):54-63.

86. Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. Interactive effect of interleukin-6 and prostaglandin E2 on osteoclastogenesis via the OPG/RANKL/RANK system. Ann N Y Acad Sci. 2006;1068:225-33.

87. Bacabac RG, Smit TH, Van Loon JJ, Doulabi BZ, Helder M, Klein-Nulend J. Bone cell responses to high-frequency vibration stress: does the nucleus oscillate within the cytoplasm? Faseb J. 2006;20(7):858-64.

88. Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Gu S, Wang X, Bonewald LF, Sprague E, et al. Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. Mol Biol Cell. 2005;16(7):3100-6.

89. Liu J, Zhao Z, Zou L, Li J, Wang F, Li X, et al. Pressure-loaded MSCs during early osteodifferentiation promote osteoclastogenesis by increase of RANKL/OPG ratio. Ann Biomed Eng. 2009;37(4):794-802.

90. Kim CH, You L, Yellowley CE, Jacobs CR. Oscillatory fluid flow-induced shear stress decreases osteoclastogenesis through RANKL and OPG signaling. Bone. 2006;39(5):1043-7.

91. Tan SD, de Vries TJ, Kuijpers-Jagtman AM, Semeins CM, Everts V, Klein-Nulend J. Osteocytes subjected to fluid flow inhibit osteoclast formation and bone resorption. Bone. 2007;41(5):745-51.

92. You L, Temiyasathit S, Lee P, Kim CH, Tummala P, Yao W, et al. Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading. Bone. 2008;42(1):172-9.

93. Klein-Nulend J, Semeins CM, Ajubi NE, Nijweide PJ, Burger EH. Pulsating fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts--correlation with prostaglandin upregulation. Biochem Biophys Res Commun. 1995;217(2):640-8.

94. Klein-Nulend J, van der Plas A, Semeins CM, Ajubi NE, Frangos JA, Nijweide PJ, et al. Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. Faseb J. 1995;9(5):441-5.

95. Bakker A, Klein-Nulend J, Burger E. Shear stress inhibits while disuse promotes osteocyte apoptosis. Biochem Biophys Res Commun. 2004;320(4):1163-8.

96. Uzer G, Pongkitwitoon S, Ian C, Thompson WR, Rubin J, Chan ME, et al. Gap junctional communication in osteocytes is amplified by low intensity vibrations in vitro. PLoS One. 2014;9(3):e90840.

97. Lau E, Al-Dujaili S, Guenther A, Liu D, Wang L, You L. Effect of low-magnitude, high-frequency vibration on osteocytes in the regulation of osteoclasts. Bone. 2010;46(6):1508-15.

98. Musumeci G, Loreto C, Leonardi R, Castorina S, Giunta S, Carnazza ML, et al. The effects of physical activity on apoptosis and lubricin expression in articular cartilage in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis. J Bone Miner Metab. 2013;31(3):274-84.

99. Tan SD, Kuijpers-Jagtman AM, Semeins CM, Bronckers AL, Maltha JC, Von den Hoff JW, et al. Fluid shear stress inhibits TNFalpha-induced osteocyte apoptosis. J Dent Res. 2006;85(10):905-9.

100. Haendeler J, Weiland U, Zeiher AM, Dimmeler S. Effects of redox-related congeners of NO on apoptosis and caspase-3 activity. Nitric Oxide. 1997;1(4):282-93.

101. Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. J Exp Med. 1997;185(4):601-7.

102. Sasso GR, Florencio-Silva R, Santos MA, Teixeira Cde P, Simoes Mde J, Katchburian E, et al. Effects of early and late treatments of low-intensity, high-frequency mechanical vibration on bone parameters in rats. Gynecol Endocrinol. 2015;31(12):980-6.

103. Kulkarni RN, Voglewede PA, Liu D. Mechanical vibration inhibits osteoclast formation by reducing DC-STAMP receptor expression in osteoclast precursor cells. Bone. 2013;57(2):493-8.

104. Wu SH, Zhong ZM, Chen JT. Low-magnitude high-frequency vibration inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells. Int J Med Sci. 2012;9(9):801-7.

105. Suzuki N. Effect of vibration on osteoblastic and osteoclastic activities: Analysis of bone metabolism using goldfish scale as a model for bone. Advances in Space Research. 2007;40:1711-21.

106. Wu XT, Sun LW, Qi HY, Shi H, Fan YB. The bio-response of osteocytes and its regulation on osteoblasts under vibration. Cell Biol Int. 2016;40(4):397-406.

107. Yadav S, Dobie T, Assefnia A, Gupta H, Kalajzic Z, Nanda R. Effect of low-frequency mechanical vibration on orthodontic tooth movement. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2015;148(3):440-9.

108. Gnyubkin V, Guignandon A, Laroche N, Vanden-Bossche A, Malaval L, Vico L. High-acceleration whole body vibration stimulates cortical bone accrual and increases bone mineral content in growing mice. J Biomech. 2016;49(9):1899-908.

109. Jiang YY, Park JK, Yoon HH, Choi H, Kim CW, Seo YK. Enhancing proliferation and ECM expression of human ACL fibroblasts by sonic vibration. Prep Biochem Biotechnol. 2015;45(5):476-90.

110. Gaston J, Quinchia Rios B, Bartlett R, Berchtold C, Thibeault SL. The response of vocal fold fibroblasts and mesenchymal stromal cells to vibration. PLoS One. 2012;7(2):e30965.

111. Naveh GR, Brumfeld V, Shahar R, Weiner S. Tooth periodontal ligament: Direct 3D microCT visualization of the collagen network and how the network changes when the tooth is loaded. J Struct Biol. 2013;181(2):108-15.

112. Li X, Zhang L, Wang N, Feng X, Bi L. Periodontal ligament remodeling and alveolar bone resorption during orthodontic tooth movement in rats with diabetes. Diabetes Technol Ther. 2010;12(1):65-73.

113. Miles P, Smith H, Weyant R, Rinchuse DJ. The effects of a vibrational appliance on tooth movement and patient discomfort: a prospective randomised clinical trial. Aust Orthod J. 2012;28(2):213-8.

114. Yadav S, Dobie T, Assefnia A, Kalajzic Z, Nanda R. The effect of mechanical vibration on orthodontically induced root resorption. Angle Orthod. 2016;86(5):740-5.

11. ŽIVOTOPIS

Žana Kalajzić rođena je 3. svibnja 1970. godine u Splitu gdje je završila osnovnu i srednju školu. 1998. godine je diplomirala na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu i započela znanstveno-istraživačko usavršavanje na postdoktorskoj stipendiji u laboratoriju dr.Davida Rowea, University of Connecticut Health Center, Department of Genetics and Developmental Biology. Za to vrijeme dobila je nekoliko znanstvenih nagrada od kojih su najvažnije Michael Geissman Osteogenesis Imperfecta Fellowship Award i American Society of Bone and Mineral Research Young Investigator Award.

Nakon kraće pauze, 2008. godine priključila se radu na Department of Craniofacial Sciences, Division of Orthodontics, University of Connecticut Health Center gdje je pod vodstvom mentora dr.Sunila Wadhwe i dr.Flavia Uribea izvela sva istraživanja svojeg doktorskog rada.

U kolovozu 2015. godine dobila je fakultetsko zvanje asistenta (Instructor in Basic Sciences) , za potrebe nastave iz predmeta Oralne Histologije i Fiziologije, Opće Histologije i Opće Patologije studentima stomatologije, School of Dental Medicine, Univerity of Connecticut.

Sudjelovala je na više znanstvenih skupova unutar SAD gdje je prezentirala znanstvene abstrakte te je objavila ukupno 30 radova citirana u Current Contents-u.