

UNIVERZITET U BEOGRADU

STOMATOLOŠKI FAKULTET

Marko R. Pejović

UTICAJ STRUKTURE I VELIČINE  
GRANULA RAZLIČITIH KOŠTANIH  
ZAMENIKA NA NEOANGIOGENEZU PRI  
REGENERACIJI KOSTI

Doktorska disertacija

Beograd 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF DENTAL MEDICINE

Marko R. Pejović

EFFECT OF STRUCTURE AND SIZE OF  
DIFFERENT BONE SUBSTITUTE  
PARTICLES ON NEOANGIOGENESIS  
DURING BONE REGENERATION

Doctoral dissertation

Belgrade 2016.

**Mentor:**

**prof. dr Snježana Čolić**

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,  
Klinika za oralnu hirurgiju

**Članovi komisije:**

**prof. dr Ljiljana Stojčev Stajčić**

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,  
Klinika za oralnu hirurgiju

**prof. dr Zoran Aleksić**

Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,  
Klinika za parodontologiju i oralnu medicinu

**prof. dr Jelena Sopta**

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet,  
Institut za Patologiju

**prof. dr Jugoslav Vasić**

Univerzitet u Beogradu, fakultet veterinarske medicine,  
Katedra za hirurgiju, ortopediju i oftalmologiju

**dr sc. med. Petar Milenković**

Institut za onkologiju i radiologiju Srbije  
Laboratorija za antropologiju, Institut za anatomiju

Datum odbrane \_\_\_\_\_

## UTICAJ STRUKTURE I VELIČINE GRANULA RAZLIČITIH KOŠTANIH ZAMENIKA NA NEOANGIOGENEZU PRI REGENERACIJI KOSTI

Angiogeneza je proces koji prostorno i vremenski prethodi osteogenezi i neophodna je za odvijanje kako intramembranozne tako i enhondralne osifikacije. Shodno tome, regeneracija kosti ne može biti postignuta bez adekvatne revaskularizacije. Pored morfologije i strukture koštanog defekta, zarastanje kosti i revaskularizacija koštanog defekta zavise i od izbora koštanog zamenika. Za uspešno zarastanje i integraciju grafta neophodno je ispuniti dva preduslova: prorastanje krvnih sudova iz zidova koštanog defekta, i blizak kontakt između površine koštanog zamenika i vaskularizovanog tkiva.

Cilj doktorske disertacije bio je ispitati da li različita veličina i struktura granula koštanih zamenika ima uticaj na neoangiogenezu a samim tim i na stvaranje nove kosti.

Kontrolisano eksperimentalno istraživanje sprovedeno je na animalnom modelu kunića. Istraživanje je obuhvatilo deset novozelandskih belih kunića. S obe strane svoda lobanje formirana su po dva defekta kritične veličine promera 8mm koji su bili ispunjeni granulama koštanog zamenika. Ispitivani materijali su komercijalno dostupni u dve veličine i obuhvatali su sledeće: deproteinizovani goveđi mineral u formi sitnih granula (Bio-Oss 250-1000 $\mu$ m, Geistlich AG, Switzerland), deproteinizovani goveđi mineral u formi krupnih granula (Bio-Oss 1000-2000 $\mu$ m, Geistlich AG, Switzerland), deantigenizovanu kost konjskog porekla u formi sitnih granula (Osteoxenon 500-1000 $\mu$ m, Bioteck, Italy) i deantigenizovanu kost konjskog porekla u formi krupnih granula (Osteoxenon 2000-3000 $\mu$ m, Bioteck, Italy). Životinje su bile žrtvovane nakon 4 i nakon 8 nedelja, a uzorci tkiva su obrađeni za patohistološku analizu. Karakteristike neoangiogeneze analizirane su histološkim, histoheimijskim i imunohistoheimijskim metodama. Pored toga, mikroCT analiza korišćena je za procenu morfoloških karakteristika i razlika između ispitivanih koštanih zamenika.

Rezultati istraživanja pokazali su morfološku osnovu intenzivnije neoangiogeneze u slučaju primene krupnih granula, bez obzira na poreklo ispitivanog ksenografta. Kada su u pitanju krupne granule, gustina vaskularne mreže nakon 8 nedelja zarastanja bila je veća u defektima ispunjenim Osteoxenonom u odnosu na Bio-Oss. Međutim, kada je reč o sitnim granulama, nakon 8 nedelja zarastanja gustina vaskularne mreže bila je veća u defektima ispunjenim partikulama Bio-Ossa u odnosu na defekte ispunjene Osteoxenonom. Veću gustinu vaskularne mreže pratila je intenzivnija produkcija koštanog tkiva. Pored toga, rezultati istraživanja pokazuju da i Bio-Oss i Osteoxenon imaju sposobnost da indukuju stvaranje džinovskih ćelija tipa oko stranog tela, bez obzira na veličinu granula. Najveći broj džinovskih ćelija tipa oko stranog tela zabeležen je u defektima ispunjenim sitnim granulama Osteoxenona. Postojala je tendencija smanjenja broja ovih ćelija između 4. i 8. nedelje zarastanja.

Istraživanje je pokazalo da krupne granule obezbeđuju više prostora za prorastanje novih krvnih sudova a samim tim i za fomiranje nove kosti. Tendencija smanjenja broja džinovskih ćelija tipa oko stranog tela ili njihovo sporadično prisustvo mogu ukazivati na postignut „imunološki ekvilibrijum” i uspešnu integraciju oba ispitivana biomaterijala. U skladu sa dobijenim rezultatima, čini se da kolagen unutar mineralne strukture Osteoxenona ne utiče na angiogenezu i osteogenezu.

Ključne reči: neoangiogeneza, koštani defekt, veličina granula, poroznost, kolagen

**Naučna oblast:** stomatološke nauke

**Uža naučna oblast:** koštana regeneracija

**UDK broj:** 616.314-089-003.93(043.3)

## **EFFECT OF STRUCTURE AND SIZE OF DIFFERENT BONE SUBSTITUTE PARTICLES ON NEOANGIOGENESIS DURING BONE REGENERATION**

Angiogenesis spatially and temporally precedes osteogenesis and it is required for both ossification processes, intramembranous and enchondral. Consequently, bone regeneration could not be achieved without adequate bone defect revascularisation. In addition to morphology and bone defect structure, bone healing and revascularisation are also influenced by choice of bone substitute. It is necessary to complete two preconditions for successful graft healing and integration and they are: blood vessels ingrowth from surrounding bone walls into defect and close contact between bone substitute surface and vascularized tissue.

The main objective of the doctoral dissertation was to evaluate whether size and structure of the bone substitute particles have an effect on neoangiogenesis and therefore on a new bone formation.

The control experimental study was carried out on rabbit animal model. The study included ten New Zealand rabbits. On both sides of cranial vault two 8mm-diameter defects were formed and filled with bone substitute particles. The tested materials are commercially available in two dimensions and contained the following deproteinized bovine bone minerals in the form of small particles (Bio-Oss 250-1000 $\mu$ m, Geistlich AG, Switzerland), deproteinized bovine bone minerals in the form of large particles (Bio-Oss 1000-2000 $\mu$ m, Geistlich AG, Switzerland), deantigenated equine-derived bone in the form of small particles (Osteoxenon 500-1000 $\mu$ m, Bioteck, Italy) and deantigenated equine-derived bone in the form of large particles (Osteoxenon 2000-3000 $\mu$ m, Bioteck, Italy). After 4 and 8 weeks the animals were sacrificed and tissue samples were prepared for pathohistological analysis. The neoangiogenesis characteristics were analyzed using histological, histochemical and immunohistochemical methods. Besides, microCT analyse was used to reckon morphological features as well as differences among all examined bone substitutes.

The research results showed morphological basis for more intense neoangiogenesis in case of large particles used, regardless the type of xenograft origin. When the word is about large particles, the value of microvessel density after 8 weeks of healing was higher in defects filled with Osteoxenon particles than Bio-Oss ones. Regarding to small particles the opposite results were found. After 8 weeks of healing more intense neoangiogenesis was found in defect filled with Bio-Oss small particles. The rate of defect revascularisation was followed by appropriate new bone formation. Furthermore, results indicated that Bio-Oss and Osteoxenon have potential to induce foreign body giant cells formation regardless the particles' size. The greatest number of foreign body giant cells was found in defect filled with Osteoxenon small particles. There was decreasing tendency in number of foreign body giant cells of between 4 and 8 weeks.

The research has shown that large particles provide more space for vascular ingrowth and therefore more new bone formation. Decreasing tendency of foreign body giant cells number or their scattered presence could point to achieve immunological equilibrium and successful osseointegration in both examined biomaterials. In accordance with our results it does not seem that collagen inside the mineral structure of Osteoxenon particles have an effect on angiogenesis and osteogenesis as well.

Key words: neoangiogenesis, bone defects, particle size, porosity, collagen

**Scientific field:** Dentistry

**Scientific field specialized:** bone regeneration

**UDC:** 616.314-089-003.93(043.3)

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. PREGLED LITERATURE .....	2
2.1. KOŠTANO ZARASTANJE.....	2
2.2. KOŠTANI ZAMENICI.....	4
2.2.1. Autologni koštani zamenci .....	5
2.2.2. Alogeni koštani zamenci .....	6
2.2.3. Ksenogeni koštani zamenci .....	7
2.2.3.1. Ksenogeni koštani zamenci životinjskog porekla.....	7
2.2.3.2. Ksenogeni koštani zamenci koralnog porekla .....	9
2.2.4. Aloplastični materijali .....	9
2.3. ANGIOGENEZA.....	10
2.3.1. Pojam i definicija angiogeneze.....	10
2.3.2. Proces formiranja novih kapilara – angiogeneza.....	11
2.3.2.1. Pupljenje iz prethodno formiranih kapilara .....	11
2.3.2.2. Formiranje de novo krvnih sudova inkorporacijom endotelnih prekursorskih ćelija koje potiču iz kostne srži .....	12
2.3.2.3. Inkorporiranje cirkulišućih monocita koji se transformišu u endotelne ćelije ...	12
2.4. UTICAJ ANGIOGENEZE NA OSTEOGENEZU.....	13
2.4.1. Angiogeneza u augmentiranim koštanim defektima .....	14
2.4.1.1. Uticaj poroznosti na neoangiogenezu.....	15
2.4.1.2. Uticaj kolagena na osteogenezu i angiogenezu .....	17
2.4.1.3. Uticaj veličine granula na osteogenezu i neoangiogenezu.....	17
3. RADNA HIPOTEZA .....	19
4. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	20
5. MATERIJAL I METOD .....	21
5.1. MIKROCT ANALIZA.....	21
5.2. <i>IN VIVO</i> ISTRAŽIVANJE NA ANIMALNOM MODELU KUNIĆA.....	24
5.2.1. Animalni model i dizajn istraživanja.....	24
5.2.2. Hirurška procedura .....	25
5.2.3. Žrtvovanje eksperimentalnih životinja i priprema tkiva.....	29
5.2.4. Obrada tkiva za patohistološku analizu .....	29
5.2.4.1. Histološko ocenjivanje .....	30



5.2.4.2. Imunohistohemijske metode.....	31
5.3. Statistička analiza.....	33
6. REZULTATI.....	34
6.1. MikroCT analiza .....	34
6.2. Histološke karakteristike i histomorfometrijska analiza.....	42
6.2.1. Stepen neoangiogeneze .....	42
6.2.2. Stepen fibroplazije.....	49
6.2.3. Stvaranje koštanog tkiva.....	52
6.2.4. Određivanje broja džinovskih ćelija tipa oko stranog tela.....	58
6.2.5. Karakteristike endotela.....	63
6.2.6. Intenzitet zapaljenja.....	67
6.2.7. Intenzitet mikrokrvarenja .....	70
7. DISKUSIJA.....	73
8. ZAKLJUČCI.....	87
9. LITERATURA.....	88

## 1. UVOD

Terapija koštanih defekata maksilofacijalne regije predstavlja izazov savremene regenerativne hirurgije ne samo u funkcionalnom već i u estetskom smislu. Iako su autologni koštani graftovi „zlatni standard” u koštanoj hirurgiji, njihovu primenu prati čitav niz nedostataka. Sa idejom da se prevaziđu nedostaci koje za sobom nosi primena autologne kosti, na tržištu se pojavljuju različiti koštani zamenici. Međutim, primena koštanog zamenika ne znači i bezuslovno uspešnu koštanu regeneraciju. Zarastanje i integracija koštanog grafta prvenstveno je determinisana stepenom njegove revaskularizacije. Shodno tome, struktura i morfološke karakteristike koštanog zamenika trebale bi da budu što sličnije humanoj kosti kako bi omogućile optimalnu revaskularizaciju i regeneraciju koštanog defekta.

Predmet ovog istraživanja bio je ispitivanje stepena neoangiogeneze kod komercijalno dostupnih koštanih zamenika ksenogenog porekla. Poznato je da fizičke i hemijske karakteristike definišu ponašanje biomaterijala u *in vivo* uslovima. Poroznost grafta je jedna od ključnih karakteristika koja utiče na prorastanje krvnih sudova i na integraciju koštanog zamenika. Pored toga, aktiviranje imunog odgovora i pojava džinovskih ćelija tipa oko stranog tela takođe mogu imati uticaj na *in vivo* ponašanje biomaterijala.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. KOŠTANO ZARASTANJE

Zarastanje koštanog tkiva tj. premoščavanje oštećenog dela koštanog tkiva do potpunog uspostavljanja anatomskog i funkcionalnog integriteta kosti odvija se na tri načina (1) i to kao:

1. primarno koštano zarastanje
2. sekundarno koštano zarastanje
3. zarastanje koštanih defekata ("gap osseous healing")

**Primarno koštano zarastanje**, odnosno zarastanje bez sledstvenog formiranja kalusa, odvija se jako retko i u posebnim uslovima tj. uz pomoć kompresivne osteosinteze, čime je omogućen apsolutni kontakt između koštanih fragmenata koji su u stanju potpunog mirovanja (2). Kod ovog vida koštanog zarastanja osteoklasti resorbuju kost obostrano u regiji kompresije, šireći frakturnu liniju 50-80 $\mu$ m dnevno. Kada pukotina dostigne širinu od oko 200 $\mu$ m formiran je prostor za urastanje krvnih sudova, proliferaciju osteoblasta i formiranje nove kosti (3).

**Sekundarno koštano zarastanje** karakteriše zarastanje bez primene kompresivne osteosinteze i najčešći je vid zarastanja u kliničkoj praksi. U toku sekundarnog zarastanja koštano tkivo prolazi put ponovljene, fiziološke fetalne osteogeneze, uključujući intramembranoznu i enhondralnu osifikaciju (4). U toku nastanka koštanog preloma, kao i tokom pomeranja prelomljenih fragmenata, dolazi do povrede krvnih sudova i mekih tkiva u i oko kosti (periost, endost, mišići...) što za rezultat ima krvarenje i formiranje hematoma u predelu frakturne pukotine, subperiostalno i u neposrednoj okolini preloma. Pošto krvni ugrušak deluje kao hemostatski čep, dolazi do zatvaranja oštećenih krvnih sudova i prestanka krvarenja. U toku prvih 24-48h po prestanku krvarenja nastaje aseptično zapaljenje koje dovodi do hiperemije okolnog tkiva, izlaska tečnosti i ćelijske migracije (neutrofili i makrofagi). Takođe, dolazi do deponovanja fibrina na periferiji hematoma ali i između krajeva kosti što predstavlja osnovu za proliferaciju granulacionog tkiva. Hipoksično oštećeno tkivo, kao i reaktivna acidoza, predstavljaju stimulus za polimorfonuklearne leukocite i makrofage (5).

Aktivirani makrofagi odstranjuju nekrotični detritus a aktivirani osteoklasti uklanjaju frakturane nekrotične ivice što dovodi do proširenja frakturane pukotine. Dalje u toku zarastanja dolazi do proliferacije krvnih sudova i migracije fibroblasta u hematoma i regiju frakturane pukotine. Istovremeno migriraju i nediferentovane mezenhimalne ćelije poreklom iz kostne srži i kambijalnog sloja periosta koje proliferišu i diferenciraju se u aktivne hondroblaste i osteoblaste (6). Oni sada talože ekstracelularni matriks formirajući na taj način kalus ("bridging callus") čiji centralni deo čine zone hrskavičavog tkiva dok osteoblasti stvaraju zone koštanog tkiva u vidu mostova između koštanih fragmenata. Stvoreni hondrociti hipertrofišu i podležu ćelijskoj apoptozi ostavljajući prazne lakune u kalcifikovanom matriksu. Ovi prazni prostori (lakune) omogućavaju vaskularno prorastanje koje dovodi do povećanja parcijalnog pritiska kiseonika i normalizacije pH što stvara uslove za diferencijaciju osteoprogenitornih ćelija u osteoblaste. Osteoklasti uklanjaju hrskavičavo tkivo dok osteoblasti talože nezrelu kost koja kasnije biva zamenjena zreloom, lamelarnom kosti. Za oko 30 dana od nastanka frakture i korteks i medula su obnovljeni, iako se remodelovanje završava u periodu od četiri meseca do jedne godine.

**Zarastanje koštanih defekata** – koštani defekti u regiji gornje i donje vilice mogu nastati kao posledica paradontitisa, kongenitalnog nedostatka zuba, resorptivnih promena nakon gubitka zuba, hirurškog uklanjanja tumora i cista ili kao posledica traume. Za razliku od fraktura, koštani defekti su manje podložni kako mehaničkom opterećenju tako i uslovima otežanog vaskularnog snabdevanja. U pogledu morfoloških karakteristika razlikujemo defekte sa pet, četiri, tri, dva i jednim koštanim zidom. Formiranje nove kosti uglavnom zavisi od površine eksponiranog koštanog tkiva i kostno-sržnih prostora koji predstavljaju izvor angiogenih i osteogenih ćelija odgovornih za formiranje kosti u regiji defekta (7). Shodno tome, što je veći broj koštanih zidova koji učestvuju u izgradnji koštanog defekta to je potencijal zarastanja bolji. Na potencijal zarastanja defekta utiče i struktura kosti. Ako su zidovi defekta sačinjeni prevashodno od kortikalne kosti preporučuje se formiranje manjih perforacija čime se otvaraju kostno-sržni prostori i stimuliše krvarenje u regiju defekta što doprinosi poboljšanju potencijala zarastanja (8, 9). Pored morfologije i strukture, na zarastanje defekta utiče i izbor koštanog zamenika kojim defekt biva popunjen. Koštani

zamenici su prvobitno korišćeni da spreče kolaps barijerne membrane u regiju defekta (10, 11). Međutim, ustanovljeno je da različitim karakteristikama oni mogu uticati na stvaranje nove kosti u okviru defekta (12).

Zarastanje koštanog defekta uz primenu koštanih zamenika praćeno je sledećim mehanizmima:

**1. Osteogeneza** – u osnovi zahteva prisustvo osteogenih ćelija koje su odgovorne za formiranje nove kosti. Kada je reč o graftu sa osteogenim potencijalom, on u sebi ima inkorporirane osteoprogenitorne ćelije koje su sposobne da prežive proceduru implantacije/transplantacije, mogu da migriraju i da se diferenciraju u pravcu osteoblasta (13). Ovakvi graftovi ne zahtevaju prisustvo osteogenog okruženja da bi formirali koštano tkivo.

**2. Osteoindukcija** – zapravo jeste stimulisana osteogeneza i podrazumeva formiranje nove kosti od strane osteoprogenitornih ćelija nastalih diferencijacijom nediferentovanih mezenhimalnih ćelija pod uticajem osteoinduktivnih faktora koji su inkorporirani u koštanom matriksu (14, 15). Kada se osteoinduktivni materijal postavi subkutano ili intramuskularno u potpunom odsustvu kosti indukuje stvaranje ektopičnog koštanog tkiva (16, 17).

**3. Osteokondukcija** – odlikuje se stvaranjem nove kosti na površini ili kroz sam graft urastanjem kapilara i osteoprogenitornih ćelija iz primajućeg ležišta. Stoga graft služi kao potka, skelet ("skafold") za formiranje nove kosti (18). Za razliku od osteoindukcije ovaj proces se odvija isključivo u osteogenom okruženju.

Osteogeneza, osteoindukcija i osteokondukcija su tri mehanizma koji za rezultat imaju oseointegraciju materijala tj. formiranje direktne funkcionalne i strukturne veze između organizovane, žive kosti i površine implantiranog materijala bez formiranja sloja fibroznog tkiva (19).

## 2.2. KOŠTANI ZAMENICI

Koštani zamenici bi trebali da ispune nekoliko uloga u procesu koštane regeneracije (20):

- da pružaju potporu barijernoj membrani i spreče njen kolaps
- da imaju ulogu potke kroz koju prorasta novoformirana kost

- da stimulišu prorastanje kosti iz primajuće regije
- da mehanički spreče prekomeran pritisak koji okolno meko tkivo vrši na augmentacionu regiju
- da zaštite volumen grafta od resorpcije

Koštani zamenici se prema poreklu dele na:

1. autologne: dobijaju se od iste biološke vrste iste genetske konstitucije
2. alogene: dobijaju se od iste biološke vrste ali različite genetske konstitucije
3. ksenogene: dobijaju se od druge biološke vrste
4. aloplastične materijale: materijali sintetskog porekla

#### 2.2.1. Autologni koštani zamenici

Predstavljaju jedine koštane zamenike koji poseduju osteogene, osteoinduktivne i osteokonduktivne karakteristike (21). Hidroksiapatit i kolagen imaju ulogu osteokonduktivne matrice, stromalne ćelije koje okružuju mikroprostore poseduju osteogeni potencijal, a faktori rasta unutar koštanog matriksa indukuju produkciju nove kosti. Upravo ove karakteristike čine da se autologni koštani transplantat smatra zlatnim standardom u koštanoj hirurgiji naročito kod rekonstrukcije velikih koštanih defekata. Uz to, njihovom primenom eliminisana je svaka mogućnost imunološke reakcije.

Generalno, razlikuju se dve forme slobodnih koštanih autotransplantata: kortikalni i spongiozni. Burhart (Bucharadt) navodi tri ključne razlike između ova dva tipa transplantata. Za razliku od kortikalnih, spongiozni graftovi se revaskularizuju mnogo brže i u potpunosti. Puzajuća supstitucija (creeping substitution) kod spongioznog grafta počinje apozicijom nove kosti koju prati resorpcija dok je kod kortikalnih transplantata taj proces obrnut. Poret toga, spongiozni graftovi teže u potpunosti da se remodeluju dok kortikalni predstavljaju kombinaciju nekrotične i vitalne kosti (18). Uzimajući sve navedeno u obzir može se zaključiti da se suštinska razlika između ove dve vrste autotransplantata ogleda u procesu revaskularizacije. Prekursori osteoblasta su poreklom iz krvi pa neoangiogeneza određuje i početak inkorporiranja grafta u okolnu kost. Krvni sudovi urastaju u spongiozni transplantat već nakon dva dana od transplantacije što za posledicu ima minimalnu nekrozu transplantirane kosti i ubrzavanje procesa supstitucije grafta novim koštanim tkivom (22, 23). U slučaju

kompaktne kosti revaskularizacija započinje oko šest dana nakon transplantacije (24) i praćena je ekstenzivnijom resorpcijom unutar Haverzovih i Volkmanovih kanala. Kortikospongiozni graftovi čine spoj pozitivnih karakteristika oba tipa grafta ističući s jedne strane dobru mehaničku stabilnost kortikalne kosti a s druge strane brzu revaskularizaciju spongiozne kosti.

Granulirana forma autologne kosti u odnosu na blok graft pokazuje veći osteoinduktivni i osteokonduktivni potencijal zbog mnogo veće površine grafta odakle se oslobađaju faktori rasta (25). Iako broj osteogenih ćelija drastično opada mehaničkom manipulacijom graftom, granulirani autologni graftovi imaju daleko bolji osteogeni potencijal u odnosu na blok graftove. Takođe, eksperimentalna istraživanja ukazuju da granulirani autograft ima značajno veći osteogeni potencijal u odnosu na bilo koji komercijalno dostupan koštani zamenik (12, 26).

Pored prednosti, autologni koštani graftovi imaju i nedostatke kao što su postojanje sekundarnog hirurškog polja, opasnost od povrede neurovaskularnih elemenata i poremećaja zarastanja sekundarnog polja, nepredvidiva stopa resorpcije, ograničena količina dostupnog grafta i produženo trajanje hirurške intervencije. U cilju prevazilaženja ovih nedostataka koriste se drugi koštani zamenici kao i njihova kombinacija s autolognom kosti čime se smanjuje potrebna količina autolognog grafta.

### 2.2.2. Alogeni koštani zamenici

Kada su u pitanju humani alograftovi, oni se najčešće dobijaju od kadavera i tada su dostupni preko banaka tkiva. U koštanoj regeneraciji se uglavnom koriste dve forme:

- zamrznuti sušeni koštani alotransplantat (freeze-dried bone – FDB) i
- demineralizovani zamrznuti sušeni koštani alotransplantat (demineralized freeze dried bone – DFDB).

Dostupni su u formi bloka ili granula koje mogu poticati od spongiozne ili od kortikalne kosti. Proces dobijanja FDB podrazumeva očuvanje i neorganske i organske komponente koštanog matriksa. Organska komponenta u čiji sastav ulazi i koštani morfogogenetski protein (BMP) se nalazi u hidroksiapatitnoj strukturi što iziskuje aktivnost osteoklasta kako bi došlo do oslobađanja faktora rasta. Ako se uz ovo uzme u obzir i prisustvo jako male količine faktora rasta u graftu može se zaključiti da FDB ima prevashodno osteokonduktivna svojstva dok su osteoinduktivna neznatna (27).

Demineralizacijom FDB dobija se DFDB. Na ovaj način, uklanjanjem mineralne komponente BMP biva brže eksponiran i dostupan ispoljavajući trenutni osteoinduktivni potencijal (28, 29). Međutim, procesom demineralizacije DFDB gubi na mehaničkim karakteristikama i na osteokonduktivnosti. Pokazano je da različite serije DFDB sadrže koncentraciju BMP koja može značajno varirati pa se može očekivati da je i osteoinduktivni potencijal ovog alografa varijabilan (30). Buser i sar. (12) su u eksperimentalnoj studiji pokazali da alograft usporava stvaranje nove kosti u poređenju s autolognim graftom. Zabeležene su osteokonduktivne karakteristike DFDB, dok se efekat mogućeg osteoinduktivnog potencijala nije mogao dokazati. Stoga, iako FDB i DFDB nesumnjivo sadrže osteoinduktivne molekule (31) još uvek je pitanje da li su te koncentracije dovoljne da ispolje klinički značajan osteoinduktivni potencijal.

### 2.2.3. Ksenogeni koštani zamenici

Ksenogeni koštani zamenici sačinjeni su od koštanih minerala životinjskog porekla ili od minerala koji vode poreklo od kalcifikovanih koralala ili algi kod kojih je organska komponenta uklonjena kako bi se eliminisao rizik od imunološke reakcije i od transmisije raznih oboljenja.

#### 2.2.3.1. Ksenogeni koštani zamenici životinjskog porekla

Ovi koštani zamenici mogu biti porekla različitih životinjskih vrsta kao što su goveda, svinje, konji, rakovi. Međutim, materijal koji se komercijalno najčešće koristi i koji iza sebe ima preko 700 publikacija jeste neorganska kost govedeg porekla pod nazivom Bio-Oss (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland). Kako se deorganifikacija materijala postiže izlaganjem niskim temperaturama (oko 300°C) i jakim bazama, mineralna komponenta u vidu poroznog hidroksiapatita ostaje nepromenjena. S obzirom na to da je reč o prirodnom materijalu, mineralna komponenta se formira na prethodno nastaloj kolageno-organskoj osnovi (32). Hemijski sastav Bio-Ossa je skoro identičan sastavu humanog koštanog minerala s ukupnom poroznošću od oko 75% koju čini bimodalna distribucija pora (33). Sistem međusobno povezanih makropora koje služe kao potka za osteogene ćelije unapređuje tako migraciju i fiksiranje ovih ćelija za površinu biomaterijala (34). Takođe, sistem makropora omogućava infiltraciju fibrovaskularnog tkiva i revaskularizaciju kroz implantacioni materijal (35). S druge strane, mikropore omogućavaju kapilarno dejstvo ovog



materijala. Na taj način, fluidi potpuno ispunjavaju biomaterijal za nekoliko sekundi. Zahvaljujući ovome Bio-Oss biva ispunjen krvlju pre nego što otpočne proces koagulacije. Krv se koaguliše unutar i oko biomaterijala što omogućava integraciju granule s granulacionim tkivom i sledstvenu oseintegraciju. Na taj način doprinosi se i boljoj osteokonduktivnosti materijala (36). Brzina ulaska fluida je pet puta veća u odnosu na sintetske materijale dok je količina usisane tečnosti i do tri puta veća (33). Povećanjem temperature na kojoj se obrađuje goveđa kost (oko 1000°C), što je slučaj sa drugim proizvođačima na tržištu, značajno se smanjuje kako poroznost tako i osteokonduktivnost materijala (37). Na temperaturama preko 1000°C dolazi do sinterovanja prirodnog hidroksiapatita, kada kristali apatita rastu a interkristalni prostori nestaju (38). Na taj način se smanjuju mikrohrapavost i poroznost materijala a raste kristalizacija.

Od velikog kliničkog značaja je i dugoročna stabilnost ovih materijala unutar humanog tkiva. U literaturi postoje kontroverze kada je u pitanju bioresorptivnost Bio-Ossa. Dok su jedni uočili znake resorpcije tj. prisustvo osteoklasta na površini granula, resorptivne lakune ili smanjenje ukupne frakcije goveđeg granulata unutar tkiva (39-41), drugi tvrde da je u pitanju najverovatnije neresorptivni materijal (42-44). Mordenfeld i sar. (45) su ukazali da se u uzorku nakon 11 godina na površini granula nalaze džinovske ćelije tipa stranog tela, pri čemu postoji potpuno odsustvo resorptivnih lakuna a frakcija goveđe kosti ostala nepromenjena. Zaključili su da ukoliko resorpcije i ima ona je neznatna. Resorpcija augmentacionog materijala nije neophodna da bi došlo do formiranja nove kosti (46). Orsini i sar. (47) su na transmisionoj elektronskoj mikroskopiji pokazali da i posle sedam godina dolazi do formiranja nove kosti u prisustvu Bio-Ossa.

Pored goveđeg, ksenogeni koštani transplantati mogu biti i konjskog porekla. Oni se izlažu enzimskom delovanju na niskoj temperaturi (oko 37°C) čime se vrši uklanjanje antigena dok kolagen tip I ostaje očuvan. Kako kolagen tip I aktivira ateziju i diferencijaciju osteoblasta i osteoklasta kao i oslobađanje faktora rasta (48), ovakav način obrade ima za cilj poboljšanje koštane regeneracije. Uz to, kolagen daje materijalu elastičnost čineći ga lakim za oblikovanje i prilagođavanje morfologiji defekta. U literaturi nema puno podataka o ponašanju ovog materijala kako u *in vitro* tako i u *in vivo* uslovima. Di Stefano i sar. (49) su među prvima objavili kliničku studiju ispitujući potencijal ksenogenog spongioznog koštanog blokapi augmentaciji

rezidualnog alveolarnog grebena. Pored biokompatibilnosti ovog materijala ustanovljen je prorastanje novoformiranih krvnih sudova kroz koštani blok kao i blizak kontakt površine koštanog zamenika i novoformirane kosti bez međusloja fibroznog tkiva. Ista grupa autora pokazala je da humani osteoklasti učestvuju u resorpciji ovog materijala što ukazuje na njegovo moguće uključivanje u proces remodelovanja nativne kosti (50). Naglašena bioresorptivnost spongioznog koštanog bloka konjskog porekla ustanovljena je i u eksperimentalnoj studiji na animalnom modelu psa (51). Reakcija koštanog tkiva na granuliranu formu konjske kosti ostaje predmet budućih istraživanja.

#### 2.2.3.2. Ksenogeni koštani zamenici koralnog porekla

Različite vrste koralna imaju kalcijum karbonatni skelet čija geometrija podseća na strukturu humane spongiozne kosti sa međusobno povezanim makroporama veličine od 200-600 $\mu$ m. U procesu obrade kalcijum karbonat se transformiše u hidroksiapatit, međutim iako je skoro identičan mineralnoj komponenti humane kosti osteokonduktivnost mu je značajno slabija u odnosu na druge koštane zamenike (12, 37). Danas se sve ređe koristi zbog učestalih kasnih komplikacija koje prate primenu ovih materijala.

#### 2.2.4. Aloplastični materijali

Koštani zamenici dobijeni sintetskim putem poseduju samo dve od četiri karakteristike idealnog koštanog transplantata: oseointegrativnost i osteokonduktivnost. Idealni aloplastični materijal trebalo bi da bude biokompatibilan, da pokazuje minimalnu fibroznu reakciju, da podleže procesu remodelovanja i da podržava stvaranje nove kosti. Sa mehaničkog aspekta ovi materijali bi trebalo da poseduju sličnu čvrstoću kao i kompaktna/spongiozna kost koju zamenjuju (52). U odnosu na hemijski sastav kategorisani su u tri grupe: kalcijum-fosfate, bioaktivno staklo i polimere (20). Pored hemijskog sastava na *in vivo* karakteristike ovih materijala utiču i veličina i oblik granula, veličina pora, međusobna povezanost pora, hrapavost površine što sve zajedno determiniše kliničke parametre kao što su stepen degradacije grafta, vaskularnu infiltraciju, ateziju osteokompetentnih ćelija za površinu biomaterijala i formiranje nove kosti. Iako se mnogo radi na formiranju optimalnog aloplastičnog materijala za sada još uvek ne postoji materijal koji bi odgovorio takvim zahtevima.

## 2.3. ANGIOGENEZA

Sposobnost oštećenog tkiva da se regeneriše i povrati svoju funkciju zahteva čitav niz međusobno povezanih celularnih i molekularnih procesa. S obzirom da je zarastanje rane praćeno povećanim metaboličkim potrebama hranljive materije, inflamatorne ćelije, citokini, hemokini i matriksni molekuli moraju biti brzo i efikasno transportovani i raspoređeni kroz čitavu ranu. Upravo iz tog razloga angiogeneza predstavlja jedan od najfundamentalnijih fizioloških procesa (53, 54).

### 2.3.1. Pojam i definicija angiogeneze

Angiogeneza je proces koji podrazumeva formiranje novih krvnih sudova – kapilara od prethodno već postojećih (55). Hejl (Heil) i sar. (56) su proširili ovu definiciju i naveli da se angiogeneza definiše kao pupljenje novih kapilara pri čemu novonastalu kapilarnu mrežu čine vaskularni prostori sačinjeni samo od endotelnih ćelija. Dalje su pojedini autori ovoj 'klasičnoj' definiciji dodali i regrutovanje pericita koji obezbeđuju potporu novoformiranoj endotelijalnoj mreži (57). Ove klasične definicije su, uglavnom utemeljene na pretkliničkim istraživanjima s početka dvadesetog veka, sugerišući da se prefiks 'angio' odnosi na kapilare. Prateći ovakvu nomenklaturu, formiranje krvnih sudova većeg promera definisano je različitim pojmovima pa tako pojam arteriogeneze označava formiranje arterija većeg dijametra iz prethodno formiranih kapilara ili arteriovenskih anastomoza pri čemu je ovaj proces iniciran krvnom strujom, silama smicanja, širenjem krvnih sudova i njihovim remodelovanjem (56).

Nasuprot angiogenezi, vaskulogeneza označava *de novo* formiranje endotelnih ćelija koje nastaju diferentovanjem iz splanhopleuralnog mezoderma veoma rano tokom procesa embriogeneze (58-60). Proces vaskulogeneze otpočinje onog momenta kada embrion dostigne veličinu kod koje prosta difuzija više ne može da zadovolji nutritivne zahteve brzoproliferišućih ćelijskih populacija. U toku treće nedelje razvoja (gastrulacija), za dva do tri dana, embrion se transformiše iz avaskularnog organizma u onaj u kome praktično svako tkivo sadrži krvne sudove (53).

Termin „neovaskularizacija” ili „neoangiogeneza” se koristi da ukaže na formiranje novih krvnih sudova u proliferišućem, povređenom ili ishemičnom tkivu kod adultnog organizma, bez obzira na veličinu krvnog suda; praktično, ovaj termin obuhvata sve procese formiranja novih krvnih sudova – angiogenezu, arteriogenezu i verovatno

adultnu vaskulogenezu (61). Kovačić i sar. su predložili uvođenje pojma „kapilogeneza” koji bi označavao univerzalno formiranje kapilara, i tokom razvoja i u adultnom periodu, bez obzira na mehanizam njihovog formiranja ili na ćelije koje učestvuju u njemu (62). Međutim, kako i sami autori smatraju, pojam „angiogeneze” je toliko utemeljen u literaturi da bilo koja nova terminologija teško može da bude prihvaćena a da pritom ne ukazuje na neki novi mehanizam formiranja krvnih sudova.

### 2.3.2. Proces formiranja novih kapilara – angiogeneza

Novi kapilari mogu nastati na tri načina:

1. pupljenjem iz prethodno već formiranih kapilara
2. formiranjem *de novo* krvnih sudova inkorporacijom endotelnih prekursorskih ćelija kojepotiču iz kostne srži (54, 63, 64)
3. inkorporiranjem cirkulišućih monocita koji se transdiferentuju u endotelne ćelije (65)

#### 2.3.2.1. Pupljenje iz prethodno formiranih kapilara

Kada je unutar tkiva neophodno da dođe do formiranja novog krvnog suda, pojačana je lokalna produkcija angiogenih faktora rasta koji iniciraju aktivnost endotelnih ćelija (najčešće postkapilarnih i mišićnih venula) i produkciju matriks metaloproteinaza koje učestvuju u razgradnji bazalne membrane i ekstracelularnog matriksa. Privučene angiogenim signalima, pojedine endotelne ćelije postaju pokretne pružajući filopodije. Ovako aktivirane endotelne ćelije podležu promenama u vidu ekspresije pojedinih adhezivnih molekula, pokazuju reorganizaciju citoskeletnih elemenata i eksprimiraju površinske ćelijske molekule kao što su integrini, selektini i komponente ekstracelularnog matriksa. Ove tzv. 'tip cells' formiraju vodeći front za novi krvni sud koji će se tek formirati, dok se ćelije koje idu za njima označavaju kao 'stalk cells'. Aktivnost matriks metaloproteinaza, dalje, pojačava angiogeni odgovor oslobađajući proangiogene faktore koji su uskladišteni u samom ekstracelularnom matriksu. Vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF) je ključni angiogeni faktor koji stimuliše formiranje 'tip' ćelija i stvaranje filipodija. Filipodije na 'tip' ćelijama se usmeravaju ka regiji sa pojačanom koncentracijom angiogenih faktora, vodeći tako pupoljke u stromu tkiva. Zahvaljujući velikom proliferativnom kapacitetu i sposobnosti da stabilizuju

noviformirani krvni sud, 'stalk' ćelije učestvuju u formiranju vaskularnih kanala. Noviformirani krvni sud nastaje spajanjem dve susedne 'tip' ćelije. Ovako formirana veza se u daljem procesu stabilizuje taloženjem ekstracelularnog matriksa, regrutovanjem pericita, smanjenjem proliferacije endotelnih ćelija i formiranjem međućelijskih spojeva. Pored maturacije endotela dolazi i do remodelovanja kako bi se postigla rigidnost krvnog suda koja je u skladu sa potrebama tkiva u kojem se krvni sud nalazi.

#### 2.3.2.2. Formiranje de novo krvnih sudova inkorporacijom endotelnih prekursorskih ćelija koje potiču iz kostne srži

Endotelna progenitorna ćelija (EPC) je ćelija koja je odgovorna isključivo za formiranja endotelnih ćelija (54) pa je samim tim uključena u proces angiogeneze (tj. kapilogeneze) kao i u obnavljanje već postojećeg endotela. Ove ćelije bivaju regrutovane na mesto aktivne angiogeneze gde se diferenciraju u zrele endotelne ćelije (54). Iako se nekada smatralo da se ovakav sled događaja odvija samo tokom embrionalnog razvoja, danas se zna da EPC igraju ulogu i u adultnom angiogenom odgovoru iako je „adultna vaskulogeneza” još uvek predmet spornih polemika (66). EPC sekretuju brojne proangiogene medijatore pa stoga mogu igrati ključnu ulogu u podsticanju angiogeneze stimulišući endotelnu proliferaciju i migraciju (67).

Suh i sar. su pokazali da se aplikovanjem EPC u ranu ubrzava zarastanje podsticanjem priliva makrofaga (68). Površinskim aplikovanjem VEGF na ranu kod dijabetičnih miševa delimično se ubrzava zarastanje mobilisanjem EPCa u predeo rane (69). Do koje mere u potpunosti EPCe inkorporirane u vaskularnu mrežu doprinose adultnom neovaskularnom odgovoru ostaje još uvek nedefinisano.

#### 2.3.2.3. Inkorporiranje cirkulišućih monocita koji se transformišu u endotelne ćelije

Urbrih (Urbrih) i sar. (70) i Rehman i sar. (71) su među prvima koji su ukazali na značaj monocita/makrofaga kao mogućih endotelijalnih prekursorskih ćelija. Njihove tvrdnje su kasnije potvrdili Kim i sar. (65) ukazujući da ćelije koje učestvuju u izgradnji noviformiranih krvnih sudova pokazuju ekspresiju F4/80, koji je dobro poznat makrofagni faktor. Ovim istraživanjem je pokazano da su glavni ćelijski tipovi koji naseljavaju mesto aktivne angiogeneze upravo cirkulišući monociti.

Makrofagi utiču na angiogenezu na nekoliko načina. Oni omogućavaju pupljenje kapilara, regrutovanje EPĆa, grananje novih krvnih sudova kao i njihovo remodelovanje (72). Kako nivo kiseonika u tkivu opada makrofagi luče endotelijalni mitogen i VEGF kao i brojne citokine i hemokine koji direktno stimulišu proliferaciju endotelnih ćelija i njihovu migraciju (72-74). Oni takođe proizvode metalmatrksproteinaze koje omogućavaju prolazak novih krvnih sudova kroz međucelijski matriks. Pored toga, makrofagi mogu da regrutuju druge ćelije kao što su fibroblasti i keratinociti koje učestvuju u produkciji medijatora angiogeneze (74).

Suprotno ovome, tokom faze regresije kada nakon regeneracije dolazi do povlačenja kapilara makrofagi takođe igraju značajnu ulogu. Oni proizvode brojne materije koje inhibiraju proliferaciju endotelnih ćelija (75, 76). Zbog svega navedenog, makrofagi se smatraju centralnim regulatorima angiogeneze (53).

#### 2.4. UTICAJ ANGIOGENEZE NA OSTEOGENEZU

Angiogeneza je proces koji i prostorno i vremenski prethodi osteogenezi (77). Proces angiogeneze je neophodan za odvijanje kako intramembranozne tako i enhondralne osifikacije (78). Kod intramembranog formiranja koštanog tkiva, nediferentovane mezenhimalne ćelije putem mreže kapilara bivaju transportovane i diferentovane u zrele osteoblaste koji stvaraju koštani matriks i dovode do stvaranja koštanog tkiva. S druge strane, tokom enhondralne osifikacije hondrociti sekretuju angiogene faktore rasta inicirajući tako prorastanje krvnih sudova koji sa sobom nose veliki broj ćelija koje učestvuju u zameni hrskavičavog tkiva koštanim tkivom i kostnom srži (79). Pored toga, krvni sudovi odnosno endotelne ćelije učestvuju u produkciji faktora rasta koji kontrolišu odabir, proliferaciju, diferencijaciju i funkciju različitih ćelija među kojima su osteoblasti i osteoklasti (80). Dakle, formiranje koštanog tkiva je u bliskoj vezi sa prorastanjem krvnih sudova (81). Vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF) se smatra glavnom sponom koja blisko povezuje proces angiogeneze i osteogeneze (77). Pored toga što povećava mikrovaskularnu propustljivost, stimuliše proliferaciju endotelnih ćelija, indukuje ekspresiju proteolitičkih enzima (82) i privlači endotelne ćelije (83) on utiče direktno i indirektno na osteoprogenitorne ćelije. Kako VEGF indukuje stvaranje vaskularne mreže on na taj način omogućava i transport nediferentovanih mezenhimalnih ćelija do koštanog defekta gde će se one diferentovati

u osteoblaste. Uz to, angiokrinim mehanizmom VEGF stimuliše endotelne ćelije da produkuju osteogene citokine koji utiču na diferencijaciju osteoprogenitornih ćelija u osteoblaste (84). Takođe, VEGF može direktno da utiče na funkciju osteoblasta regulišući njihovu hemotaksu, proliferaciju i diferencijaciju (85, 86).

#### 2.4.1. Angiogeneza u augmentiranim koštanim defektima

Procedure augmentacije koštanog tkiva ne znače i bezuslovno uspešnu koštanu regeneraciju. Zarastanje i integracija koštanog grafta prvenstveno je determinisana stepenom njegove revaskularizacije (87). Shodno tome, da bi došlo do uspešne regeneracije koštanog defekta ispunjenog koštanim zamenikom neophodna su dva preduslova:

- prorastanje krvnih sudova iz primajuće regije u regiju koštanog defekta (88)
- blizak kontakt površine implantiranog materijala i vaskularizovanog tkiva (89).

Kako je rast fibroznog tkiva mnogo brži u odnosu na stvaranje nezrele kosti i iznosi oko 0.5-1mm/dan, dok se vlaknasta kost stvara oko 50µm/dan evidentno je da će fibrozno tkivo ispuniti većinu koštanog defekta. Da bi se sprečio prodor fibroblasta unutar koštanog defekta primenjuju se tehnike vođene regeneracije kosti čija je suština postavljanje različitih barijernih membrana preko koštanog defekta. Na ovaj način stvaraju se uslovi koji omogućavaju angiogenim i osteogenim ćelijama iz okolnog koštanog tkiva da proliferišu u prostor ispod barijerne membrane što daje mogućnost koštanom tkivu da ispolji neometan regenerativni potencijal (90). Važno je naglasiti da samo krvni sudovi poreklom iz kostne srži mogu dopremiti osteoprogenitorne ćelije pa tako krvni sudovi koji potiču iz zidova koštanog defekta dopremaju nediferentovane mezenhimalne ćelije koje će se diferentovati u osteoblaste, monocite koji će da formiraju osteoklaste dok krvni sudovi poreklom iz mekog tkiva, u slučaju primene kolagenih resorptivnih membrana, mogu diferencijacijom pericita u osteoblaste uticati, znatno manjim delom, na formiranje koštanog tkiva neposredno ispod barijerne membrane (91). Pored toga što se fibrozno tkivo brže formira i kompetitivno popunjava koštani defekt, prisustvo fibroblasta može kompromitovati osteogenezu i posredstvom kontaktne inhibicije (92).

Koštano tkivo je visokovaskularizovano tkivo. Kod dobro razvijene vaskularne mreže, zahvaljujući snabdevanju hranljivim materijama i kiseonikom, omogućena je produkcija

osteoida od strane osteoblasta, njihova diferencijacija u osteocite i stvaranje vitalne kosti (93). Da bi imali dovoljno kiseonika i da bi preživeli, osteoblasti ne bi smeli biti udaljeni više od 150-200 $\mu$ m od kapilarnog lumena (94). Neefikasan transport kiseonika, hranljivih materija i metabolita, koji u osnovi ima neadekvatnu perfuziju tkiva, dovodi do nekroze osteoblasta (95). Stoga, za uspešno zarastanje i regeneraciju nije dovoljno samo prisustvo već i razvijenost mikrovaskularne mreže. Pošto tkiva koja zarastaju imaju visok metabolički potencijal neophodno je i prisustvo guste kapilarne mreže u toku procesa zarastanja (96).

#### 2.4.1.1. Uticaj poroznosti na neoangiogenezu

Koštani supstituenti koji imaju ulogu osteokonduktivnog matriksa treba da omoguće bržu i efikasnu revaskularizaciju regenerišuće regije odgovarajućom geometrijom koja omogućava urastanje krvnih sudova u unutrašnjost strukture koštanog zamenika. Poroznost grafta je jedna od ključnih karakteristika koja utiče na integraciju koštanog zamenika. Poroznost se definiše kao procenat praznog prostora unutar čvrstog materijala i predstavlja morfološku karakteristiku koja ne zavisi od vrste materijala (97). Veličina i oblik pora trebalo bi da budu što sličniji onima u humanoj kosti. Veličina pora mora da bude takva da obezbedi difuziju kiseonika i drugih hranljivih materija i u slučaju trabekularne kosti ona iznosi od 200-400 $\mu$ m, dok normalna kortikalna kost sadrži pore veličine od 1-100 $\mu$ m (98). Adekvatnom veličinom pora dobija se i optimalna površina dostupna za fiksiranje ćelija. Ako su pore isuviše male, mogu inhibirati ćelijsku migraciju i dovesti do nekroze ćelija (99). Međutim, ako su isuviše velike smanjuje se ukupna površina za koju ćelije treba da budu fiksirane (100). Uz to, i strukturni integritet grafta je kompromitovan (101). Iako u literaturi postoje oprečni podaci koji se odnose na optimalnu veličinu makropora koštanih zamenika, smatra se da se ona kreće u intervalu od 100-500 $\mu$ m (102). Zapravo, rast krvnih sudova će biti mnogo izraženiji kroz potku čije su pore veće od 250 $\mu$ m u odnosu na skafold sa manjom veličinom pora. Veći stepen poroznosti i veličina pora rezultiraju ekstenzivnijom osteogenezom i adekvatnom revaskularizacijom (103) što se može objasniti postojanjem maksimalnog prostora za vaskularno prorastanje, migraciju ćelija i apoziciju nove kosti (104). Međutim, postoji optimalan limit u okviru koga makropora



ispunjava svoju funkciju. Eksperimentalno je pokazano da ne postoji razlika u stepenu revaskularizacije ukoliko se dimenzija pora povećava iznad 400 $\mu$ m (105).

Međusobna povezanost pora je još jedna od karakteristika za koju se utvrdilo da je mnogo važnija od same veličine pora. Bai i sar. su pokazali da postoji značajno povećanje broja i veličine novoformiranih krvnih sudova u slučaju prisustva međusobno povezanih makropora (105).

Između humane kosti i goveđeg koštanog minerala (Bio-Oss) postoji velika topografska sličnost. Ona je rezultat niske temperature na kojoj se postiže uklanjanje organskog dela koštanog matriksa što za posledicu ima kompletno očuvanje poroznog sistema. Takođe, svi ostali biomaterijali životinjskog porekla koji u procesu obrade nisu podvrgnuti temperaturama sinterovanja (preko 1000°C) u manjoj ili većoj meri zadržavaju prvobitnu strukturu. Bio-Oss, kao i humana kost, ima bimodalnu distribuciju pora. Makropore (pore >1 $\mu$ m) obezbeđuju dovoljno prostora za ćelijsku adherenciju i formiranje nove kosti. Razvijen sistem međusobno povezanih makropora omogućava da granula bude prožeta fluidom što stvara uslove da ćelije krvi, osteoblasti, osteoklasti i proteini uđu unutar granule biomaterijala. Na ovaj način se stvaraju uslovi koji podstiču i omogućavaju efikasnu oseintegraciju materijala (106). Uz to, ovakvom strukturom biomaterijala podstiče se vaskularizacija i migracija ćelija iz primajuće regije (107). Međusobno povezane makropore maksimalno povećavaju potencijal revaskularizacije grafta koji bi u suprotnom bio kompromitovan (104). Pored makropora, unutar granule postoji sistem mikropora (<1 $\mu$ m). One su odgovorne za kapilarno dejstvo i brz ulazak fluida unutar materijala. Na taj način dolazi do brzog i kompletnog kvašenja površine materijala (108), vezivanja i skladištenja proteina i faktora rasta (109), koagulacije krvi unutar poroznog sistema i stvaranja uslova za *de novo* stvaranje kosti (110). Kao i Bio-Oss, i Osteoxenon, ksenogeni koštani zamenik konjskog porekla, ima očuvanu strukturu poroznog sistema s obzirom na činjenicu da se u procesu obrade izlaže temperaturi od 37°C čime ne samo da se vrši očuvanje porozne strukture već se vrši i očuvanje kolagena unutar mineralne komponente.

#### 2.4.1.2. Uticaj kolagena na osteogenezu i angiogenezu

Kolagen tip I čini najveći deo organske komponente ekstracelularnog matriksa koštanog tkiva (90-95%) i predstavlja osnovu koja služi kao vodič za koordinisan raspored jona kalcijuma i fosfora formirajući tako kristale hidroksiapatita koji bivaju nataloženi unutar kolagene fibrilarne strukture. Upravo zbog svojih karakteristika i zastupljenosti u vitalnom tkivu kolagen predstavlja primamljiv biopolimer koji se može koristiti u regeneraciji koštanog tkiva. Egzogeni kolagen je biokompatibilan. Antigenost kolagena je zasnovana na prisustvu telopeptidnih krajeva koji su izvan heliksa molekula kolagena. Oni se uklanjaju enzimskom obradom čime se dobija atelokolagen koga karakteriše slaba antigenost i slaba imunogenost (111, 112). Kolagen učestvuje u stabilizaciji koaguluma stimulišući fiksiranje trombocita i povezivanje fibrinskih vlakana. Pored toga utiče na hemotaksu neutrofilnih granulocita kao i na hemotaksu fibroblasta periodontalnog ligamenta i gingive (113, 114). Posredstvom interakcije ćelija sa ekstracelularnim matriksom, kolagen tip I utiče na diferencijaciju osteoprogenitornih ćelija i funkciju osteoblasta (115). Pored toga što kolageni matriks sa jedne strane stvara pogodne uslove za proliferaciju i diferencijaciju osteorogenitornih ćelija, sa druge strane dovodi do inhibicije osteoklastogeneze (116). Kada je reč o neoangiogenezi, utvrđeno je da gustina i koncentracija kolagena utiču na brzinu rasta krvnih sudova (117). Ispoljavanje direktnog uticaja ne samo na osteogenezu već i na angiogenezu ukazuje da bi prisustvo kolagena unutar strukture koštanih zamenika moglo imati uticaja na regeneraciju koštanih defekata.

#### 2.4.1.3. Uticaj veličine granula na osteogenezu i neoangiogenezu

Iako u literaturi ne postoji ujednačen stav po pitanju optimalne veličine granula koštanog zamenika, idalje se smatra da veličina intergranularnih prostora utiče na prorastanje krvnih sudova i formiranje nove kosti kroz sam graft. Isuviše velike granule imaju smanjenu ukupnu površinu i sporije će se resorbovati, dok izrazito male granule karakteriše smanjen intergranularni prostor što može da kompromituje ćelijsku migraciju i prorastanje. Takođe, male granule indukuju izraženiju inflamaciju i brže podležu resorpciji tj. brže bivaju fagocitovane (118). Veličina trabekula može da varira od 20-100 $\mu$ m. Kada dostignu veličinu od 100 $\mu$ m one imaju sopstvene krvne sudove isto kao što i osteon ima vaskularni izvor koji prolazi kroz Haverzov kanal. Da bi bilo

omogućeno prorastanje nove kosti kroz trabekularnu strukturu neophodno je da pore budu minimum 40-100 $\mu$ m, dok formiranje osteona zahteva pore od najmanje 100 $\mu$ m (119). Stoga, veličina granule koja bi mogla da ispuni ove neophodne dimenzije iznosi oko 380 $\mu$ m (120). Međutim, do danas ove tvrdnje nisu histološki potvrđene.

Kada su u pitanju granule autologne kosti Kon i sar. (121) su na osnovu histološke i mikroCT analize pokazali da su velike granule (1.0-2.0mm) superiornije u odnosu na granule manje veličine (150-400 $\mu$ m) kada je u pitanju augmentacija većih defekata dok je proces osteogeneze efikasniji u slučaju malih granula. Kako je formiranje trabekula sporo u prostorima između velikih granula autori ukazuju da bi dodavanje sitnih granula autologne kosti poboljšalo proces osteogeneze. Suprotno ovim rezultatima, (Palsen) Palsen i sar. (122) su pokazali da granule autologne kosti od 0.5-2.0mm<sup>3</sup> daju značajno više novoformirane kosti u odnosu na izrazito velike granule (10mm<sup>3</sup>). S obzirom na to da autologna kost sadrži faktore rasta, smanjenjem veličine granula povećava se njihova ukupna površina a samim tim i površina sa koje se faktori rasta oslobađaju.

Kada su u pitanju objavljeni rezultati koji se odnose na veličinu granula isključivo osteokonduktivnih biomaterijala, u literaturi još uvek ne postoji jasan stav. Kluppel (Kluppel) i sar. (123) su pokazali da granule goveđeg koštanog minerala koje su bile manje od 450 $\mu$ m daju i kvantitativno i kvalitativno bolje koštano tkivo u odnosu na srednje (450-749 $\mu$ m) i velike granule (750-1000 $\mu$ m). Rezultati ovog istraživanja u skladu su sa rezultatima i nekoliko drugih autora (124, 125). Međutim, pojedini autori ukazuju da i velike i male granule (1-2mm i 0.25-1mm, po redosledu) imaju podjednak efekat na stvaranje novoformirane kosti (126, 127). Suprotno ovim rezultatima, Testori i sar. su u multicentričnoj, randomizovanoj, kontrolisanoj kliničkoj studiji pokazali da primena velikih granula (1-2mm) omogućava stvaranje značajno veće količine nove kosti unutar sinusne šupljine (128).

### **3. RADNA HIPOTEZA**

U okviru analize naučne problematike postavljena je radna hipoteza:

Primenom krupnih granula koštanog zamenika dobija se više prostora između samih granula pa se očekuje i veći broj krvnih sudova i sledstveno veća količina novoformirane kosti. Suprotno tome, primenom sitnih granula intergranularna poroznost opada čime se smanjuje prostor kako za prorastanje krvnih sudova tako i za novoformiranu kost.

Pored toga, prisustvo kolagena unutar strukture koštanog zamenika može imati podstičući uticaj na neoangiogenezu i istovremeno direktan uticaj na stvaranje nove kosti.

#### 4. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Za potrebe naučnog ispitivanja definisani su sledeći ciljevi istraživanja doktorske disertacije:

1. Ispitati da li postoji razlika u mikromorfološkim karakteristikama između granula primenjenih koštanih zamenika različite veličine i porekla.
2. Ispitati da li se primenom krupnih granula koštanog zamenika zbog povećane intergranularne poroznosti obezbeđuje prostor za urastanje većeg broja krvnih sudova i sledstveno veća količina novoformirane kosti.
3. Ispitati da li se primenom sitnih granula gde intergranularna poroznost opada smanjuje prostor kako za prorastanje krvnih sudova tako i za novoformiranu kost.
4. Ispitati da li prisustvo kolagena unutar strukture koštanog zamenika može delovati stimulatивно na neoangiogenezu i da li direktno utiče na stvaranje nove kosti.

## 5. MATERIJAL I METOD

### 5.1. MIKROCT ANALIZA

Sprovedena studija je obuhvatila dve vrste koštanih zamenika koji su bili komercijalno dostupni u dve veličine granula: granule Bio-Oss (Geistlich AG, Switzerland) i granule Osteoxenon (Bioteck, Italy). Uzorak za studiju je činila po jedna granula koja je nasumičnim metodom izabrana iz svakog pakovanja.

Samu analizu su činile dve procedure: skeniranje i evaluacija. Obe navedene procedure su vršene u Laboratoriji za antropologiju Instituta za anatomiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Uzorak je skeniran korišćenjem tehnologije mikrokompjuterizovane tomografije (SkyScan  $\mu$ CT 1172, Bruker, Belgija). Svaka odabrana granula je stabilno pričvršćena za namenski držač uzorka. Adekvatan odnos između uzorka i držača sprečava pomeranje uzorka i sledstveno stvaranje artefakata, a takođe obezbeđuje i konstantnu proksimalno-distalnu orijentaciju pri skeniranju. Akvizicija je vršena u uslovima suve sredine, a parametri skeniranja su bili podešeni na 34kV i 210 $\mu$ A sa korišćenjem aluminijumskog filtera debljine 0.5mm, veličinom piksela slike od 1.02 $\mu$ m, kamere najviše dostupne rezolucije od 4000x2664 piksela na svakom preseku, vrednosti ekspozicije od 3200ms, stepenom rotacije od 0.3°, uprosečavanjem frejmova (faktor 3), nasumičnim pokretima (vrednost 10), i rotacijom pri skeniranju od 180°. Približno, vreme svakog skeniranja je iznosilo 2 sata i 54 minuta.

Tehnike rekonstrukcije su vršene u SkyScan-ovom softveru NRecon verzije 1.6.9.8 sa korišćenjem InstaRecon pogona za rekonstrukciju verzije 2.0.2.5. Prvi korak ove tehnike činila je korekcija projekcionog pomeranja piksela kroz automatski protokol termalne korekcije. Zatim je postporavnanje podešeno na vrednost 3.5, a opcija za korekciju kružnih artefakata na 20 piksela. Korišćena je korekcija neravnomerne apsorpcije X zraka u vrednosti od 45%, kao i Gaussian-ovo smanjivanje zrnastosti slike sa radijusom od 2 voksela. Dinamički opseg za konverziju podataka u sliku je podešen putem poluautomatskog režima na histogramu, i iznosio je od nula do 0.298516.

Evaluacija skeniranih uzoraka je obavljena u 64-bitnom softveru CT-Analyser verzije 1.15.4.0+ koji je takođe razvio SkyScan. Inicijalnu tehniku je činila segmentacija slike, koja je izvršena u globalnom režimu sa poluautomatskim podešavanjem praga nijansi sive na donju granicu vrednosti 60 i gornju od 225. Zatim je usledilo automatsko uklanjanje svih tačaka koje ne pripadaju najvećem objektu posmatrano u 3D prostoru. Sledeći korak je obuhvatio kreiranje regiona od interesa (ROI) u 3D prostoru sa opcijom skupljanja i obmotavanja maske uz premošćavanje otvora pora dijametra do 500 $\mu$ m. Konačno, nakon ručno sprovedenih korekcija i upotrebe adaptivne interpolacije, svi regioni od interesa na presecima selektovane regije su integrisani u volumen od interesa (VOI). VOI se zapravo odnosi na onaj deo skeniranog volumena koji je bio morfometrijski analiziran i koji je korišćen za konstrukciju modela.

Evaluacija poroznosti i koštane mikroarhitekture vršena je automatski korišćenjem alata 3D morfometrije. Analize su obuhvatile sledeće parametre mikroarhitekture granula koštanih zamenika:

- **volumen tkiva** (TV,  $\mu\text{m}^3$ ) – ukupna zapremina ispitivanog tkiva tj. volumena od interesa,
- **volumen kosti** (BV,  $\mu\text{m}^3$ ) – ukupna zapremina kosti unutar VOI-a,
- **frakciju volumena kosti** (BV/TV, %) – predstavlja proporciju ukupne zapremine volumena od interesa koji je zauzet koštanim tkivom. Izračunava se kao odnos zapremine kosti (bez obuhvaćene okolne praznine) i ukupne zapremine volumena od interesa (obuhvata i kost i okolnu prazninu),
- **površinu kosti** (BS,  $\mu\text{m}^2$ ) – ukupna površina kosti (obuhvata i spoljašnju površinu kosti, a i površinu zatvorenih pora) unutar VOI-a,
- **odnos koštane površine i volumena** (BS/BV,  $\mu\text{m}^{-1}$ ) – predstavlja osnovni parametar koji oslikava kompleksnost strukture. Izračunava se kao odnos ukupne površine kosti prema ukupnoj zapremini kosti unutar VOI-a,
- **broj koštanih gredica** (Tb.N,  $1/\mu\text{m}$ ) – broj koštanih gredica po jedinici dužine nasumično odabrane linijske putanje unutar VOI-a,

- **debljinu koštanih gredica** ( $Tb.Th, \mu m$ ) – prosečna vrednost debljine koštanih gredica,
- **razdvojenost koštanih gredica** ( $Tb.Sp, \mu m$ ) – srednja vrednost udaljenosti između koštanih gredica; zapravo predstavlja srednju vrednost dijametara pora unutar VOI-a (obuhvata i otvorene i zatvorene pore),
- **distribuciju razdvojenosti koštanih gredica** – distribucija dijametara pora u već određenim intervalima vrednosti. Takođe, izračunava srednju vrednost dijametara, zapreminu obuhvaćenih pora, kao i procenat obuhvaćene zapremine pora u svakom intervalu,
- **broj zatvorenih pora** ( $Po.N_{(cl)}, \%$ ) – ukupan broj svih zatvorenih pora unutar VOI-a, tj. pora koje su u potpunosti oivičene sa kosti,
- **volumen zatvorenih pora** ( $Po.V_{(cl)}, \mu m^3$ ) – ukupna zapremina svih zatvorenih pora unutar VOI-a,
- **površinu zatvorenih pora** ( $Po.S_{(cl)}, \mu m^2$ ) – ukupna površina svih zatvorenih pora unutar VOI-a,
- **procenat zastupljenosti zatvorenih pora** ( $Po.P_{(cl)}, \%$ ) – zapremina svih zatvorenih pora predstavljena kao procenat ukupne zapremine svih pora unutar VOI-a,
- **zatvorenu poroznost** ( $Po_{(cl)}, \%$ ) – zapremina svih zatvorenih pora predstavljena kao procenat ukupne zapremine kosti zajedno sa zapreminom zatvorenih pora unutar VOI-a (na ovaj način se prikazuje poroznost materijala i izračunava se na drugačiji način u poređenju sa totalnom poroznošću i otvorenom poroznošću),
- **volumen otvorenih pora** ( $Po.V_{(op)}, \mu m^3$ ) – ukupna zapremina svih pora otvorenih ka spoljašnjem prostoru unutar VOI-a,
- **procenat zastupljenosti otvorenih pora** ( $Po.P_{(op)}, \%$ ) – zapremina svih otvorenih pora predstavljena kao procenat ukupne zapremine svih pora unutar VOI-a,



- **otvorenu poroznost** ( $Po_{(op)}$ , %) – zapremina svih otvorenih pora predstavljena kao procenat ukupne zapremine VOI-a,
- **broj pora** ( $Po.N_{(tot)}$ ) – ukupan broj pora unutar VOI-a (obuhvata i otvorene i zatvorene pore),
- **ukupan volumen pora** ( $Po.V_{(tot)}$ ,  $\mu m^3$ ) – ukupna zapremina svih pora unutar VOI-a (obuhvata i otvorene i zatvorene pore),
- **totalnu poroznost** ( $Po_{(tot)}$ , %) – zapremina svih pora predstavljena kao procenat ukupne zapremine VOI-a,
- **stepen anizotropije pora** (DA) – izotropija predstavlja meru 3D simetrije tj. prisustvo ili odsustvo prioriternih postrojavanja struktura duž određene, usmerene ose. U ovoj studiji, korišćena je kao pokazatelj usmerenosti pora, pri čemu su niže vrednosti ukazivale na izotropnu, a više na anizotropnu orijentaciju pora (129, 130),
- **Euler broj pora** ( $Po.EN$ ) – Euler-Poincare broj – originalno razvijen kao indikator povezanosti 3D kompleksnih struktura. Euler broj je karakteristika 3D strukture koja je topološki nepromenljiva (ne menja se usled inflacije ili kompresije ili uvrtanja). Služi za merenje tzv. redundantne (suvišne) konektivnosti – stepena do kojeg su različiti delovi jednog objekta višestruko povezani (131).
- **gustinu povezanosti pora** ( $Po.Conn.D$ ,  $1/\mu m^3$ ) – broj redundantnih (suvišnih) veza između pora po jedinici zapremine unutar VOI-a.

## 5.2. *IN VIVO* ISTRAŽIVANJE NA ANIMALNOM MODELU KUNIĆA

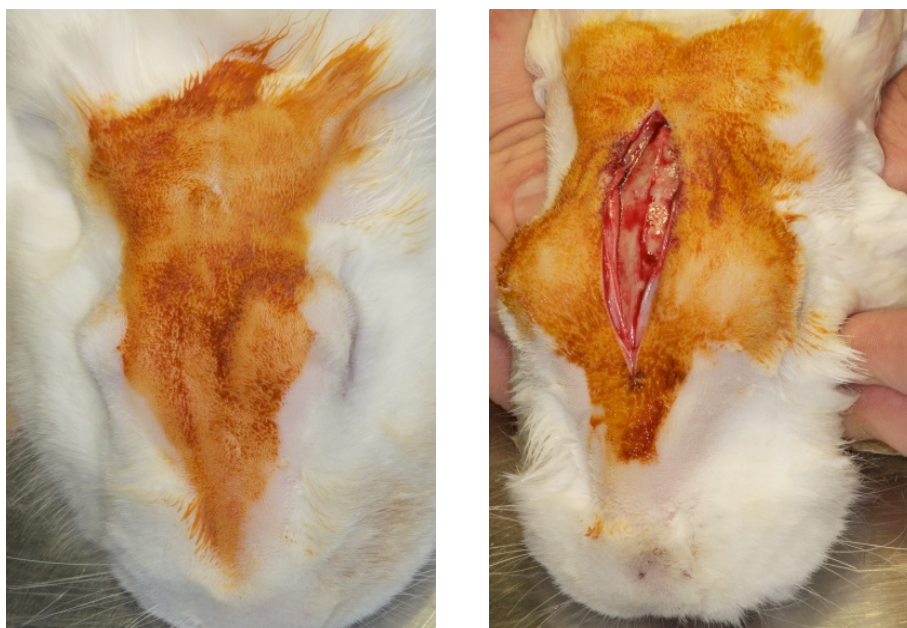
### 5.2.1. Animalni model i dizajn istraživanja

Istraživanje je sprovedeno na deset novozelandskih belih kunića, ženskog pola, starosti 6-9 meseci i telesne mase od 3.5-5.0 kg. Eksperimentalne životinje su uzgajane u vivarijumu za potrebe medicinskih istraživanja pod kontrolisanim laboratorijskim uslovima i u skladu s domaćim i međunarodnim standardima (ISO 10993-2:2006, Part 2: Animal welfare requirements, Vodič Nacionalnog instituta za zdravlje, za brigu i korišćenje laboratorijskih životinja). Eksperimentalno istraživanje je odobreno od strane

Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama Stomatološkog fakulteta u Beogradu (br.36/15 od 14.04.2014. godine i bilo je sprovedeno u saglasnosti sa principima Vodiča Nacionalnog Instituta za zdravlje, za brigu i korišćenje laboratorijskih životinja, kao i prema međunarodnim standardima ISO10993-2: zahtevi za dobrobit životinja. Životinje su smeštene i čuvane na Fakultetu Veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, svaka u posebnom kavezu sa kontrolisanom ishranom i dnevnom profesionalnom negom. Životinje su nasumično podeljene u dve grupe u cilju praćenja angiogeneze i osteogeneze unutar koštanog defekta nakon 4 i 8 nedelja zarastanja.

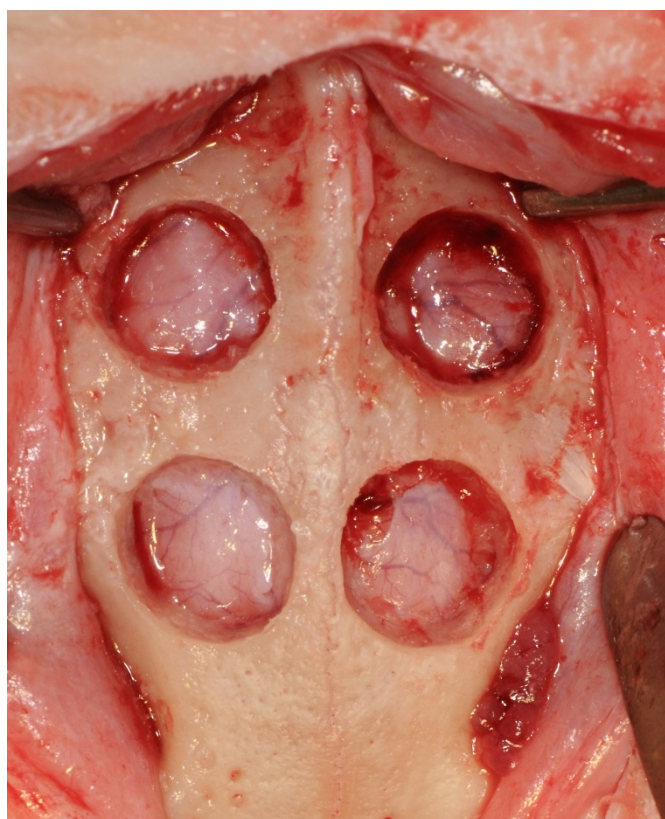
#### 5.2.2. Hirurška procedura

Hirurška intervencija obavljena je u opštoj anesteziji koja se sprovodi po protokolu za kuniće. Sastojala se iz premedikacije Ksilazinom (2% Xylazin, 5mg/kg telesne mase, Cp pharma, Bergdorf, Germany) intramuskularnom injekcijom, a posle toga intramuskularnom injekcijom Ketamina (Ketamin 500mg/ml, Laboratorio Sanderso S.A., Santiago, Chile) u dozi od 35mg/kg telesne mase, i Acepromazina (Acepromazine 50ml, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., St. Joseph, Mo 64506 U.s.a.) u dozi od 0,75mg/kg telesne mase. Dužina trajanja anestezije bila je prosečno oko 100 minuta.



Slika 5.2.2.1. Pripremljena koža glave i načinjena središnja incizija

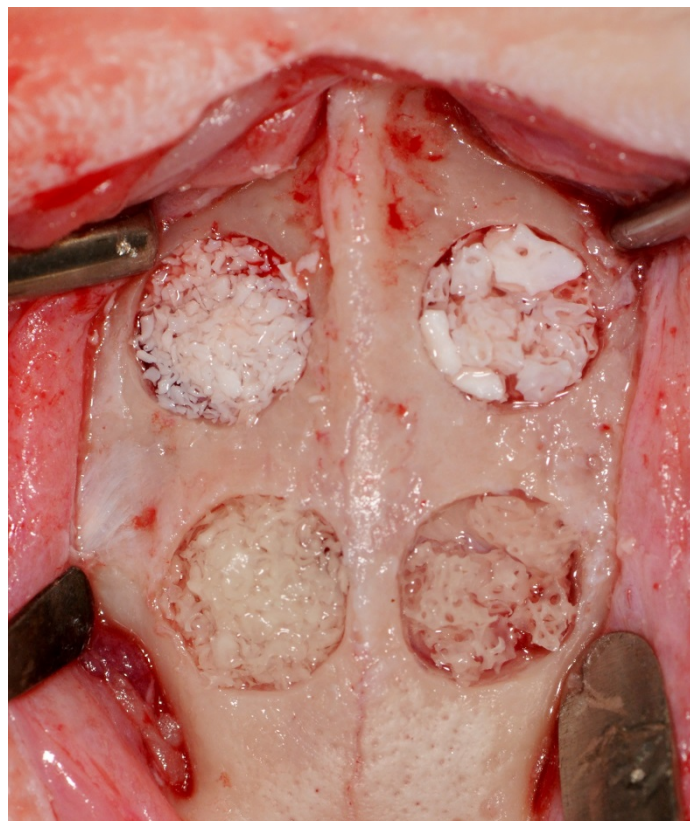
Hirurška procedura je sprovedena pod strogo aseptičkim uslovima. Koža glave zečeva obrijana je i dezinfikovana 10% rastvorom joda (Betadine, Medapharma), a potom je izvedena incizija po sredini lobanje koja se protezala od parijetalne kosti (Os parietale – Sutura coronalis) do čeone kosti (Os frontale – Incisura supraorbitalis caudalis) (slika 5.2.2.1). Musculus frontoscutularis i musculus frontalis preparisani su do parijetalne i čeone kosti. Koža i periost su pažljivo ispreparisani i podignuti da bi se otkrile parijetalne kosti. Sa obe strane kalvarije napravljena su po dva koštana defekta pune debljine prečnika 8 milimetara. Uz konstantno hlađenje fiziološkim rastvorom (Natrii Chloridi Infundibile, rastvor za infuziju, Zdravlje A.D.Leskovac) defekti su prvo bili markirani trepan borerom odgovarajućeg prečnika a zatim je koštano tkivo uklonjeno okruglim dijamantskim borerom uz najveći oprez kako se ne bi povredila tvrda moždanica (slika 5.2.2.2).



Slika 5.2.2.2. Formirani defekti kritične veličine ( $2r=8\text{mm}$ )

Postavljanje koštanih zamenika i randomizaciona šema bili su po principu modifikovanog Latin blok dizajna koji se bazira na rotacionoj dodeli materijala defektima čime se balansirano distribuira svaki materijal i u anteriornu i u posteriornu

regiju kalvarije (slika 5.2.2.3). U tabeli 5.2.2.1 prikazana je distribucija materijala prema randomizacionoj šemi.



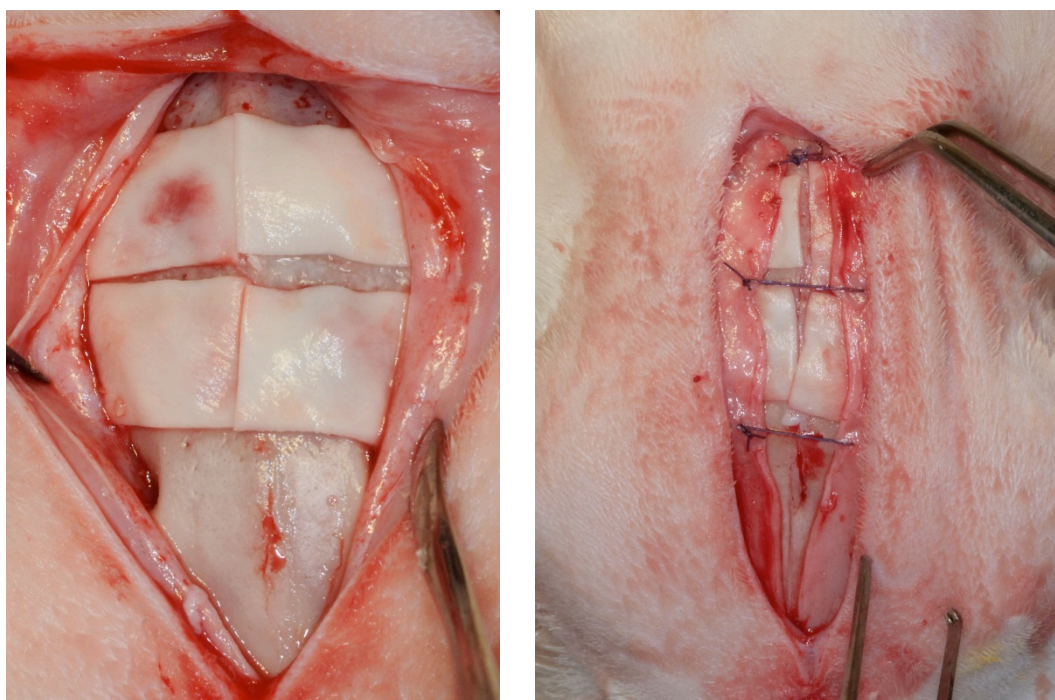
Slika 5.2.2.3. U defekte kritične veličine aplikovani ispitivani biomaterijali: gornji levi defekt – sitne granule Bio-Ossa, gornji desni defekt – krupne granule Bio-Ossa, donji levi defekt – sitne granule Osteoxenona, donji desni defekt – krupne granule Osteoxenona.

Tabela 5.2.2.1. Distribucija testiranih koštanih zamenika prema randomizacionoj šemi

Životinja	koštani defekt			
	I	II	III	IV
1	A	B	C	D
2	B	C	D	A
3	C	D	A	B
4	D	A	B	C
5	A	B	C	D

A – sitne granule goveđe kosti (Bio-Oss 250-1000 $\mu$ m, Geistlich AG, Switzerland)  
 B – krupne granule goveđe kosti (Bio-Oss 1000-2000 $\mu$ m, Geistlich AG, Switzerland)  
 C – krupne granule konjske kosti (Osteoxenon 2000-3000 $\mu$ m, Bioteck, Italy)  
 D – sitne granule konjske kosti (Osteoxenon 500-1000 $\mu$ m, Bioteck, Italy)

Randomizacija testiranih materijala izvršena je tako što su materijali postavljeni rotacionom tehnikom (u smeri kazaljke na satu, po prethodno navedenom modifikovanom Latin blok dizajnu). Nakon aplikovanja koštanih zamenika svi defekti su prekriveni neumreženom kolagenom membranom (Bio-Gide, Geistlich AG, Switzerland). Membrana je isečena tako da bude kvadratnog oblika stranice 10 milimetara tj. da stranice budu za 2 milimetra šire od ivica koštanog defekta. Nakon postavljanja membrana rana je ušivena po slojevima (slika 5.2.2.4). Prvo je ušiven periost horizontalnim madrac šavovima (Coated Vicryl 5-0, Ethicon) kako bi onemogućio pomeranje membrana, nakon čega je ušivena i koža kontinuiranim šavom (Coated Vicryl 4-0, Ethicon).



Slika 5.2.2.4. Preko augmentiranih defekata postavljena kolagena membrana. Periost ušiven resorptivnim koncem.

Postoperativno životinje su bile smeštene u individualnim kavezima gde su svakodnevno praćene. Primale su analgetike (Butrofanol 0,1 mg/kg s.c.) svakih 8 sati naredna tri dana i antibiotike (Amoksicilin sa klavulonskom kiselinom 125 mg/kg s.c.) jednom dnevno u narednih pet dana.

### 5.2.3. Žrtvovanje eksperimentalnih životinja i priprema tkiva

Posle perioda praćenja od 4 i 8 nedelja, životinje su nasumično žrtvovane intravenskom injekcijom od 10ml rastvora T61. Nakon toga ispreparisane su parijetalne kosti i potopljene u puferizovani 10% formalin.

### 5.2.4. Obrada tkiva za patohistološku analizu

Reprezentativni uzorci koštanog tkiva kalvarije koji su makroskopski odgovarali defektima pune debljine i kritične veličine, 8mm u prečniku, nakon hirurške intervencije fiksirani su u 10% formalinu. Svi uzorci su dekalcinisani u rastvoru za dekalcinaciju: 8%HCl iz 37% (v/v) koncentrata i 10% HCOOH iz 89% (v/v) koncentrata u PBS-u tokom približno 24h na 37°C. Nakon potpune dekalcinacije, procenjene subjektivnom metodom, iskustveno, uzorci su dehidrirani u alkoholu i ukalupljeni u parafinske kalupe. Iz parafinskih kalupa sečeni su serijski tkivni preseci (po četiri sa svakog uzorka) standardne debljine 5µm. Rutinski su preparati bojeni hematoksilin eozin (H&E) bojenjem. Od histohemijskih metoda primenjena su: trihromno bojenje po Massonu (Massons trichrome stain) i elastic Van Gieson.

Trihromno bojenje po Massonu izvedeno je u skladu s uputstvom proizvođača. Ono glasi:

1. preliti presek destilovanom vodom
2. na presek aplikovati 6 kapi Weigertovog gvožđe-hematoksilina (rastvor A) i 6 kapi Weigertovog gvožđe-hematoksilina (rastvor B); ostaviti 10 minuta
3. bez ispiranja isušiti pločice i na preseke aplikovati 10 kapi alkoholnog rastvora pikrinske kiseline i ostaviti da deluje 4 minuta
4. brzo isprati u destilovanoj vodi (3-4 sekunde) i aplikovati 10 kapi Malorijeovog hijalina i ostaviti da deluje 4 minuta
5. isprati u destilovanoj vodi i na presek aplikovati 10 kapi rastvora fosfomolibdenske kiseline i ostaviti da deluje 10 minuta
6. bez ispiranja isušiti pločicu i aplikovati 10 kapi Masson anilin plavog i ostaviti da deluje 5 minuta
7. isprati u destilovanoj vodi i brzo dehidrirati rastućim koncentracijama alkohola i ostaviti 1 minut u poslednjem u nizu apsolutnom etanolu. Očistiti u ksilenu.

Bojenje elastic van Gieson izvedeno je u skladu s uputstvom proizvođača. Ono glasi:

1. prelići presek destilovanom vodom
2. na presek aplikovati 10 kapi PAS (Periodic acid solution) ; ostaviti 5 minuta
3. isprati u destilovanoj vodi
4. sipati Weigertov rastvor u posudu, zatim staviti pločicu, pokriti teglu i inkubirati preko noći
5. isprati u destilovanoj vodi
6. na presek aplikovati 10 kapi pufera
7. isprati u destilovanoj vodi
8. na presek aplikovati 5 kapi Weigertovog gvožđe-hematoksilina (rastvor A) i 5 kapi Weigertovog gvožđe-hematoksilina (rastvor B); ostaviti 10 minuta
9. isprati u tekućoj vodi iz česme u trajanju od 10 minuta
10. na presek aplikovati 10 kapi Van Gieson pikrofuksina i ostaviti da deluje 7 minuta
11. isprati u destilovanoj vodi i brzo dehidrirati rastućim koncentracijama alkohola i ostaviti 1 minut u poslednjem u nizu apsolutnom etanolu. Očistiti u ksilenu.

Mikroskopski preparati su analizirani optičkom mikroskopijom uz primenu programa za morfometriju Software Cell-B by Olympus, mikroskop Olympus 5. Uz navedeni softver patohistološki parametri su analizirani kvalitativno i semikvantitativno i kvantitativno.

#### 5.2.4.1. Histološko ocenjivanje

**I** Optičkom mikroskopijom u bioptičkom materijalu kvantitativno uz analizu 'vrućih tačaka', koje podrazumevaju iskustveno najveći broj analiziranih parametara, ocenjivani su sledeći parametri:

1. broj krvnih sudova po  $\text{mm}^2$  ( $1\text{mm}^2$  odgovara 8 polja velikog uveličanja, 200x)
2. maksimalna širina vezivno tkivnih traka (u  $\mu\text{m}$ )
3. maksimalna širina koštanih gredica (u  $\mu\text{m}$ )
4. broj džinovskih ćelija tipa stranog tela po  $\text{mm}^2$  ( $1\text{mm}^2$  odgovara 8 polja velikog uveličanja, 200x)

**II** Optičkom mikroskopijom u bioptičkom materijalu deskriptivno su ocenjivani sledeći parametri:

1. struktura endotela (jasan u nizu, jasan sa pojedinačnim ćelijama, teško uočljiv u nizu, teško uočljiv sa pojedinačnim ćelijama)

2. ekstravazacija eritrocita – mikrokrvarenje (slabo – do 5 eritrocita, umereno 6-10, izraženo – više od 10)

3. zapaljenje (slabo do 5 neutrofila, umereno od 6-10, intenzivno više od 10)

#### 5.2.4.2. Imunohistohemijske metode

Imunohistohemijska obrada je obavljena u Laboratoriji za imunohistohemiju i histohemiju Instituta za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Imunohistohemijska tehnika u formalinu fiksiranih i u parafinu ukalupljenih uzoraka predstavlja višestepenu proceduru koja obuhvata sledeće postupke:

- deparafinizaciju,
- proteolitička digestiju
- blokiranje endogene peroksidaze
- imunohistohemijsko bojenje primenom streptavidin-biotin tehnike.

Preseci debljine 3-4 $\mu$ m, dobijeni sečenjem parafinskih kalupa sunakon sušenja od 16h na 56°C *deparafinisan*i po sledećoj proceduri:

I ksilol.....	5-7 minuta, ocediti
II ksilol.....	5-7 minuta, ocediti
100% alkohol.....	3 minuta, ocediti
100% alkohol.....	3 minuta, ocediti
96% alkohol.....	3 minuta, ocediti
96% alkohol.....	3 minuta, ocediti
destilovana/dejonizovana voda.....	30 sekundi

#### *Proteolitička digestija (demaskiranje antigena):*

Deparafinisan preseci su preneti u plastičnu kivetu sa oko 250ml radnog rastvora citratnog pufera (10mmol/L, pH 6.0) i kuvani su u mikrotalasnoj pećnici dva puta po 5 minuta na maksimalnoj temperaturi, a zatim su hladeni u citratnom puferu 30 minuta na sobnoj temperaturi. Na kraju su isprani destilovanom vodom dva puta po 30 sekundi.



*Blokiranje endogene peroksidaze:*

Preparati su potopljeni 5 minuta u 3% vodonik-peroksid (rastvoren u destilovanoj vodi), zatim isprani destilovanom vodom i preliveni fosfatnim puferom (PBS-phosphate-buffered saline, 0,02 mol/L, pH 7,0) tri puta po 2 minuta.

*Imunohistohemijsko bojenje primenom streptavidin-biotin tehnike*

Za imunohistohemijsko bojenje korišćen je komercijalni kit (Labelled streptavidin-biotin-LSAB+ metoda, DAKO, Danska). Bojenje se odvija po sledećoj proceduri, koja je navedena u instrukcijama proizvođača:

FAZA I (primarno antitelo razblaženo po upustvu proizvođača):

1. odliti višak pufera, obrisati pažljivo oko isečka,
2. pokriti isečak sa minimalnom količinom (20-30 $\mu$ l) primarnog antitela,
3. inkubacija 30 minuta na sobnoj temperaturi,
4. pažljivo isprati PBS iz špic-boce,
5. prelići svežim puferom.

FAZA II (biotinilizovano vezno antitelo):

1. odliti višak pufera, obrisati pažljivo oko isečka,
2. pokriti isečak sa minimalnom količinom (20-30 $\mu$ l) LINK antitela,
3. inkubacija 30 minuta
4. pažljivo isprati PBS iz špic-boce,
5. prelići svežim puferom.

FAZA III (streptavidin-peroksidaza):

1. odliti višak pufera, obrisati pažljivo oko isečka,
2. pokriti isečak sa minimalnom količinom (20-30 $\mu$ l) streptavidin-peroksidaze,
3. inkubacija 30 minuta
4. pažljivo isprati PBS iz špic-boce,
5. prelići svežim puferom.

FAZA IV (supstrat hromogen):

1. odliti višak pufera, obrisati pažljivo oko isečka,
2. pokriti isečak sa minimalnom količinom (20-30 $\mu$ l)

hromogenadiaminobenzidina (DAB),

3. inkubacija 10 minuta

4. ispiranje destilovanom vodom,

FAZA IV (kontrastiranje):

1. Mayer-ov hematoksin 5 do 10 minuta,

2. pažljivo isprati destilovanom vodom,

3. uroniti 10 puta u kivetu sa 0,037 mol/L amonijačne vode,

4. ispiranje destilovanom/dejonizovanom vodom 2 do 5 minuta.

Pokriti vodenim medijumom.

Imunohistohemijska procedura je korišćena za sledeća antitela, u odgovarajućim razblaženjima: CD31, CD34, FVIII, Trombomodulin.

Za svako primenjeno antitelo je bojena i spoljašnja pozitivna kontrola: CD31 i CD34 tkivo hemangioma, Trombomodulin i FVIII tkivo kože. Negativnakontrola je podrazumevala inkubaciju tkiva sa sekundarnim antitelima i hromogenima, bez primene primarnih antitela. Imunohistohemijsko bojenje je analizirano svetlosnom mikroskopijom na mikroskopu (Bx50F4, Olympus Optical, Japan). Citoplazmatska aktivnost aplikovanih antitela je opisivana kao pozitivna. Rezultati primenjenjene imunohistohemijske metode obrade tkiva su interpretirani kvalitativno, uz verifikaciju prisustva/odsustva citoplazmatske imunopozitivnosti.

### 5.3. Statistička analiza

Baza podataka je formirana u statističkom paketu SPSS 18.0 (IBM korporacija), gde je vršena dalja analiza prikupljenih podataka. Za analizu dobijenih podataka upotrebljene su deskriptivne statističke metode i metode za testiranje statističkih hipoteza. Od deskriptivnih metoda korišćeni su apsolutni i relativni brojevi za atributivna obeležja posmatranja i mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana) i mere disperzije (standardna devijacija, minimum i maksimum) za numerička obeležja posmatranja. Izbor testa za analizunumeričkih obeležja posmatranja zavisio je od prirode raspodele podataka koja je utvrđena Kolmogorov Smirnov testom. Za testiranje hipoteze o značajnosti razlike kod numeričkih obeležja posmatranja koristila se jednofaktorska analiza varijante nezavisnih grupa (One-Way ANOVA) i Tuckey HSD test za *Post hoc* analizu između grupa. Hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) test je korišćen za izačunavanje učestalosti pojavljivanja atributivnih obeležja posmatranja. Kriterijum za statističku značajnost je bio  $p < 0,05$ . Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

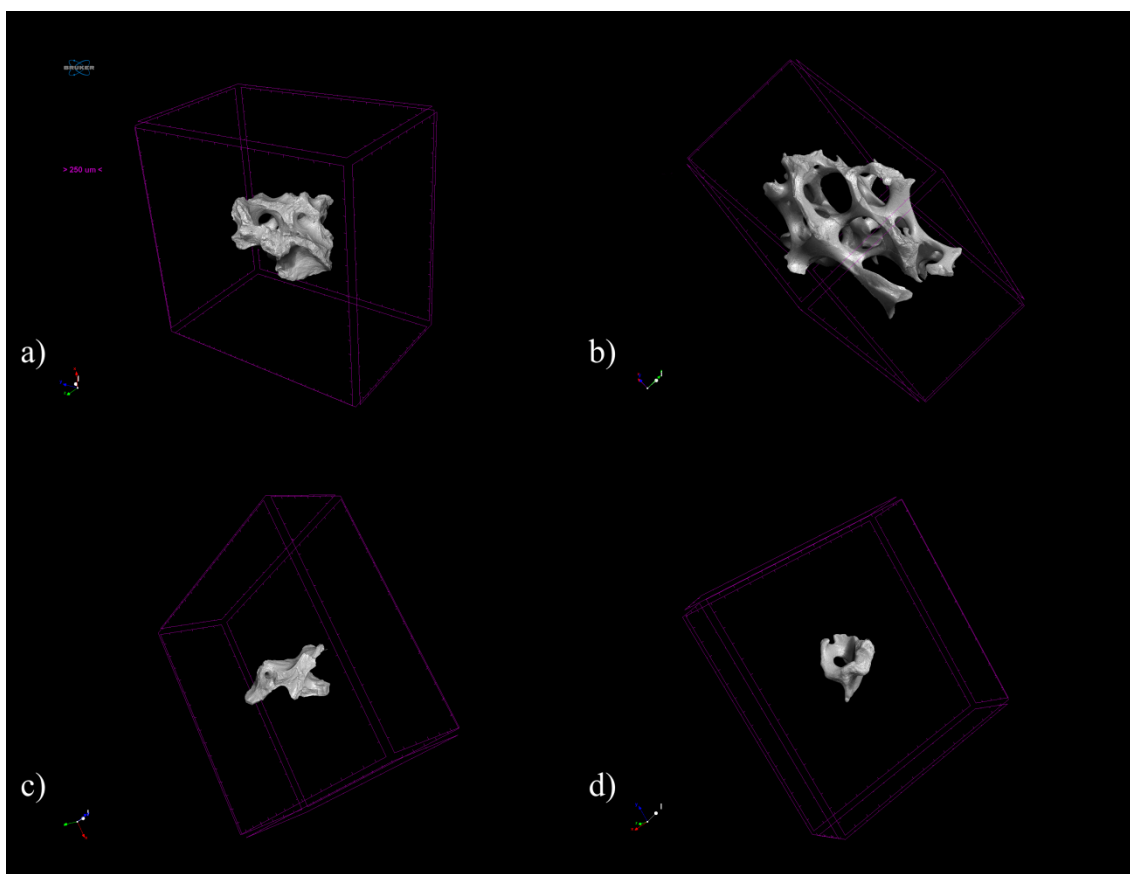
## 6. REZULTATI

### 6.1. MikroCT analiza

MikroCT analiza je obuhvatila po jednu nasumično odabranu granulu goveđeg i konjskog porekla u obe, komercijalno dostupne veličine (slika 6.1.1), a praćeni parametri su prikazani u tabelama 6.1.1 i 6.1.2. Velika granula Bio-Ossa imala je oko 2.2 puta veći volumen koštanog minerala u odnosu na veliku granulu Osteoxenona. Sličan rezultat je uočen i tokom analize sitnih granula, gde je zabeležena skoro dvostruko veća zapremina koštanog minerala sitne granule Bio-Ossa u odnosu na sitnu granulu Osteoxenona. Takođe, rezultati su ukazali da je frakcija koštanog minerala u analiziranom volumenu od interesa značajno veća kod krupne granule Bio-Ossa u odnosu na Osteoxenon, dok takva razlika se ne prikazuje kod sitnih granula gde su frakcije volumena kosti gotovo izjednačene. Kompleksnost građe granula, definisana kroz odnos koštane površine i volumena, ukazuje na kompleksniju strukturu krupnih granula pri čemu je kompleksnost krupne granule Osteoxenona veća u odnosu na krupnu granulu Bio-Ossa. Takođe, i kompleksnost sitne granule Osteoxenona je bila veća u odnosu na sitnu granulu Bio-Ossa iako je ova razlika manja u odnosu na razliku među krupnim granulama.

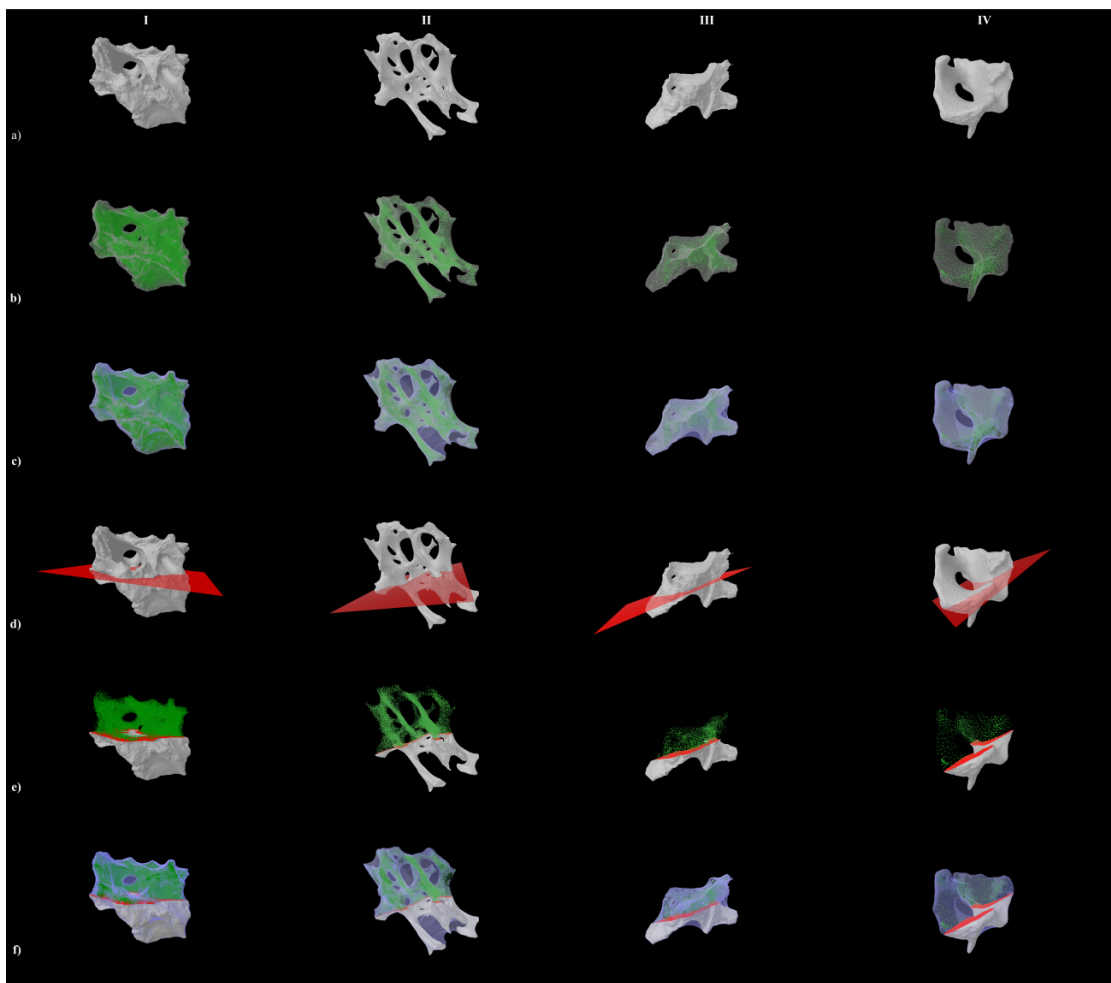
Dobijeni rezultati su ukazali da je broj zatvorenih pora krupne granule Bio-Ossa oko tri puta veći u odnosu na krupnu granulu Osteoxenona dok je njihova zapremina skoro dvostruko veća. Sličan nalaz je uočen i pri analizi sitnih granula. Zatvorena poroznost iznosila je 1.75% kod krupne granule Bio-Ossa i 2.21% kod krupne granule Osteoxenona. Ovaj parametar je bio znatno niži kod sitnih granula, gde je zatvorena poroznost bila skoro ujednačena i iznosila je 0.51% kod sitne granule Bio-Ossa i 0.53% kod sitne granule Osteoxenona. Međutim, i kod krupnih i kod sitnih granula procentualna zastupljenost zatvorenih pora je bila izraženija kod Bio-Ossa, s tim da je uočena razlika bila značajnija kod krupnih granula. Kada je u pitanju otvorena poroznost, kod krupne granule Osteoxenona iznosila je 55.61%, dok je kod Bio-Ossa iznosila 28.46%. Ukupna poroznost krupne granule Bio-Ossa iznosila je 29.71% dok je krupna granula Osteoxenona imala ukupnu poroznost od 55.60%. Sprovedene analize su ukazale da i sitne granule Osteoxenona imaju veću otvorenu poroznost (26.01%) i ukupnu poroznost (26.04%) u poređenju sa Bio-Ossom (otvorena poroznost 24.04%,

ukupna poroznost 24.43%). Zanimljivo jeda je kod sitnih granula procenat zastupljenosti otvorenih pora bio gotovo izjednačen (Bio-Oss 98.42%, Osteoxenon 98.52%), dok je kod krupnih granula bio neznatno na strani Osteoxenona (Bio-Oss 95.78%, Osteoxenon 98.26%). Ukupan broj pora je u oba analizirana slučaja bio značajno veći kod granula Bio-Ossa. Gustina povezanosti pora se zanemarljivo razlikovala između granula iste veličine, ali su rezultati ukazali na veću gustinu povezanosti pora kod krupnih granula unutar istog proizvođača. Ovaj rezultat je posebno bio izražen kod Bio-Ossa gde je vrednost gustine povezanosti pora krupne granule bila više nego dvostruko veća. Analize su pokazale da su pore Bio-Ossa anizotropnije orjentisane u poređenju sa Osteoxenonom, bez obzira na veličinu granule. Takođe, moglo se uočiti i da je stepen anizotropije ujednačeniji kod Osteoxenona, kada uporedimo krupnu (1.34) i sitnu (1.39) granulu, nego što je to bio slučaj sa Bio-Ossom (krupna granula 1.52, sitna granula 1.83).



Slika 6.1.1. 3D rekonstrukcija ispitivanih koštanih zamenika. a) krupna granula Bio-Ossa, b) krupna granula Osteoxenona, c) sitna granula Bio-Ossa, d) sitna granula Osteoxenona.

Što se tiče analize promera pora, srednja vrednost dijametra pora se mnogo manje razlikovala kod krupnih granula (Bio-Oss 226.57 $\mu$ m, Osteoxenon 239.86 $\mu$ m), nego kod sitnih (Bio-Oss 58.26 $\mu$ m, Osteoxenon 104.66 $\mu$ m). Analiza distribucije pora po veličini (Tabela 6.1.3) je ukazala da su pore veličine od 100 do 400  $\mu$ m bile najzastupljenije kod krupnog Bio-Ossa (57.03%) i Osteoxenona (66.37%), kao i kod sitnog Osteoxenona (46.86%), dok je najzastupljenija grupa pora kod sitnog Bio-Ossa bila veličine 10 do 50 $\mu$ m (35.24%). Pore promera 140 do 400 $\mu$ m su bile prisutne kod krupne granule Bio-Ossa u 53.06%, dok ih je krupna granula Osteoxenona imala u nešto većem procentu (59.93%), a sitna granula Osteoxenona značajno manje (35.89%). Za razliku od njih, sprovedene analize nisu detektovale ovu veličinu pora kod sitne granule Bio-Ossa, gde je maksimalni izmereni dijametar pore bio 133.93 $\mu$ m.



Slika 6.1.2. Prikaz prisustva pora u strukturi ispitivanih koštanih zamenika kroz kompjuterske modele:

- I – krupna granula Bio-Ossa,
  - II – krupna granula Osteoxenona,
  - III – sitna granula Bio-Ossa,
  - IV – sitna granula Osteoxenona.
- 
- a) prikaz kompjuterskog modela volumena kosti (BV)
  - b) prikaz kompjuterskog modela volumena zatvorenih pora ( $Po.V_{(cl)}$ ) unutar transparentnog kompjuterskog modela volumena kosti (BV)
  - c) prikaz kompjuterskog modela maske korišćene za premošćavanje otvora pora dijametra do  $500\mu m$  koja ilustruje volumen otvorenih pora ( $Po.V_{(op)}$ ) uz istovremeni prikaz transparentnog modela volumena kosti (BV) unutar koga se nalazi model volumena zatvorenih pora ( $Po.V_{(cl)}$ ),
  - d) uvođenje ravni preseka radi bolje vizuelne ilustracije korišćenih modela,
  - e) prikaz kompjuterskog modela volumena kosti (BV) koji je presečen i u očekivanoj gornjoj polovini se prikazuje vidljivi deo modela volumena zatvorenih pora ( $Po.V_{(cl)}$ ),
  - f) prikaz kompjuterskog modela volumena otvorenih pora ( $Po.V_{(op)}$ ) uz istovremeni prikaz presečenog modela volumena kosti (BV) u čijoj se očekivanoj gornjoj polovini prikazuje vidljivi deo modela volumena zatvorenih pora ( $Po.V_{(cl)}$ ).

Tabela 6.1.1. Analizirani parametri za krupne granule Bio-Ossa i Osteoxenona

Varijabla (Skraćenica)	Jedinica mere	Bio-Oss (krupna granula)	Osteoxenon (krupna granula)
Volumen tkiva (TV)	$\mu\text{m}^3$	2,190,799,242.38	1,568,477,849.24
Volumen kosti (BV)	$\mu\text{m}^3$	1,539,841,104.57	680,706,874.11
Frakcija volumena kosti (BV/TV)	%	70.29	43.40
Površina kosti (BS)	$\mu\text{m}^2$	67,903,351.24	47,858,119.17
Odnos koštane površine i volumena (BS/BV)	$1/\mu\text{m}$	0.04	0.07
Broj koštanih gredica (Tb.N)	$1/\mu\text{m}$	0.03	0.02
Debljina koštanih gredica (Tb.Th)	$\mu\text{m}$	22.51	22.77
Razdvojenost koštanih gredica (Tb.Sp)	$\mu\text{m}$	226.57	239.86
Broj zatvorenih pora (Po.N(cl))		791,104.00	247,958.00
Volumen zatvorenih pora (Po.V(cl))	$\mu\text{m}^3$	27,463,617.05	15,417,469.96
Površina zatvorenih pora (Po.S(cl))	$\mu\text{m}^2$	41,081,492.44	19,020,233.93
Procenat zastupljenosti zatvorenih pora (Po.P(cl))	%	4.22	1.74
Zatvorena poroznost (Po(cl))	%	1.75	2.21
Volumen otvorenih pora (Po.V(op))	$\mu\text{m}^3$	623,494,520.76	872,353,505.16
Procenat zastupljenosti otvorenih pora (Po.P(op))	%	95.78	98.26
Otvorena poroznost (Po(op))	%	28.46	55.62
Broj pora (Po.N(tot))		928,194.00	309,209.00
Ukupan volumen pora (Po.V(tot))	$\mu\text{m}^3$	650,958,137.81	887,770,975.12
Totalna poroznost (Po(tot))	%	29.71	56.60
Stepen anizotropije pora (DA)		1.52 (0.34)	1.34 (0.25)
Euler broj pora (Eu.N)		775,950.00	216,956.00
Gustina povezanosti pora (Conn.Dn)	$1/\mu\text{m}^3$	0.00007	0.00006

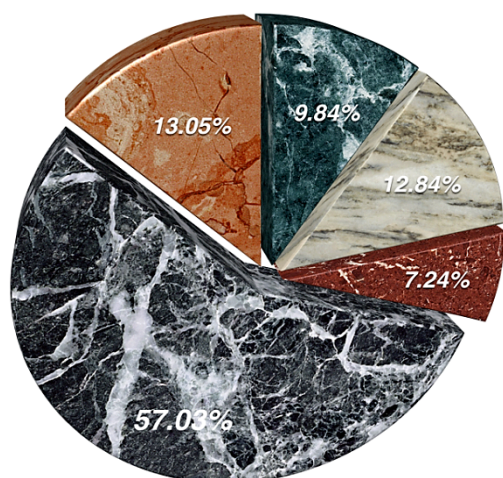
Tabela 6.1.2. Analizirani parametri za sitne granule Bio-Ossa i Osteoxenona

Varijabla (Skracénica)	Jedinica mere	Bio-Oss (sitna granula)	Osteoxenon (sitna granula)
Volumen tkiva (TV)	$\mu\text{m}^3$	280,805,946.75	157,801,936.33
Volumen kosti (BV)	$\mu\text{m}^3$	212,205,843.80	116,140,451.87
Frakcija volumena kosti (BV/TV)	%	75.57	73.60
Površina kosti (BS)	$\mu\text{m}^2$	5,756,174.17	3,932,467.29
Odnos koštane površine i volumena (BS/BV)	$1/\mu\text{m}$	0.03	0.034
Broj koštanih gredica (Tb.N)	$1/\mu\text{m}$	0.02	0.016
Debljina koštanih gredica (Tb.Th)	$\mu\text{m}$	45.30	47.03
Razdvojenost koštanih gredica (Tb.Sp)	$\mu\text{m}$	58.26	104.66
Broj zatvorenih pora (Po.N(cl))		12,950.00	3,148.00
Volumen zatvorenih pora (Po.V(cl))	$\mu\text{m}^3$	1,081,687.15	616,148.00
Površina zatvorenih pora (Po.S(cl))	$\mu\text{m}^2$	1,177,870.13	612,155.77
Procenat zastupljenosti zatvorenih pora (Po.P(cl))	%	1.58	1.48
Zatvorena poroznost (Po(cl))	%	0.51	0.53
Volumen otvorenih pora (Po.V(op))	$\mu\text{m}^3$	67,518,415.79	41,045,336.46
Procenat zastupljenosti otvorenih pora (Po.P(op))	%	98.42	98.52
Otvorena poroznost (Po(op))	%	24.04	26.01
Broj pora (Po.N(tot))		17,705.00	8,991.00
Ukupan volumen pora (Po.V(tot))	$\mu\text{m}^3$	68,600,102.94	41,661,484.46
Totalna poroznost (Po(tot))	%	24.43	26.40
Stepen anizotropije pora (DA)		1.83 (0.45)	1.39 (0.28)
Euler broj pora (Eu.N)		9,291.00	2,198.00
Gustina povezanosti pora (Conn.Dn)	$1/\mu\text{m}^3$	0.00003	0.00004

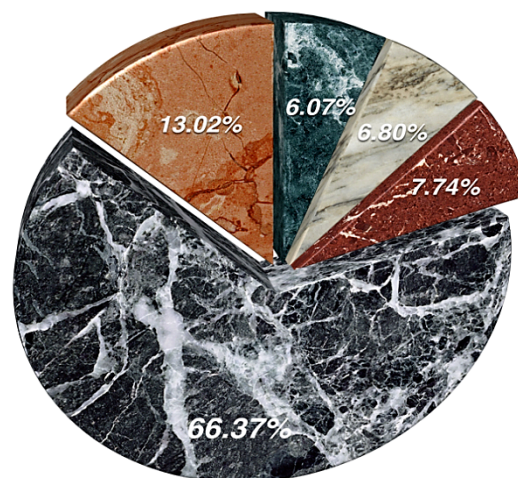


Tabela 6.1.3. Distribucija pora po veličini u odnosu na koštani zamenik

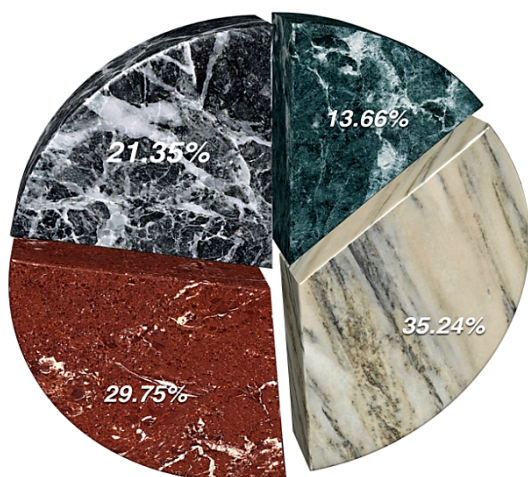
Vrsta granula	Distribucija razdvojenosti koštanih gredica po zadatim intervalima ( $\mu\text{m}$ )	Pore obuhvaćene zadatim intervalom		
		Srednja vrednost dijametra ( $\mu\text{m}$ )	Zapremina ( $\mu\text{m}^3$ )	Procenat zapremine (%)
Bio-Oss (krupna granula)	<11.25	6.13	64,379,963.89	9.84
	11.25 - 50.09	30.67	84,000,659.06	12.84
	50.09 - 101.21	75.65	47,388,281.50	7.24
	101.21 - 401.78	251.50	373,147,220.20	57.03
	>401.78	429.38	85,364,258.16	13.05
	140.06 - 401.78	270.92	347,166,746.09	53.06
Osteoxenon (krupna granula)	<11.25	6.13	53,950,692.89	6.07
	11.25 - 50.09	30.67	60,503,944.91	6.80
	50.09 - 101.21	75.65	68,858,745.97	7.74
	101.21 - 401.78	251.50	590,097,130.68	66.37
	>401.78	423.25	115,753,778.30	13.02
	140.06 - 401.78	270.92	532,876,305.19	59.93
Bio-Oss (sitna granula)	<11.25	6.13	9,378,382.45	13.66
	11.25 - 50.09	30.67	24,198,028.12	35.24
	50.09 - 101.21	75.65	20,430,340.21	29.75
	101.21 - 401.78	117.57	14,660,514.91	21.35
	140.06 - 401.78	0.00	0.00	0.00
Osteoxenon (sitna granula)	<11.25	6.13	5,450,576.46	13.07
	11.25 - 50.09	30.67	8,283,294.47	19.87
	50.09 - 101.21	75.65	8,421,761.08	20.20
	101.21 - 401.78	160.51	19,534,941.97	46.86
	140.06 - 401.78	179.93	14,960,122.17	35.88



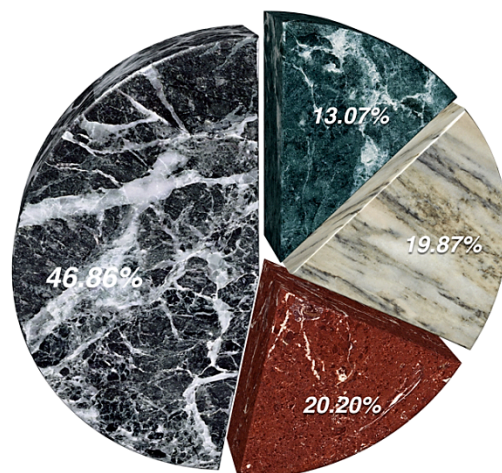
krupna granula Bio-Ossa



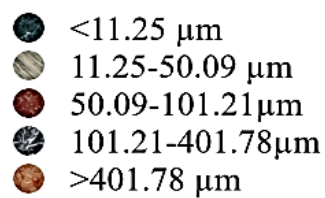
krupna granula Osteoxenona



sitna granula Bio-Ossa



sitna granula Osteoxenona



Slika 6.1.3. Distribucija pora različitog promera kod ispitivanih koštanih zamenika

## 6.2. Histološke karakteristike i histomorfometrijska analiza

### 6.2.1. Stepen neoangiogeneze

Histomorfometrijskom analizom određivan je uticaj vrste koštanog zamenika na broj krvnih sudova u 4. i 8. nedelji (slika/tabela 6.2.1.1. i 6.2.1.2.).

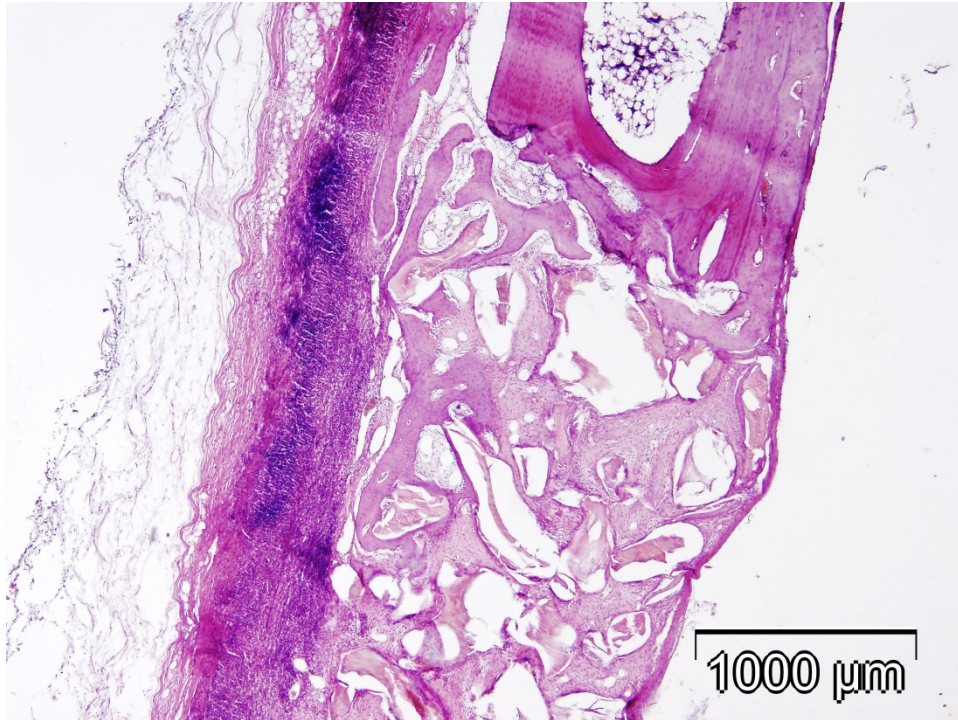
Tabela 6.2.1.1. Promene broja krvnih sudova kod različitih koštanih zamenika nakon 4 i 8 nedelja zarastanja

	Broj krvnih sudova po mm <sup>2</sup>							
	Sitan Bio-Oss		Krupan Bio-Oss		Sitan Osteoxenon		Krupan Osteoxenon	
	4 nedelje	8 nedelja	4 nedelje	8 nedelja	4 nedelje	8 nedelja	4 nedelje	8 nedelja
N	5	5	5	5	5	5	5	5
$\bar{x}$	24.80	27.40	46.40	55.60	16.00	14.60	39.60	58.60
S. D.	1.79	0.90	1.67	1.67	1.41	0.89	2.19	0.89
Minimum	22	26	44	53	14	14	36	58
Maximum	26	28	48	57	18	16	42	60

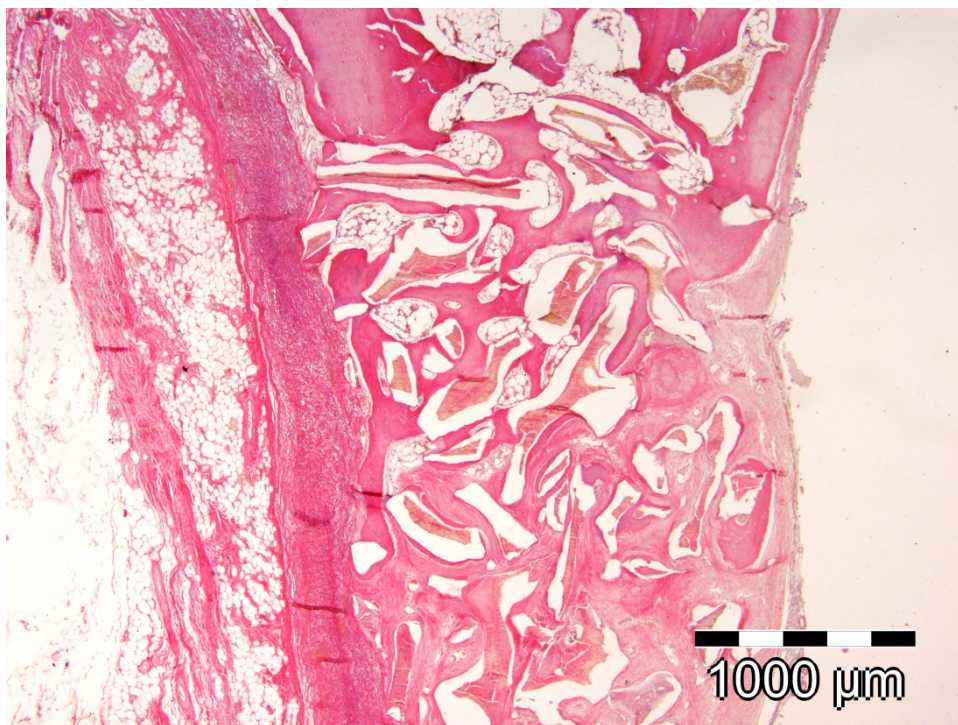
Tabela 6.2.1.2. Pregled značajnosti promena broja krvnih sudova kod različitih koštanih zamenika u 4. i 8. nedelji

Ispitivani parametar	Grupa	Značajnost <sup>a</sup> (razlika između grupa) u 4. nedelji	Značajnost <sup>ab</sup> (razlika između grupa) u 4. nedelji	Značajnost <sup>a</sup> (razlika između grupa) u 8. nedelji	Značajnost <sup>ab</sup> (razlika između grupa) u 8. nedelji	Značajnost <sup>c</sup> razlike unutar grupa između 4. i 8. nedelje		
<b>Broj krvnih sudova</b>	Sitan Bio-Oss	p<0.000*	<sup>a</sup> p<0.000* 1 vs. 2 p<0.000*; 1 vs. 3 p<0.000*; 1 vs. 4 p<0.000*; 2 vs. 3 p<0.000*; 2 vs. 4 p<0.000*; 3 vs. 4 p<0.000*	p<0.000*	<sup>a</sup> p<0.000* 1 vs. 2 p<0.000*; 1 vs. 3 p<0.000*; 1 vs. 4 p<0.000*; 2 vs. 3 p<0.000*; 2 vs. 4 p=0.004*; 3 vs. 4 p<0.000*	p=0.020*		
	Krupan Bio-Oss					p<0.000*		
	Sitan Osteoxenon					F= 298	F= 1781	p=0.098
	Krupan Osteoxenon							p<0.000*

<sup>a</sup>Jednofaktorska analiza varijanse (One-way ANOVA); <sup>b</sup>Post-hoc analiza Tuckey HSD test; <sup>c</sup>T-test za nezavisne uzorke; p-p vrednost za dvosmerno testiranje; \*statistički značajna razlika; F –Fišerov varijasni količnik



Slika 6.2.1.1. Koštani defekt koga čine fragmenti sitnih granula Bio-Ossa sa proliferacijom veziva i stvaranjem novog koštanog tkiva. 4 nedelja zarastanja (HE x 40)



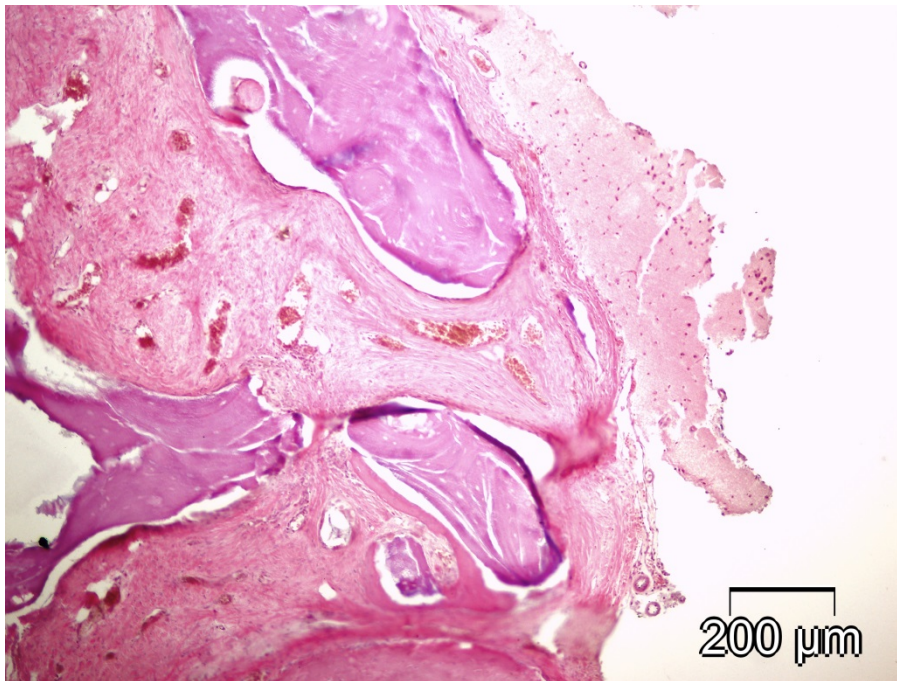
Slika 6.2.1.2. Defekt u koštanom tkivu sa prisustvom sitnih granula Bio-Ossa, naglašenom koštanom produkcijom i proliferacijom vezivno-vaskularnog tkiva između partikula koštanog zamenika. 8 nedelja zarastanja (HE x 40)

Tabela 6.2.1.1. i slika 6.2.1.9. prikazuju srednje vrednosti broja krvnih sudova izmerene nakon 4 i 8 nedelja u koštanim defektima ispunjenim različitim koštanim zamenicama. **Nakon 4 nedelje** najmanji broj krvnih sudova po mm<sup>2</sup> imali su defekti ispunjeni sitnim granulama porekla konjske kosti, Osteoxenon ( $\bar{x}$ =16.00, SD=1.41) dok je najveći broj krvnih sudova bio prisutan u defektima ispunjenim velikim granulama kosti goveđeg porekla, Bio-Oss ( $\bar{x}$ =46.40, SD=1.67). Jednofaktorskom analizom varijanse utvrđena je statistički značajna razlika na nivou  $p < 0.05$  između četiri ispitivane grupe nakon 4 nedelje zarastanja (Tabela 6.2.1.2). Naknadna poređenja pomoću Tuckey-ovog HSD testa između grupa pokazuju statistički značajnu razliku između svih vrsta koštanih zamenika prema broju krvnih sudova.

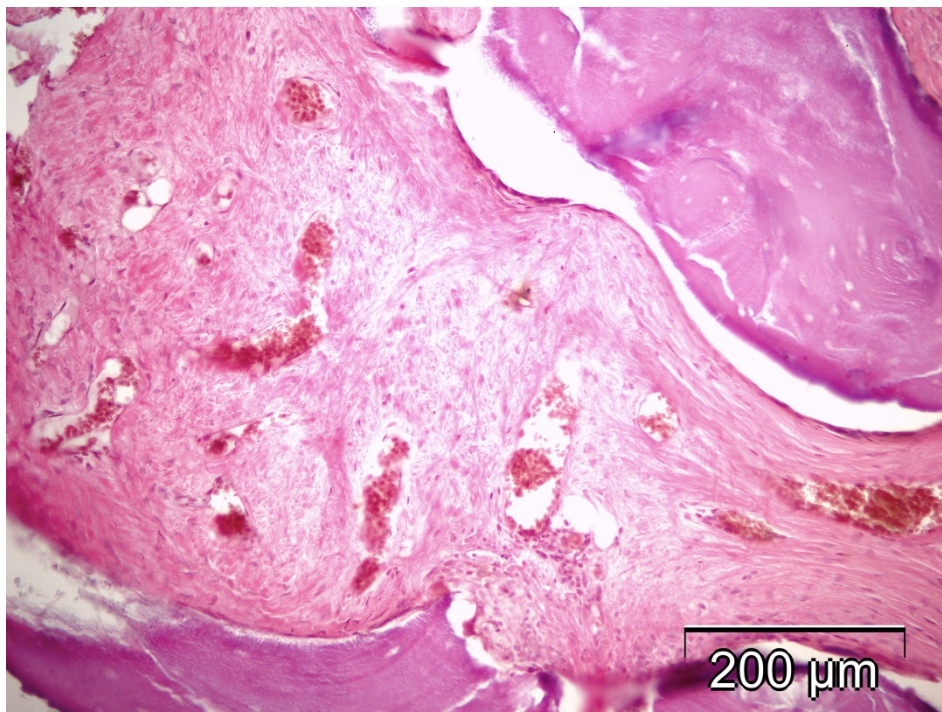
**Nakon 8 nedelja** najveći broj krvnih sudova po mm<sup>2</sup> izmeren je u defektima ispunjenim krupnim granulama Osteoxenona ( $\bar{x}$ =58.60, SD=0.89) (histološki prikaz slike 6.2.1.3 i 6.2.1.4) dok je najmanji broj i dalje bio kod defekata ispunjenih sitnim granulama Osteoxenona ( $\bar{x}$ =14.60, SD=0.89). Jednofaktorskom analizom varijanse utvrđena je statistički značajna razlika na nivou  $p < 0.05$  između četiri ispitivane grupe kako nakon 8 nedelja zarastanja (Tabela 6.2.1.2). Naknadna poređenja pomoću Tuckey-ovog HSD testa između grupa pokazuju statistički značajnu razliku između svih vrsta koštanih zamenika prema broju krvnih sudova.

U defektima ispunjenim **sitnim granulama Bio-Ossa** nakon 4 nedelje zarastanja srednja vrednost broja krvnih sudova iznosila je 24.80 po mm<sup>2</sup> (SD=1.79) (histološki prikaz-slika 6.2.1.5 i 6.2.1.6), dok je nakon 8 nedelja iznosila 27.40 (SD=0.90) (histološki prikaz-slika 6.2.1.7 i 6.2.1.8). Analizirajući rezultate T-testom za nezavisne uzorke pokazano je da je došlo do **statistički značajnog povećanja** srednje vrednosti broja krvnih sudova po mm<sup>2</sup> kod defekata ispunjenih sitnim granulama Bio-Ossa između 4. i 8. nedelje zarastanja ( $X^2 = -2.907$ ;  $df = 8$ ;  $p < 0.05$ ,  $p = 0.02$ ).

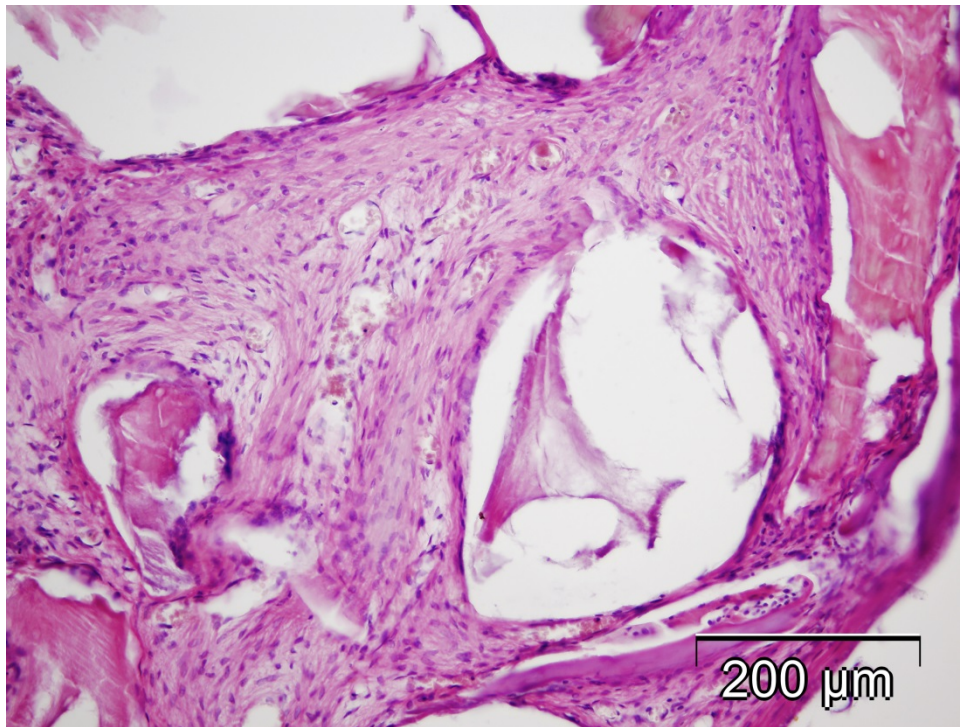
Kod defekata ispunjenih **krupnim granulama Bio-Ossa** srednja vrednost broja krvnih sudova po mm<sup>2</sup> nakon 4. nedelje zarastanja iznosila je 46.40 (SD=1.67), dok je nakon 8. nedelje zarastanja srednja vrednost iznosila 55.60 (SD=1.67). T-testom za nezavisne uzorke pokazano je da je došlo do **statistički značajnog povećanja** broja krvnih sudova u defektima ispunjenim krupnim granulama Bio-Ossa između dva posmatrana vremena ( $X^2 = -8.693$ ;  $df = 8$ ;  $p < 0.000$ ).



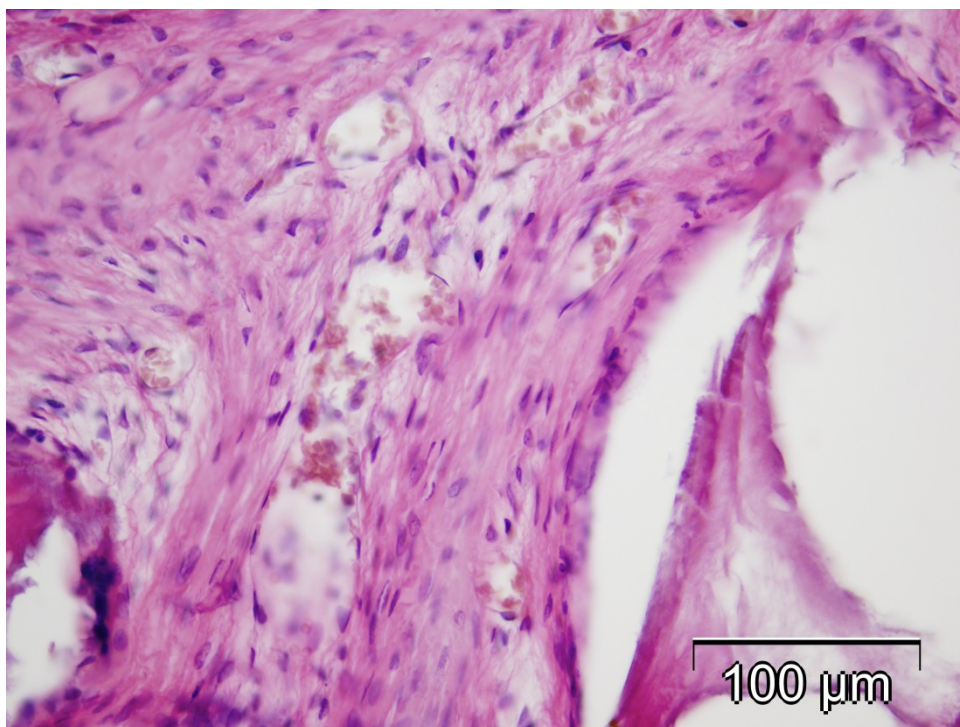
Slika 6.2.1.3. Krupne granule Osteoxenona oko kojih se uočava proliferacija bogato vaskularizovanog fibroznog tkiva u kome se uočava veliki broj vaskularnih prostora. Oskudni limfocitni infiltrati perivaskularno. Nisu vidljive džinovske ćelije tipa oko stranog tela. 8.nedelja zarastanja (HE x 100)



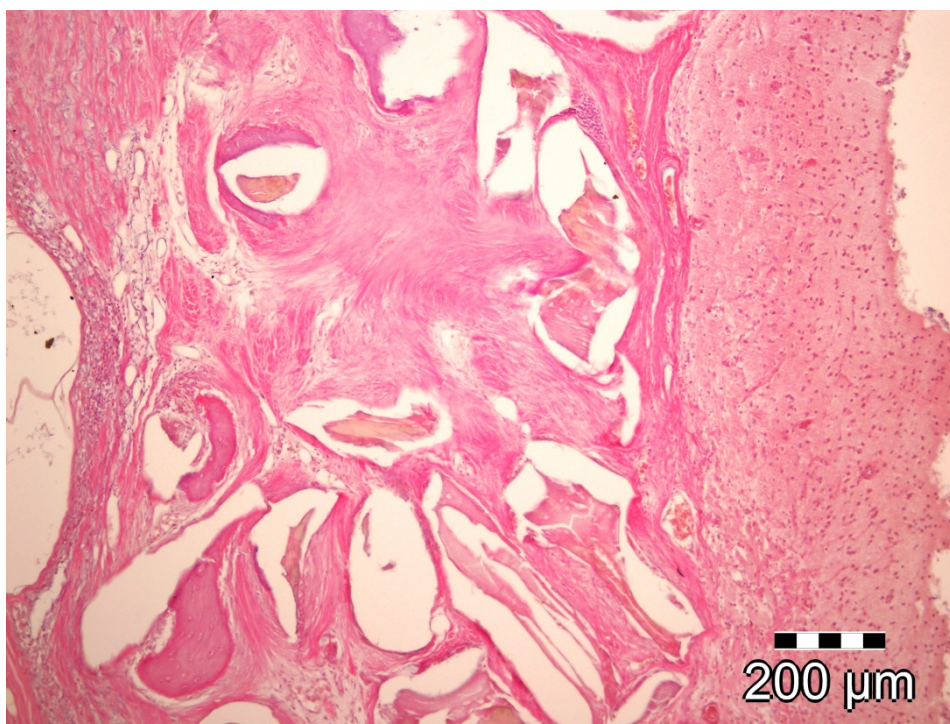
Slika 6.2.1.4. Detalj s prethodne slike. Brojni vaskularni prostori u novostvorenom vezivu s naglašenom pasivnom hiperemijom, prepunjeni eritrocitima uz fokalno oskudno prisustvo mononuklearnih ćelija tipa limfocita i plazmocita koji se nalaze oko jednog vaskularnog prostora. Na periferiji granule krupnog Osteoxenona (HE x 200)



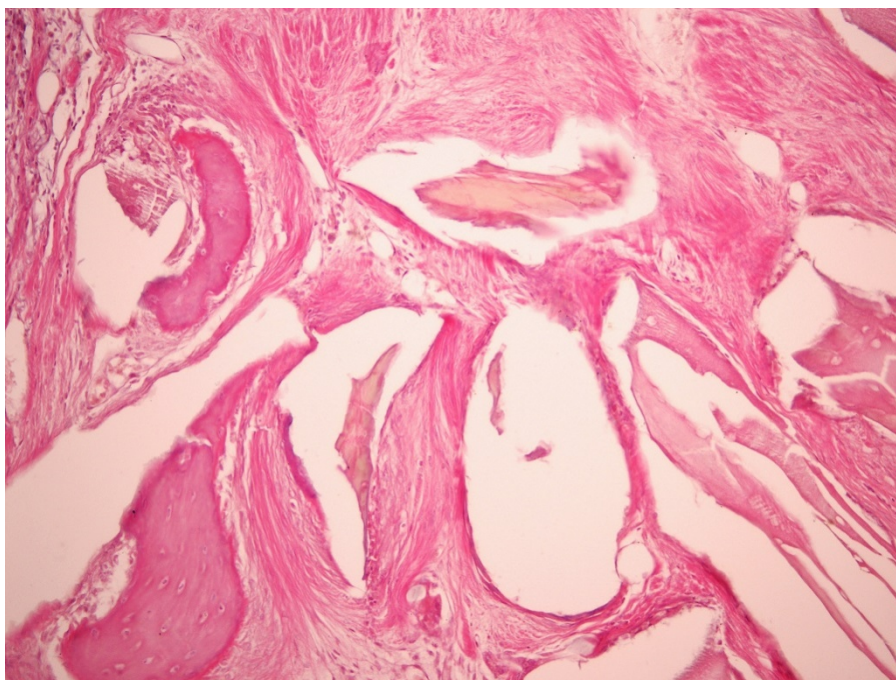
Slika 6.2.1.5. Prisutni brojni vaskularni prostori, sitne partikule Bio-Ossa s okolnom fibroplazijom i pojedinačnim ćelijama tipa oko stranog tela. 4.nedelja zarastanja (HE x 100)



Slika 6.2.1.6. Detalj s prethodne slike. Brojni vaskularni prostori od kojih pojedini imaju jasno naglašeni endotel, a drugi nedovoljno formiranje vaskularnog zida. Na periferiji partikula sitnog Bio-Ossa. Prisutna jedna džinovska ćelija tipa oko stranog tela.(HE x 200)



Slika 6.2.1.7. Prisutne sitne granule Bio-Ossa, proliferacija vezivno-vaskularnog tkiva sa lakom hijalinizacijom; novostvoreno koštano tkivo, normocelularno. Veoma retke džinovske ćelije tipa oko stranog tela. Krvni sudovi umereno prisutni u analiziranom tkivu. 8.nedelja zarastanja (HE x 100)

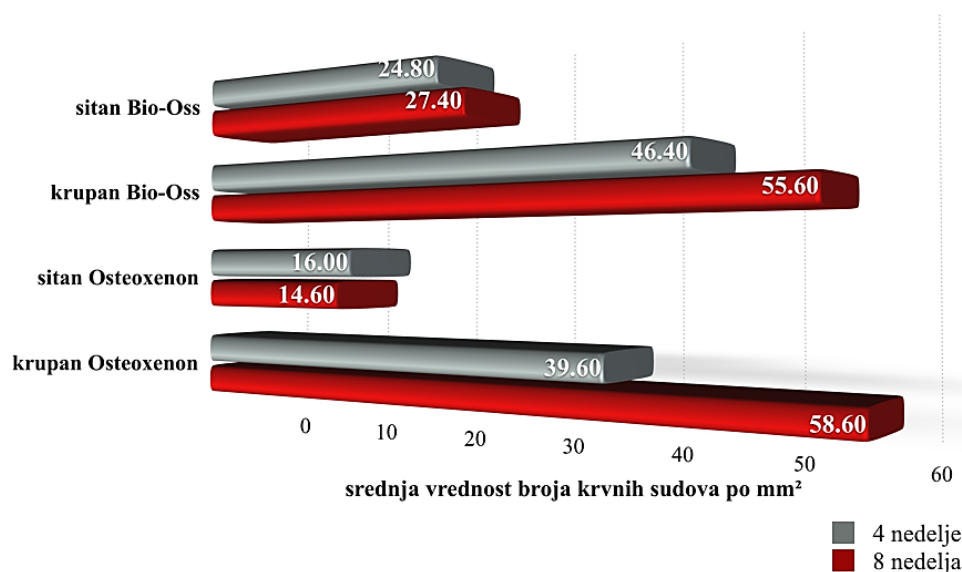


Slika 6.2.1.8. Detalj s prethodne slike. Struktura koštanog zamenika jasno vidljiva. Oko koštanog zamenika dominantna proliferacija hijalinizovanog vezivno-vaskularnog tkiva uz oskudno do umereno prisustvo krvnih sudova. Uočavaju se plaže novostvorenog normocelularnog osteoida i jedna džinovska ćelija tipa oko stranog tela. Fokalno perivaskularno retki monocitni infiltrati(HE x 200)



U defektima ispunjenim **sitnim granulama Osteoxenona** nakon 4.nedelje zarastanja srednja vrednost broja krvnih sudova iznosila je 16.00 po mm<sup>2</sup> (SD=1.41), dok je nakon 8. nedelja iznosila 14.60 (SD=0.89). Analizirajući rezultate T-testom za nezavisne uzorke pokazano je da **nije došlo do statistički značajne promene** broja krvnih sudova između 4. i 8. nedelje kod defekata ispunjenih sitnim granulama Osteoxenona ( $X^2=1.871$ ; df=8; p=0.098).

U 4. nedelji zarastanja srednja vrednost broja krvnih sudova u defektima ispunjenim **krupnim granulama Osteoxenona** iznosila je 39.60 po mm<sup>2</sup> (SD=2.19), dok je nakon 8. nedelje iznosila 58.60 (SD=0.89). T-testom za nezavisne uzorke utvrđena je **statistički značajna razlika** u broju krvnih sudova pomm<sup>2</sup> na nivou p<0.05 kod defekata ispunjenih krupnim granulama Osteoxenona između 4. i 8. nedelje zarastanja ( $X^2=-17.953$ ; df=8; p<0.000).



Slika 6.2.1.9. Srednje vrednosti broja krvnih sudova nakon 4 i 8 nedelja zarastanja u defektima ispunjenim ispitivanim koštanim zamenicama

## 6.2.2. Stepen fibroplazije

Tabela 6.2.2.1. Stepen fibroplazije kod različitih koštanih zamenika nakon 4 i 8 nedelja zarastanja

	Maksimalna širina vezivnih traka ( $\mu\text{m}$ )							
	Sitan Bio-Oss		Krupan Bio-Oss		Sitan Osteoxenon		Krupan Osteoxenon	
	4 nedelje	8 nedelja	4 nedelje	8 nedelja	4 nedelje	8 nedelja	4 nedelje	8 nedelja
N	5	5	5	5	5	5	5	5
$\bar{x}$	354.60	370.80	454.40	502.20	380.60	394.00	421.20	450.80
S. D.	14.64	6.61	8.08	11.37	9.37	5.29	6.76	24.48
Minimum	332	361	446	489	366	387	412	415
Maximum	372	379	466	514	391	401	428	481

Tabela 6.2.2.2. Pregled značajnosti fibroplazije kod različitih koštanih zamenika u 4. i 8. nedelji

Ispitivani parametar	Koštani zamenik	Značajnost <sup>a</sup> (razlika između grupa) u 4.nedelji	Značajnost <sup>a/b</sup> (razlika između grupa) u 4.nedelji	Značajnost <sup>a</sup> (razlika između grupa) u 8.nedelji	Značajnost <sup>a/b</sup> (razlika između grupa) u 8.nedelji	Značajnost <sup>c</sup> razlike unutar grupa između 4. i 8. nedelje
Maksimalna širina vezivnih traka	Sitan Bio-Oss	$p < 0.000^*$ F=94	$p < 0.000^*$ 1 vs. 2 $p < 0.000^*$ ; 1 vs. 3 $p < 0.005^*$ ; 1 vs. 4 $p < 0.000^*$ ;	$p < 0.000^*$ F=87	$p < 0.000^*$ 1 vs. 2 $p < 0.000^*$ ; 1 vs. 3 $p = 0.083$ ; 1 vs. 4 $p < 0.000^*$ ;	$p = 0.054$
	Krupan Bio-Oss		2 vs. 3 $p < 0.000^*$ ; 2 vs. 4 $p < 0.000^*$ ; 3 vs. 4 $p < 0.000^*$ ;		$p < 0.000^*$ ; 2 vs. 3 $p < 0.000^*$ ; 2 vs. 4 $p < 0.000^*$ ; 3 vs. 4 $p < 0.000^*$ ;	$p < 0.000^*$
	Sitan Osteoxenon					$p = 0.024^*$
	Krupan Osteoxenon					$p = 0.031^*$

<sup>a</sup>Jednofaktorska analiza varijanse (One-way ANOVA); <sup>b</sup> Post-hoc analiza Tuckey HSD test; <sup>c</sup> T-test za nezavisne uzorke; p-p vrednost za dvosmerno testiranje; \*statistički značajna razlika; F –Fišerov varijasniki količnik

Stvaranje veziva je praćeno kroz maksimalnu širinu vezivnih traka. Na slici 6.2.2.1 i u tabeli 6.2.2.1 prikazane su srednje vrednosti maksimalne širine vezivnih traka nakon 4 i nakon 8 nedelja kod različitih koštanih zamenika. Najmanja širina vezivnih traka **nakon**

**4 nedelje** zarastanja izmerena je u defektima ispunjenim sitnim granulama Bio-Ossa ( $\bar{x}=354.60$ ,  $SD=14.64$ ), dok je najveća širina izmerena u defektima ispunjenim krupnim granulama Bio-Ossa ( $\bar{x}=454.40$ ,  $SD=8.08$ ). Jednofaktorskom analizom varijanse utvrđena je statistički značajna razlika na nivou  $p<0.05$  između četiri ispitivane grupe nakon 4 nedelje zarastanja (Tabela 6.2.2.2). Naknadna poređenja pomoću Tuckey-ovog HSD testa između grupa ukazuju na statističku značajnu razliku između svih vrsta koštanih zamenika prema broju krvnih sudova ( $p<0.000$ ).

**I nakon 8 nedelja** zarastanja najmanje širina vezivnih traka izmerena je u defektima ispunjenim sitnim granuloma Bio-Ossa ( $\bar{x}=370.80$ ;  $SD=6.61$ ) dok je najveća širina, takođe izmerena u defektima ispunjenim krupnim granulama Bio-Ossa ( $\bar{x}=502.20$ ;  $SD=11.37$ ). Jednofaktorskom analizom varijanse utvrđena je statistički značajna razlika na nivou  $p<0.05$  između 4 ispitivane grupe nakon 8 nedelja zarastanja (Tabela 6.2.2.2). Naknadna poređenja pomoću Tuckey-ovog HSD testa između grupa ukazuju da jedino između defekata ispunjenih sitnim granuloma Bio-Ossa i sitnim granuloma Osteoxenona nema statistički značajne razlike ( $p=0.083$ ) dok ostala poređenja koštanih zamenika pokazuju statistički značajnu razliku prema srednjoj vrednosti maksimalne širine koštanih gredica nakon osam nedelja zarastanja ( $p<0.000$ ).

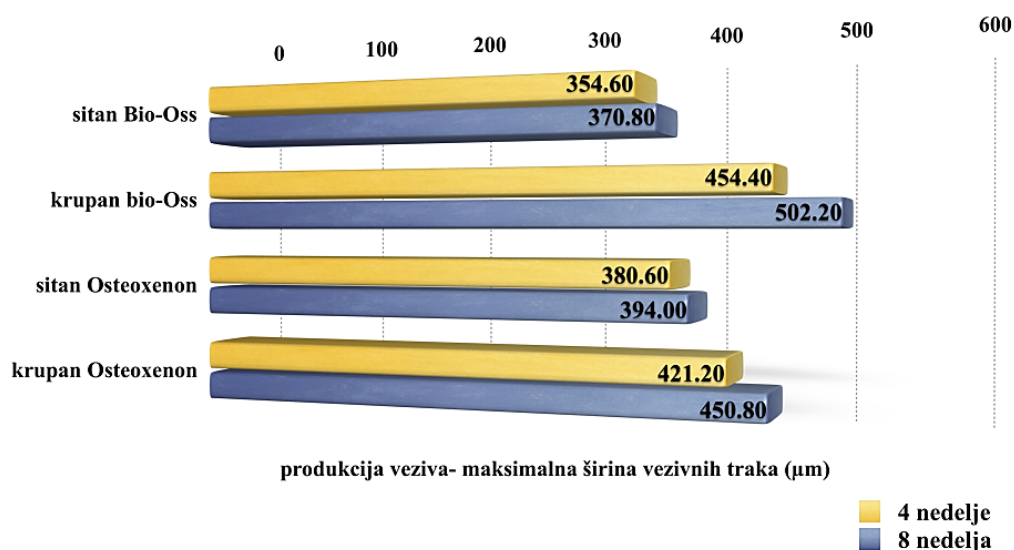
U defektima ispunjenim **sitnim granulama Bio-Ossa** srednja vrednost maksimalne širine vezivnih traka nakon 4 nedelje zarastanja iznosila je  $354.60\mu\text{m}$  ( $SD=14.64$ ), a nakon 8 nedelja  $370.80\mu\text{m}$  ( $SD=6.61$ ). T-testom za nezavisne uzorke utvrđeno je da **nema statistički značajnog povećanja** širine vezivnih traka između 4. i 8. nedelje u defektima ispunjenim sitnim granulama Bio-Ossa ( $X^2=-2.225$ ;  $df=8$ ;  $p=0.054$ ).

Kod defekata ispunjenih **krupnim granulama Bio-Ossa** srednja vrednost maksimalne širine vezivnih traka nakon 4 nedelje zarastanja iznosila je  $454.40\mu\text{m}$  ( $SD=8.08$ ) dok je nakon 8 nedelja iznosila  $502.20\mu\text{m}$  ( $SD=11.37$ ). Analizirajući rezultate T-testom za nezavisne uzorke utvrđeno je da je došlo do **statistički značajnog povećanja** širine vezivnih traka između 4. i 8. nedelje kod defekata ispunjenih krupnim granulama Bio-Ossa ( $X^2=-7.664$ ;  $df=8$ ;  $p<0.000$ ).

Srednja vrednost maksimalne širine vezivnih traka kod defekata ispunjenih **sitnim granulama Osteoxenona** nakon 4 nedelje zarastanja iznosila je  $380.60\mu\text{m}$  ( $SD=9.37$ ), a nakon 8 nedelja  $394.00\mu\text{m}$  ( $SD=5.29$ ). Na osnovu T-testa za nezavisne uzorke utvrđeno je da postoji **statistički značajna razlika** na nivou  $p<0.05$  prema maksimalnoj širini

vezivnih traka između 4. i 8. nedelje zarastanja unutar defekata ispunjenih sitnim granulama Osteoxenona ( $X^2 = -2.784$ ;  $df=8$ ;  $p < 0.05$ ,  $p = 0.24$ ).

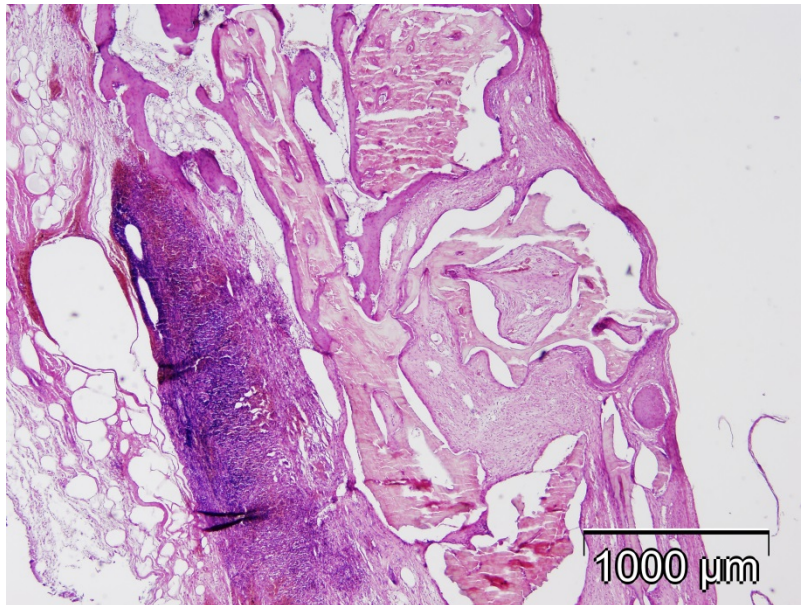
Kod defekata ispunjenih **krupnim granulama Osteoxenona** srednja vrednost maksimalne širine vezivnih traka nakon 4 nedelje zarastanja iznosila je  $421.20\mu\text{m}$  ( $SD=6.76$ ) dok je nakon 8 nedelja iznosila  $450.80\mu\text{m}$  ( $SD=24.48$ ). Analizom T-testa za nezavisne uzorke utvrđeno je da postoji **statistički značajno povećanje** širine vezivnih traka između 4. i 8. nedelje u defektima ispunjenim krupnim granulama Osteoxenona ( $X^2 = -2.606$ ;  $df=8$ ;  $p < 0.05$ ,  $p = 0.31$ ).



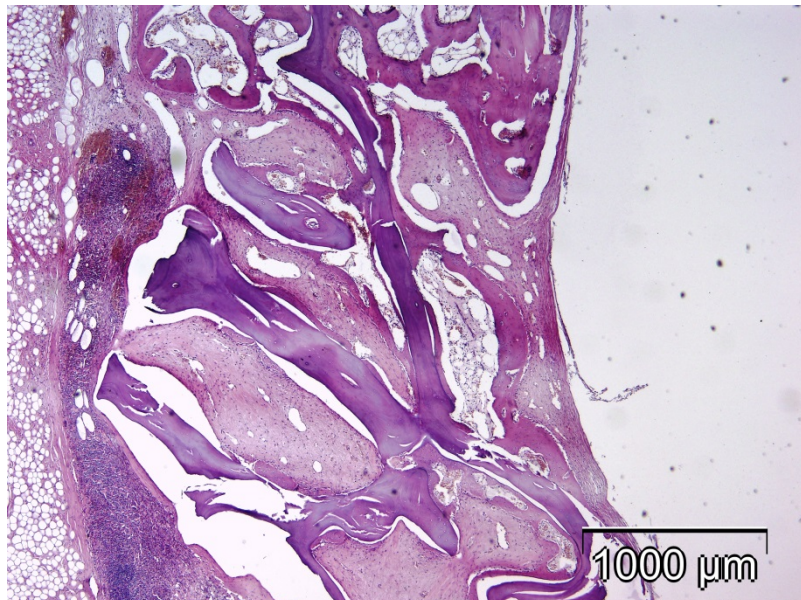
Slika 6.2.2.1. Srednje vrednosti maksimalne širine vezivnih traka nakon 4 i 8 nedelja zarastanja u defektima ispunjenim ispitivanim koštanim zamenicama

### 6.2.3. Stvaranje koštanog tkiva

Stvaranje koštanog tkiva je praćeno kroz maksimalnu širinu koštanih gredica. Na slikama 6.2.3.1 i 6.2.3.2 prikazani su defekti ispunjeni krupnim granulama biomaterijala.



Slika 6.2.3.1. Defekt u koštanom tkivu s naglašenim zapaljenskim infiltratom, partikulama krupnog Bio-Ossa, okolnom fibroplazijom i poljima novostvorenog koštanog tkiva. Krupni Bio-Oss se jasno vidi lamelarne građe. 4.nedelja zarastanja. (HE x 40)



Slika 6.2.3.2 Defekt u koštanom tkivu s umerenim zapaljenskim infiltratom prema okolnim strukturama. Vidljive partikule krupnog Osteoxenona oko kojih se uočavaju plaže fibrovaskularnog tkiva i umereno stvaranje nove kosti koja mestimično pokazuje lamelarnu građu. 4.nedelja zarastanja. (HE x40)

Tabela 6.2.3.1. Promena stvaranja koštanog tkiva kod različitih koštanih zamenika nakon 4 i 8 nedelja zarastanja

	Maksimalna širina koštanih gredica (µm)							
	Sitan Bio-Oss		Krupan Bio-Oss		Sitan Osteoxenon		Krupan Osteoxenon	
	4 nedelje	8 nedelja	4 nedelje	8 nedelja	4 nedelje	8 nedelja	4 nedelje	8 nedelja
N	5	5	5	5	5	5	5	5
$\bar{x}$	111.80	151.20	130.40	143.60	97.20	116.60	153.40	201.20
S. D.	3.35	3.03	3.98	6.77	8.93	11.59	4.16	2.86
Minimum	108	147	125	133	90	99	149	197
Maximum	116	155	136	149	112	128	428	205

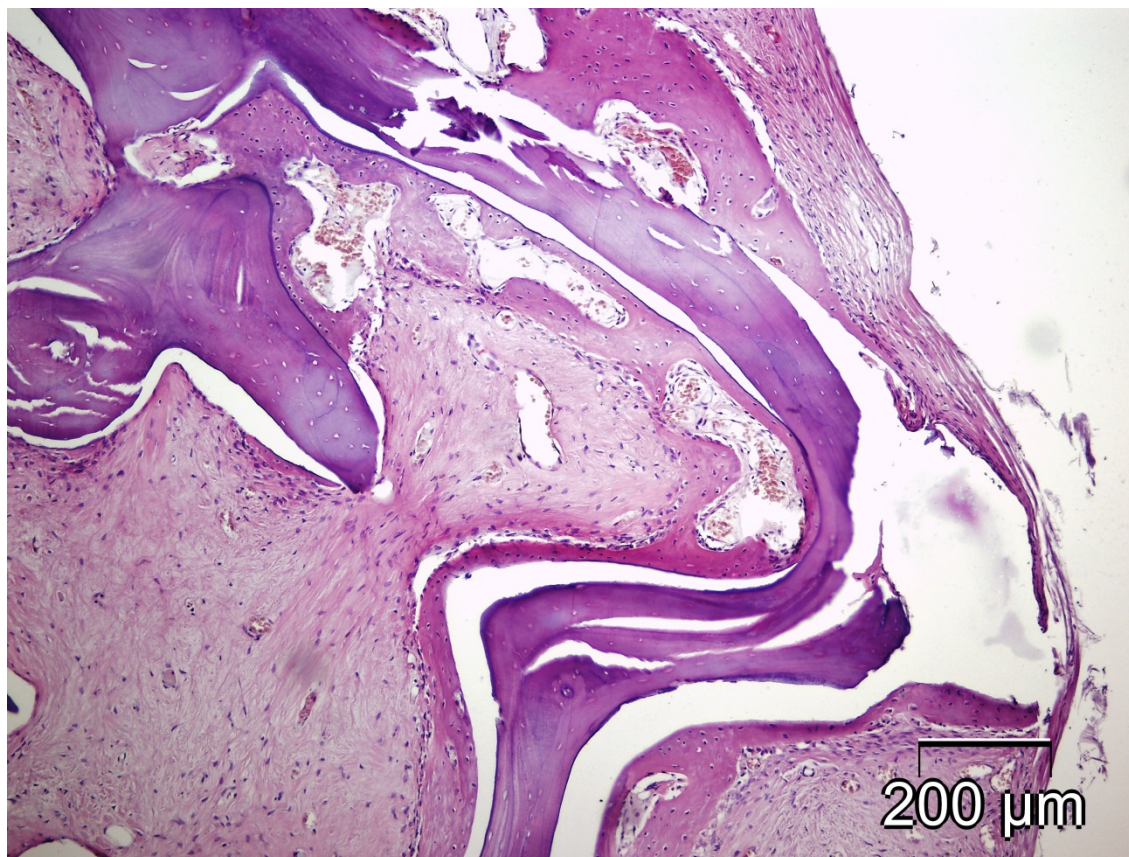
Tabela 6.2.3.2. Pregled značajnosti promene stvaranja koštanog tkiva kod različitih koštanih zamenika u 4. i 8. nedelji

Ispitivani parametar	Koštani zamenik	Značajnost <sup>a</sup> (razlika između grupa) u 4.nedelji	Značajnost <sup>a,b</sup> (razlika između grupa) u 4.nedelji	Značajnost <sup>a</sup> (razlika između grupa) u 8.nedelji	Značajnost <sup>a,b</sup> (razlika između grupa) u 8.nedelji	Značajnost <sup>c</sup> razlike unutar grupa između 4. i 8. nedelje
Maksimalna širina koštanih gredica	Sitan Bio-Oss	p<0.000* F=95	<sup>a</sup> p<0.000*	p<0.000* F=126	<sup>a</sup> p<0.000*	p<0.000*
	Krupan Bio-Oss		1 vs. 2 p<0.000*; 1 vs. 3 p=0.004*; 1 vs. 4 p<0.000*;		1 vs. 2 p=0.351; 1 vs. 3 p=0.083; 1 vs. 4 p<0.000*;	p=0.006*
	Sitan Osteoxenon		2 vs. 3 p<0.000*; 2 vs. 4 p<0.000*;		2 vs. 3 p<0.000*; 2 vs. 4 p<0.000*;	p=0.018*
	Krupan Osteoxenon		3 vs. 4 p<0.000*;		3 vs. 4 p<0.000*;	p<0.000*

<sup>a</sup>Jednofaktorska analiza varijanse (One-way ANOVA); <sup>b</sup>Post-hoc analiza Tuckey HSD test; <sup>c</sup>T-test za nezavisne uzorke; p-p vrednost za dvosmerno testiranje; \*statistički značajna razlika; F –Fišerov varijanski količnik

U tabeli 6.2.3.1. prikazane su srednje vrednosti maksimalne širine koštanih gredica nakon 4 i nakon 8 nedelja kod različitih koštanih zamenika. Najmanja širina koštanih gredica **nakon 4 nedelje** zarastanja izmerena je u defektima ispunjenim sitnim granulama Osteoxenona ( $\bar{x}$ =97.20, SD=8.93), dok je najveća širina izmerena u defektima ispunjenim krupnim granulama Osteoxenona ( $\bar{x}$ =153.40, SD=4.16) (slika 6.2.3.3 i 6.2.3.4). Jednofaktorskom analizom varijanse utvrđena je statistički značajna

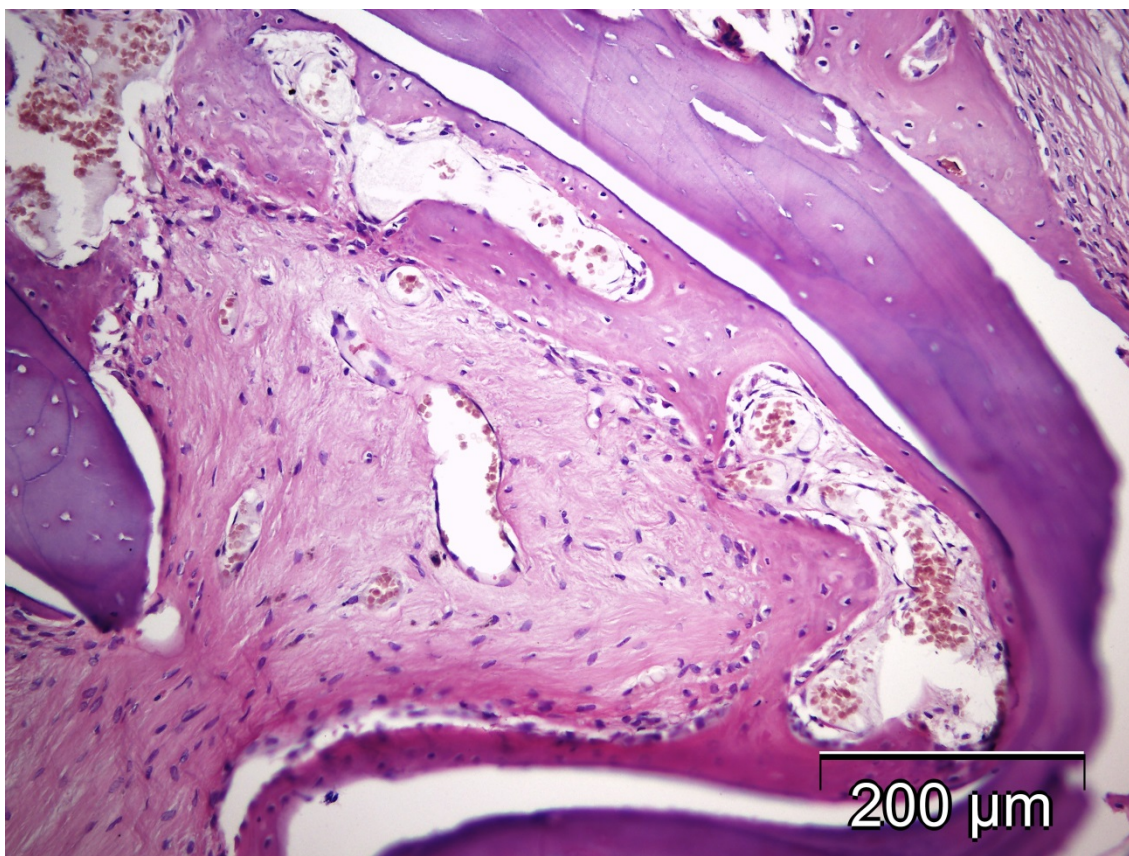
razlika na nivou  $p < 0.05$  između četiri ispitivane grupe nakon 4 nedelje zarastanja (Tabela 6.2.3.2). Naknadna poređenja pomoću Tuckey-ovog HSD testa između grupa potvrđuju statističku značajnu razliku između svih vrsta koštanih zamenika prema širini koštanih gredica ( $p < 0.000$ ).



Slika 6.2.3.3. Detalj s prethodne slike. Vidljive su krupne granule Osteoxenona sa produkcijom novostvorenog koštanog tkiva. Koštano tkivo je bogato vaskularizovano uz prisustvo brojnih novostvorenih vaskularnih prostora koji pokazuju naglašenu endotelnu proliferaciju. Koštane gredice su hipercelularne i mestimično se uočava lamelarna građa uz regularne zone mineralizacije. (HE x 100)

**Nakon 8 nedelja** zarastanja najmanje širina koštanih gredica izmerena je u defektima ispunjenim sitnim granuloma Osteoxenona ( $\bar{x}=116.60$ ;  $SD=11.59$ ) dok je najveća širina, izmerena u defektima ispunjenim krupnim granulama Osteoxenona ( $\bar{x}=201.20$ ;  $SD=2.86$ ). Jednofaktorskom analizom varijanse utvrđena je statistički značajna razlika na nivou  $p < 0.05$  između četiri ispitivane grupe nakon 8 nedelja zarastanja (Tabela 6.2.3.2). Naknadna poređenja pomoću Tuckey-ovog HSD testa između grupa ukazuju da između defekata ispunjenih sitnim granuloma Bio-Ossa i sitnim granuloma Osteoxenona kao i između defekata ispunjenih sitnim i krupnim granulama Bio-Ossa

nema statistički značajne razlike ( $p=0.083$  i  $p=0.351$ , po navedenom redosledu) dok ostala poređenja koštanih zamenika pokazuju statistički značajnu razliku prema srednjoj vrednosti maksimalne širine koštanih gredica nakon osam nedelja zarastanja ( $p<0.000$ )



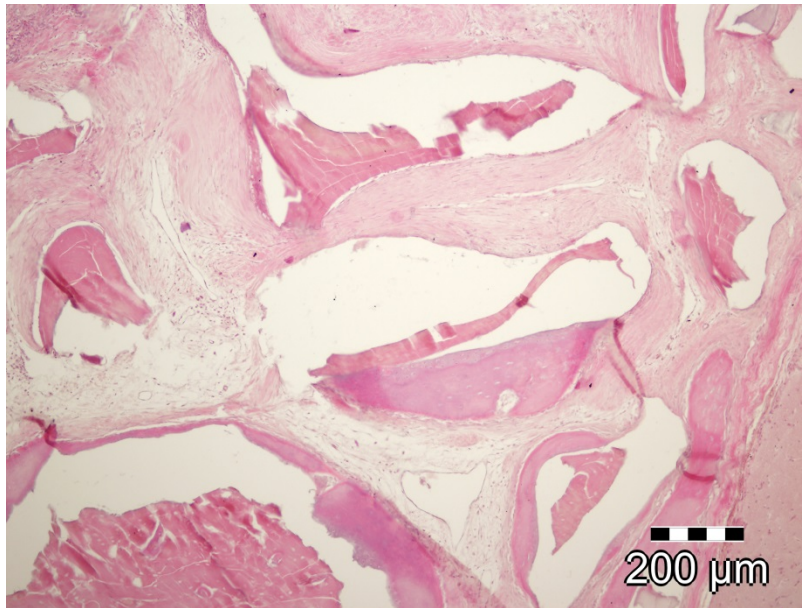
Slika 6.2.3.4. Detalj s prethodne slike. Naglašena vaskularizacija novostvorenog koštanog i vezivnog tkiva uz prisustvo brojnih vaskularnih prostora, naglašena endotelna hiperplazija i prisustvo eritrocita u vaskularnim prostorima. Koštano tkivo je hipercelularno, osteociti odgovarajuće građe, viabilni u lakunarnim prostorima. Na površini novostvorene kosti uočavaju se aktivirani osteoblasti. (HE x 200)

U defektima ispunjenim **sitnim granulama Bio-Ossa** srednja vrednost maksimalne širine koštanih gredica nakon 4 nedelje zarastanja iznosila je  $111.80\mu\text{m}$  ( $SD=3.35$ ), a nakon 8 nedelja  $151.20\mu\text{m}$  ( $SD=3.03$ ). T-testom za nezavisne uzorke utvrđeno je da postoji **statistički značajno povećanje** širine koštanih gredica između 4. i 8. nedelje u defektima ispunjenim sitnim granulama Bio-Ossa ( $X^2= -19.506$ ;  $df=8$ ;  $p<0.000$ ).

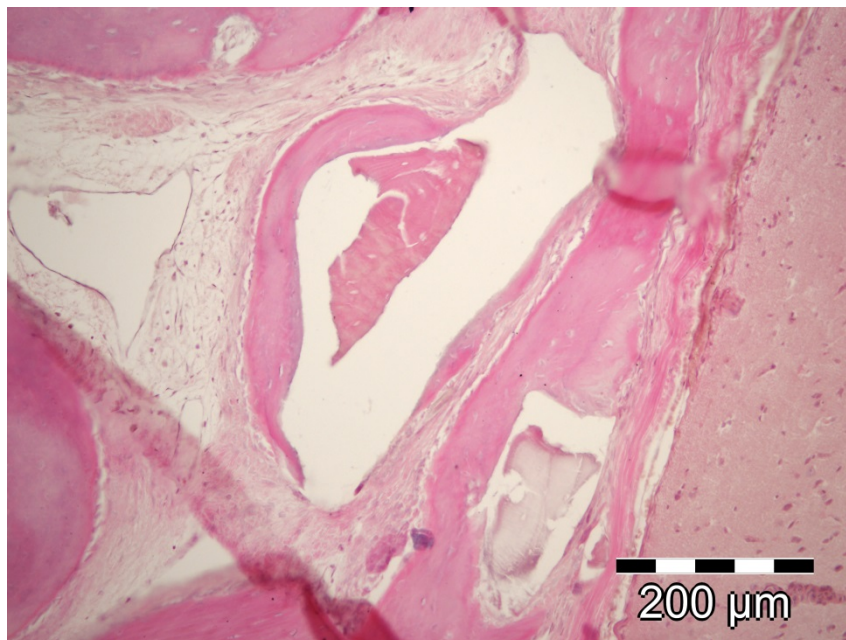
Kod defekata ispunjenih **krupnim granulama Bio-Ossa** srednja vrednost maksimalne širine koštanih gredica nakon 4 nedelje zarastanja iznosila je  $130.40\mu\text{m}$  ( $SD=3.98$ ) dok je nakon 8 nedelja iznosila  $143.60\mu\text{m}$  ( $SD=6.77$ ) (slika 6.2.3.5 i 6.2.3.6). Analizirajući rezultate T-testom za nezavisne uzorke utvrđeno je da je došlo do **statistički značajnog**



**povećanja** širine koštanih gredica između 4. i 8. nedelje kod defekata ispunjenih krupnim granulama Bio-Ossa ( $X^2 = -3.761$ ;  $df=8$ ;  $p < 0.005$ ;  $p = 0.006$ ).



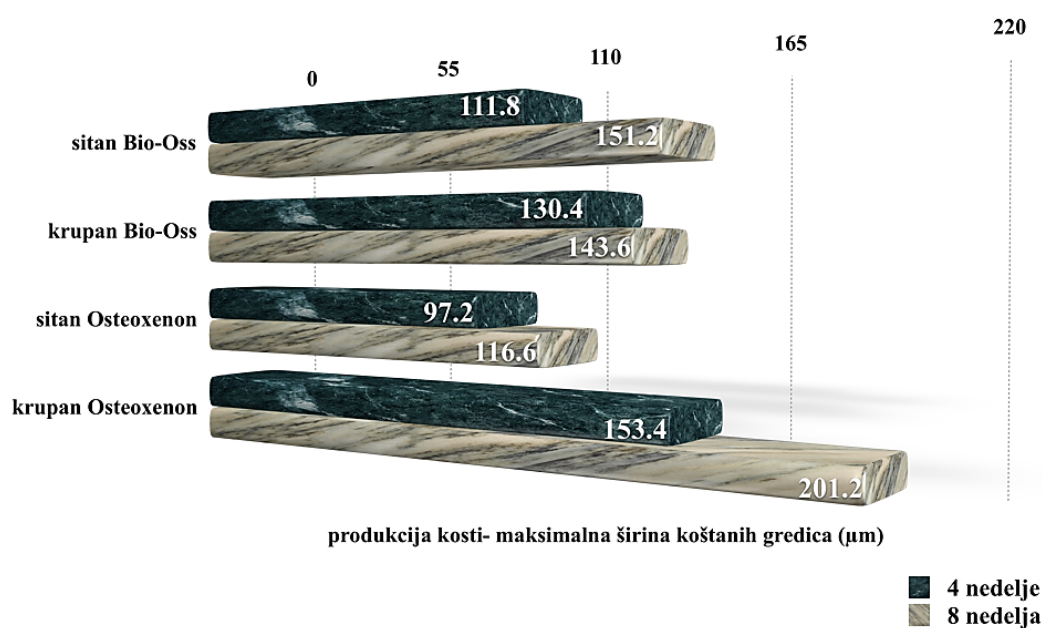
Slika 6.2.3.5. Granule krupnog Bio-Ossa okružene umnoženim vezivno-vaskularnim tkivom i lamelama novostvorenog koštanog tkiva. Novostvoreno koštano tkivo je u bliskom kontaktu sa partikulama Bio-Ossa pokazuje znake umereno regularne mineralizacije uz prisustvo osteoblastnog ruba na površini novostvorene kosti. 8.nedelja zarastanja. (HE x 100)



Slika 6.2.3.6. Detalj s prethodne slike. Novostvoreno koštano tkivo lamelarne građe i lamelnog tipa mineralizacije. Na površini prisutni brojni aktivirani osteoblasti. Vaskularni prostori dilatirani, s prisutnim endotelom. (HE x 200)

Srednja vrednost maksimalne širine koštanih gredica kod defekata ispunjenih **sitnim granulama Osteoxenona** nakon 4 nedelje zarastanja iznosila je 97.20 $\mu$ m (SD=8.93), a nakon 8 nedelja 116.60 $\mu$ m (SD=11.59). Na osnovu T-testa za nezavisne uzorke utvrđeno je da postoji **statistički značajna razlika** na nivou  $p < 0.05$  prema maksimalnoj širini koštanih gredica između 4. i 8 nedelje zarastanja unutar defekata ispunjenih sitnim granulama Osteoxenona ( $X^2 = -2.965$ ;  $df=8$ ;  $p < 0.05$ ,  $p = 0.018$ ).

Kod defekata ispunjenih **krupnim granulama Osteoxenona** srednja vrednost maksimalne širine koštanih gredica nakon 4 nedelje zarastanja iznosila je 153.40 $\mu$ m (SD=4.16) dok je nakon 8 nedelja iznosila 201.20 $\mu$ m (SD=2.86). Analizom T-testa za nezavisne uzorke utvrđeno je da postoji **statistički značajno povećanje** širine koštanih gredica između 4. i 8. nedelje u defektima ispunjenim krupnim granulama Osteoxenona ( $X^2 = -21.166$ ;  $df=8$ ;  $p < 0.000$ ).



Slika 6.2.3.7. Srednje vrednosti maksimalne širine koštanih gredica nakon 4 i 8 nedelja zarastanja u defektima ispunjenim ispitivanim koštanim zamenicima

#### 6.2.4. Određivanje broja džinovskih ćelija tipa oko stranog tela

Tabela 6.2.4.1. Promena broja džinovskih ćelija tipa oko stranog tela kod različitih koštanih zamenika nakon 4 i 8 nedelja zarastanja

	Broj džinovskih ćelija tipa oko stranog tela po mm <sup>2</sup>							
	Sitan Bio-Oss		Krupan Bio-Oss		Sitan Osteoxenon		Krupan Osteoxenon	
	4 nedelje	8 nedelja	4 nedelje	8 nedelja	4 nedelje	8 nedelja	4 nedelje	8 nedelja
N	5	5	5	5	5	5	5	5
$\bar{x}$	7.00	2.80	1.40	1.00	9.60	3.40	0.60	0.60
S. D.	1.00	1.10	0.55	0.71	2.79	0.55	0.55	0.55
Minimum	6	1	1	0	5	3	0	0
Maximum	8	4	2	2	12	4	1	4

Tabela 6.2.4.2. Pregled značajnosti promene broja džinovskih ćelija tipa oko stranog tela kod različitih koštanih zamenika u 4. i 8. nedelji

Ispitivani parametar	Koštani zamenik	Značajnost <sup>a</sup> (razlika između grupa) u 4.nedelji	Značajnost <sup>a/b</sup> (razlika između grupa) u 8.nedelji	Značajnost <sup>a</sup> (razlika između grupa) u 8.nedelji	Značajnost <sup>a/b</sup> (razlika između grupa) u 8.nedelji	Značajnost <sup>c</sup> razlike unutar grupa između 4. i 8. nedelje
Broj džinovskih ćelija tipa oko stranog tela	Sitan Bio-Oss	p<0.000* F=40	<sup>a</sup> p<0.000*	p<0.000* F=16	<sup>a</sup> p<0.000*	p<0.000*
	Krupan Bio-Oss		1 vs. 2 p<0.000*; 1 vs. 3 p=0.070; 1 vs. 4 p<0.000*; 2 vs. 3 p<0.000*;		1 vs. 2 p<0.008*; 1 vs. 3 p<0.605; 1 vs. 4 p<0.002*; 2 vs. 3 p<0.001*; 2 vs. 4 p<0.838; 3 vs. 4 p<0.000*;	p=0.347
	Sitan Osteoxenon		2 vs. 3 p<0.000*; 2 vs. 4 p=0.842; 3 vs. 4 p<0.000*;		2 vs. 3 p<0.001*; 2 vs. 4 p<0.838; 3 vs. 4 p<0.000*;	p=0.001*
	Krupan Osteoxenon					p=1.000

<sup>a</sup>Jednofaktorska analiza varijanse (One-way ANOVA); <sup>b</sup>Post-hoc analiza Tuckey HSD test; <sup>c</sup>T-test za nezavisne uzorke; p-p vrednost za dvosmerno testiranje; \*statistički značajna razlika; F –Fišerov varijasnici količnik

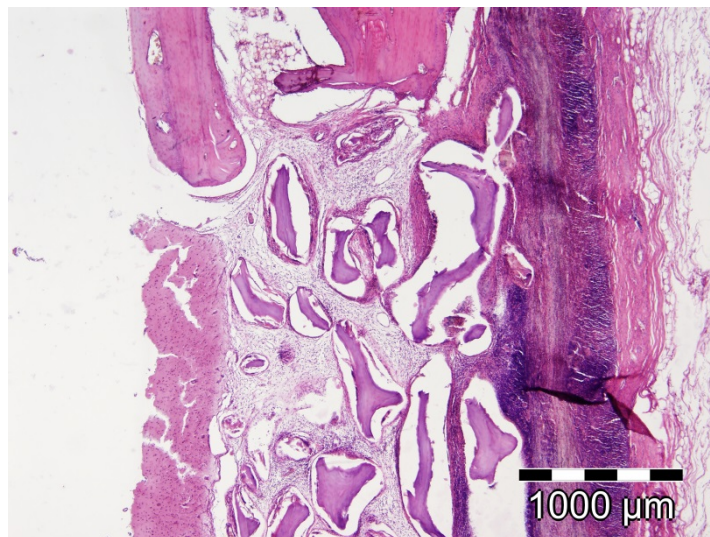
Uticaj vrste koštanog zamenika na broj džinovskih ćelija tipa oko stranog tela analiziran je nakon 4. i 8. nedelji zarastanja. Tabela 6.2.4.1. i slika 6.2.4.5. prikazuju srednje vrednosti broja džinovskih ćelija tipa oko stranog tela izmerene nakon 4 i 8 nedelja u koštanim defektima ispunjenim različitim koštanim zamenicima. **Nakon 4 nedelje**

najmanji broj džinovskih ćelija tipa oko stranog tela po mm<sup>2</sup> imali su defekti ispunjeni krupnim granulama porekla konjske kosti, Osteoxenon ( $\bar{x}=0.60$ ,  $SD=0.55$ ) dok je najveći broj džinovskih ćelija tipa oko stranog tela bio prisutan u defektima ispunjenim sitnim granulama Osteoxenona ( $\bar{x}=9.60$ ,  $SD=2.79$ ) (slika 5.2.4.1 i 5.2.4.2). Jednofaktorskom analizom varijanse utvrđena je statistički značajna razlika na nivou  $p<0.05$  između četiri ispitivane grupe nakon 4 nedelje zarastanja (Tabela 6.2.4.2). Naknadna poređenja pomoću Tuckey-ovog HSD testa između grupa pokazuju statistički značajnu razliku na nivou  $p<0.05$  između defekata ispunjenih sitnim i onih koji su ispunjeni krupnim granulama koštanog zamenika bez obzira na poreklo materijala ( $p<0.000$ ). Suprotno tome, naknadna poređenja pomoću Tuckey-ovog HSD testa između grupa nisu pokazala statističku značajnost prema broju džinovskih ćelija tipa oko stranog tela između defekata ispunjenih sitnim granulama Bio-Ossa i sitnim granulama Osteoxenona kao i između defekata ispunjenih krupnim granulama Bio-Ossa i krupnim granulama Osteoxenona ( $p=0.070$  i  $p=0.842$ , po navedenom redosledu).

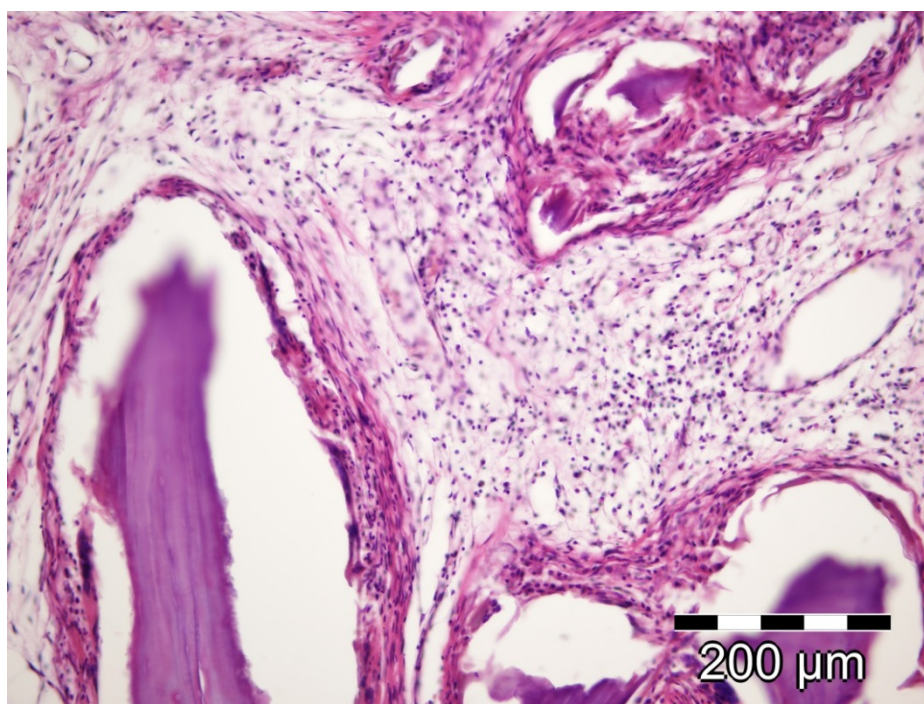
**Nakon 8 nedelja** najveći broj džinovskih ćelija tipa oko stranog tela po mm<sup>2</sup> izmeren je u defektima ispunjenim sitnim granulama Osteoxenona ( $\bar{x}=3.40$ ,  $SD=0.55$ ) (slika 6.2.4.3 i 6.2.4.4) dok je najmanji broj I dalje bio kod defekata ispunjenih krupnim granulama Osteoxenona ( $\bar{x}=0.60$ ,  $SD=0.55$ ). Jednofaktorskom analizom varijanse utvrđena je statistički značajna razlika na nivou  $p<0.05$  između četiri ispitivane grupe nakon 8 nedelja zarastanja (Tabela 6.2.4.2). Naknadna poređenja pomoću Tuckey-ovog HSD testa između grupa pokazuju statistički značajnu razliku na nivou  $p<0.05$  između defekata ispunjenih sitnim i onih koji su ispunjeni krupnim granulama koštanog zamenika bez obzira na poreklo materijala. Suprotno tome, naknadna poređenja pomoću Tuckey-ovog HSD testa između grupa nisu pokazala statističku značajnost prema broju džinovskih ćelija tipa oko stranog tela između defekata ispunjenih sitnim granulama Bio-Ossa i sitnim granulama Osteoxenona kao i između defekata ispunjenih krupnim granulama Bio-Ossa i krupnim granulama Osteoxenona ( $p=0.605$  i  $p=0.838$ , po navedenom redosledu).

U defektima ispunjenim **sitnim granulama Bio-Ossa** nakon 4. nedelje zarastanja srednja vrednost broja broja džinovskih ćelija tipa oko stranog tela iznosila je 7.00 po mm<sup>2</sup> ( $SD=1.00$ ), dok je nakon 8. nedelje iznosila 2.80 ( $SD=1.10$ ). Analizirajući rezultate T-testom za nezavisne uzorke pokazano je da je došlo do **statistički značajnog**

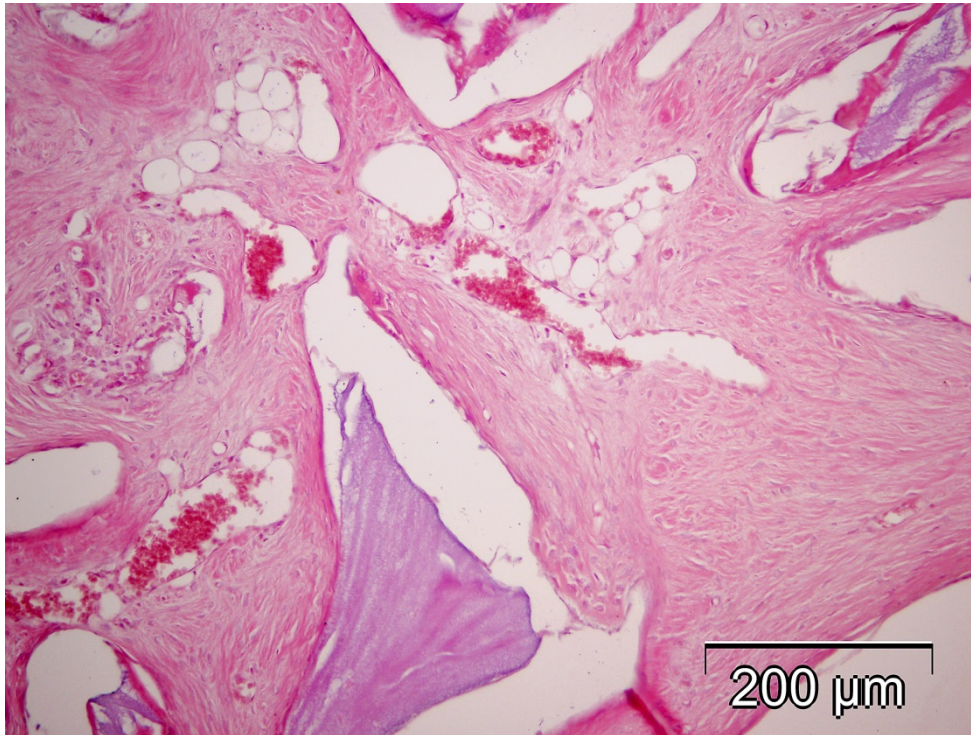
**smanjenja** srednje vrednosti broja džinovskih ćelija tipa oko stranog tela po mm<sup>2</sup> kod defekata ispunjenih sitnim granulama Bio-Ossa između 4. i 8. nedelje zarastanja ( $X^2=6.332$ ;  $df=8$ ;  $p<0.000$ ).



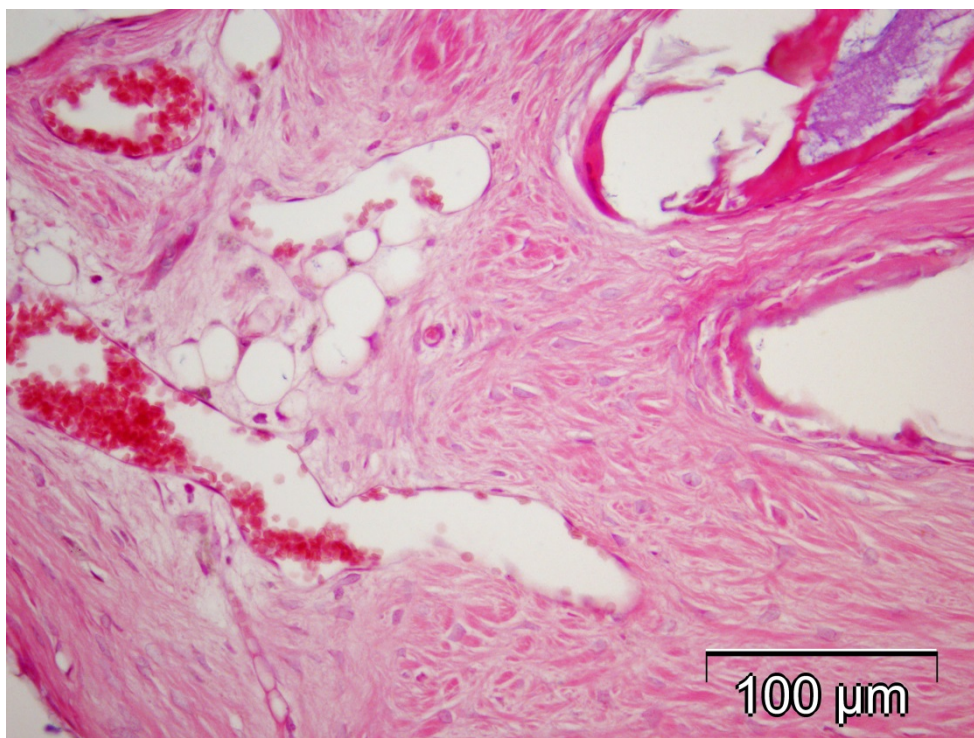
Slika 6.2.4.1. Defekt koštanog tkiva s prisutnim sitnim granulama Osteoxenona. Uočava se prisustvo brojnih džinovskih ćelija tipa oko stranog tela do stvaranja granuloma. 4.nedelja zarastanja. (HE x 40)



Slika 6.2.4.2. Detalj s prethodne slike. Granula sitnog Osteoxenona, brojne džinovske ćelije tipa oko stranog tela koje okružuju partikule koštanog zamenika. U vezivno-vaskularnom tkivu brojni mononuklearni infiltrati tipa limfocita i plazmocita. Oskudni znaci neoangiogeneze. (HE x 200)



Slika 6.2.4.3. Granule sitnog Osteoxenona uz prisustvo vezivnog tkiva, masnog tkiva i pojedinačnih vaskularnih prostora kao i brojne džinovske ćelije tipa oko stranog tela. 8.nedelja zarastanja. (HE x 100)

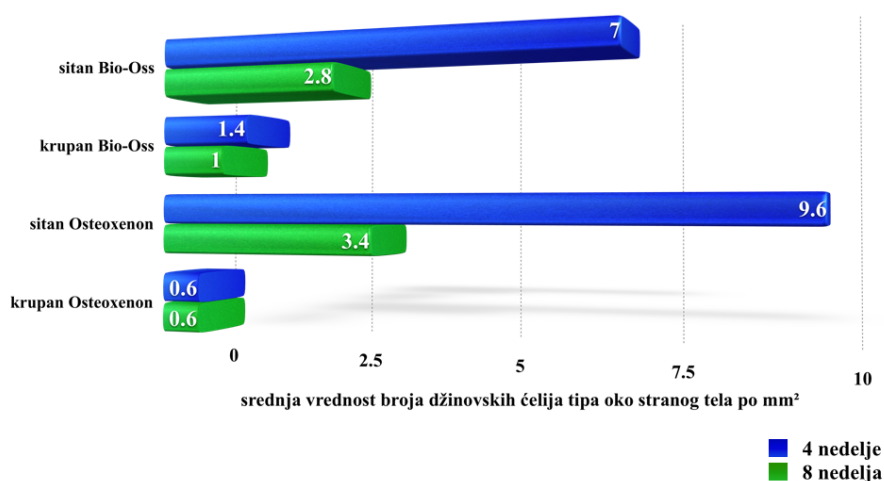


Slika 6.2.4.4. Detalj s prethodne slike. Džinovske ćelije tipa oko stranog tela u bliskom kontaktu sa sitnim granulama Osteoxenona. Veoma oskudna osteoidna produkcija. Vidljive masne ćelije tipa lipocita što odgovara neadekvatnoj koštanoj produkciji. (HE x 200)

Kod defekata ispunjenih **krupnim granulama Bio-Ossa** srednja vrednost broja džinovskih ćelija tipa oko stranog tela po mm<sup>2</sup> nakon 4 nedelje zarastanja iznosila je 1.40 (SD=0.55), dok je nakon 8 nedelja zarastanja srednja vrednost iznosila 1.00 (SD=0.71). T-testom za nezavisne uzorke pokazano je da **nije došlo do statistički značajne promene** broja džinovskih ćelija tipa oko stranog tela u defektima ispunjenim krupnim granulama Bio-Ossa između dva posmatrana vremena ( $X^2=1.000$ ;  $df=8$ ;  $p=0.347$ ).

U defektima ispunjenim **sitnim granulama Osteoxenona** nakon 4. nedelje zarastanja srednja vrednost broja džinovskih ćelija tipa oko stranog tela iznosila je 9.60 po mm<sup>2</sup> (SD=2.79), dok je nakon 8. nedelja iznosila 3.40 (SD=0.55). Analizirajući rezultate T-testom za nezavisne uzorke pokazano je da je **došlo do statistički značajnog smanjenja** broja džinovskih ćelija tipa oko stranog tela između 4. i 8. nedelje kod defekata ispunjenih sitnim granulama Osteoxenona ( $X^2=4.871$ ;  $df=8$ ;  $p=0.001$ ).

U 4. nedelji zarastanja srednja vrednost broja džinovskih ćelija tipa oko stranog tela u defektima ispunjenim **krupnim granulama Osteoxenona** iznosila je 0.60 po mm<sup>2</sup> (SD=0.55), dok je nakon 8. nedelja vrednost bila nepromenjena ( $\bar{x}=0.60$ ;  $SD=0.89$ ). T-testom za nezavisne uzorke utvrđeno je da **nema statistički značajne razlike** u broju džinovskih ćelija tipa oko stranog tela po mm<sup>2</sup> kod defekata ispunjenih krupnim granulama Osteoxenona između 4. i 8. nedelje zarastanja ( $X^2=0.000$ ;  $df=8$ ;  $p=1.000$ ).



Slika 6.2.4.5. Srednje vrednosti broja džinovskih ćelija tipa oko stranog tela nakon 4 i nakon 8 nedelja zarastanja u defektima ispunjenim ispitivanim koštanim zamenicama

## 6.2.5. Karakteristike endotela

Tabela 6.2.5.1. Karakteristike endotela kod različitih koštanih zamenika nakon 4 nedelje

Materijal		Jasan u nizu	Jasan sa pojedinačnim ćelijama	Teško uočljiv u nizu	Teško uočljiv sa pojedinačnim ćelijama	Total	Značajnost <sup>a</sup> u 4.nedelji
Sitan Bio-Oss	N %	4 80.0%	0 0%	0 0%	1 20.0%	5 100%	X <sup>2</sup> =29.200 df=9 p<0.05; p=0.01*
Krupan Bio-Oss	N %	0 0%	4 80.0%	1 20.0%	0 0%	5 100%	
Sitan Osteoxenon	N %	0 0%	1 20.0%	4 80.0%	0 0%	5 100%	
Krupan Osteoxenon	N %	1 20.0%	1 20.0%	0 0%	3 60.0%	5 100%	

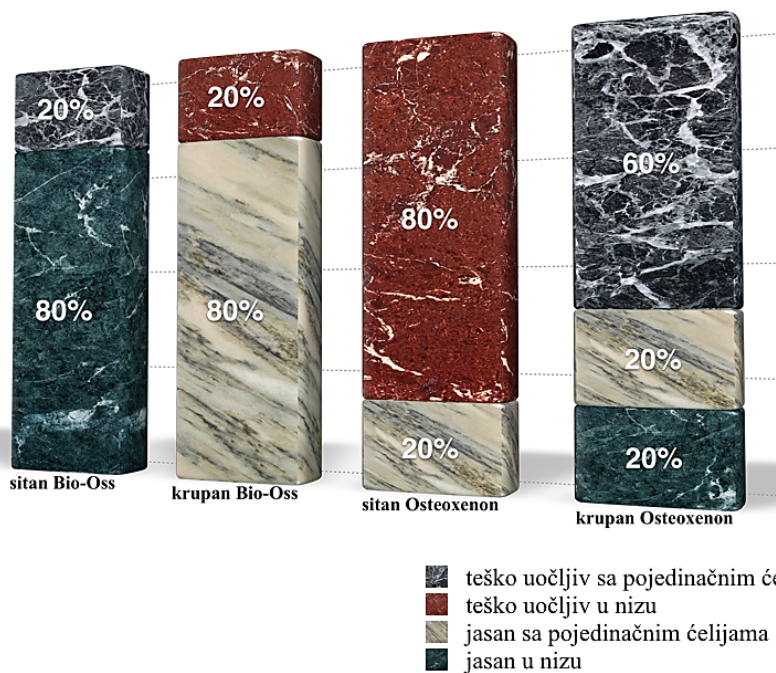
<sup>a</sup>Pirsonov Hi-kvadrat test; \* statistički značajna razlika

Tabela 6.2.5.2. Karakteristike endotela kod različitih koštanih zamenika nakon 8 nedelja

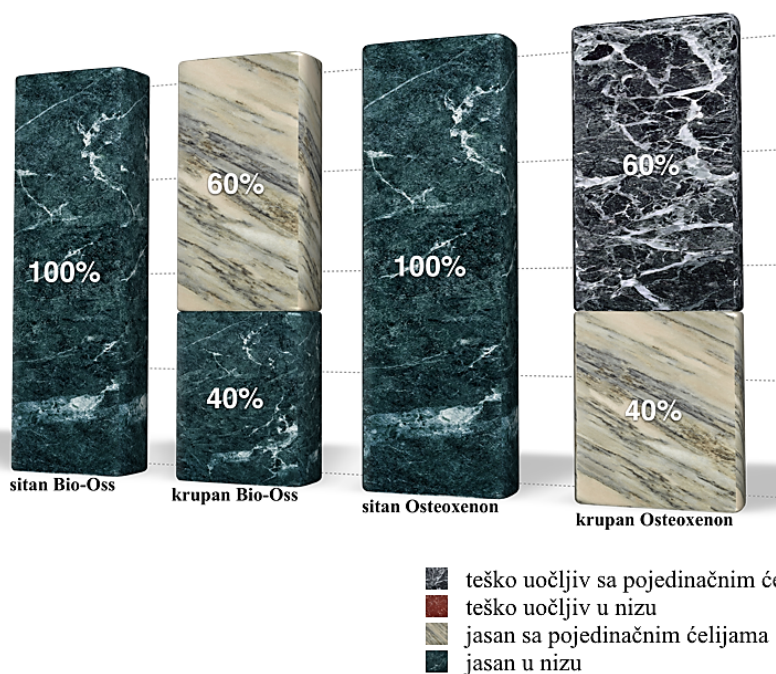
Materijal		Jasan u nizu	Jasan sa pojedinačnim ćelijama	Teško uočljiv u nizu	Teško uočljiv sa pojedinačnim ćelijama	Total	Značajnost <sup>a</sup> u 8.nedelji
Sitan Bio-Oss	N %	5 100.0%	0 0%	0 0%	0 0%	5 100%	X <sup>2</sup> =20.400 df=6 p<0.05; p=0.02*
Krupan Bio-Oss	N %	2 40.0%	3 60.0%	0 0%	0 0%	5 100%	
Sitan Osteoxenon	N %	5 100.0%	0 0%	0 0%	0 0%	5 100%	
Krupan Osteoxenon	N %	0 0%	2 40.0%	0 0%	3 60.0%	5 100%	

<sup>a</sup>Pirsonov Hi-kvadrat test; \* statistički značajna razlika





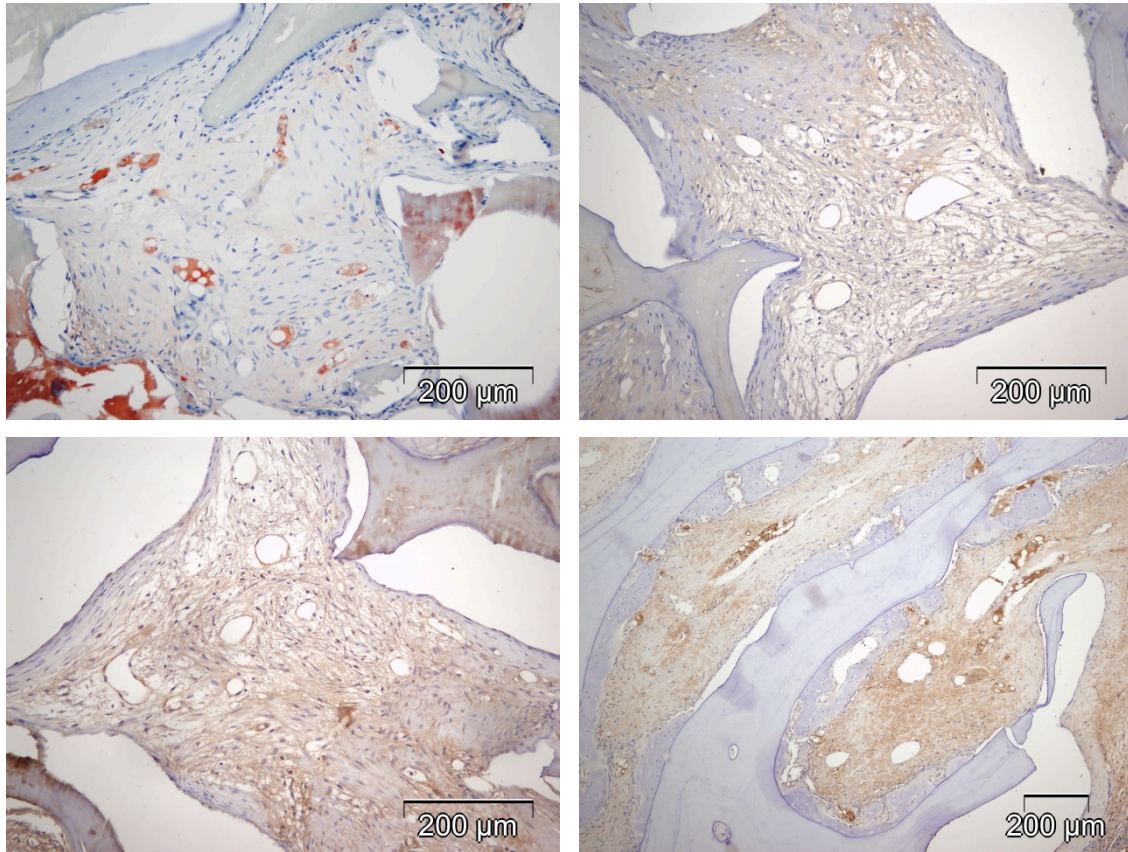
Slika 6.2.5.1. Semikvantitativna analiza strukture endotela kod defekata ispunjenim različitim koštanim zamenicama nakon 4 nedelje



Slika 6.2.5.2. Semikvantitativna analiza strukture endotela kod defekata ispunjenim različitim koštanim zamenicama nakon 8 nedelja

Posmatrajući strukturu endotela u defektima ispunjenim ispitivanim koštanim zamenicama **nakon 4 nedelje** zarastanja, nađeno je da nijedan materijal nije pokazao prisustvo jasnog endotela u nizu u svih pet defekata (100%). Jasno formirani endotel u nizu bio je prisutan u 80% defekata ispunjenih sitnim granulama Bio-Ossa (4 defekta) i u 20% defekata ispunjenih krupnim granulama kosti konjskog porekla (1 defekt). Najveći procenat defekata koji je pokazao prisustvo teško uočljivog endotela sa pojedinačnim ćelijama bio je ispunjen krupnim granulama kosti konjskog porekla (60%), dok je prisustvo ovakvog endotela uočeno i u jednom defektu ispunjenom sitnim granulama Bio-Ossa (20%). Distribucija strukture endotela po defektima prikazana je u tabeli 5.2.5.1. Analizirajući dobijene rezultate Hi-kvadrat testom dobijena je statistički značajna razlika na nivou  $p < 0.05$  između četiri posmatrane grupe prema strukturi endotela ( $X^2=29.200$ ,  $df=9$ ,  $p < 0.05$ ,  $p=0.01$ ). Slika 6.2.5.1 prikazuje zastupljenost strukture endotela u defektima ispunjenim različitim koštanim zamenicama nakon 4 nedelje zarastanja.

**Nakon 8 nedelja** zarastanja defekti ispunjeni sitnim granuloma Bio-Ossa i Osteoxenona pokazali su prisustvo jasno formiranog endotela u nizu u svih pet defekata (100%). Pri korišćenju krupnih granula Bio-Ossa i Osteoxenona zastupljenost jasno formiranog endotela sa pojedinačnim ćelijama po defektima iznosila je 60% i 40%, po pomenutom redosledu. Teško uočljiv endotel sa pojedinačnim ćelijama bio je prisutan samo u defektima ispunjenim krupnim granuloma Osteoxenona (3 defekta; 60%). Nakon 8 nedelja ni u jednom defektu, bez obzira na primenjeni koštani zamenik, nije registrovan teško uočljiv endotel sa ćelijama u nizu (tabela 6.2.5.2). Analizirajući dobijene rezultate Hi-kvadrat testom dobijena je statistički značajna razlika između četiri posmatrane grupe prema strukturi endotela ( $X^2=20.400$ ,  $df=6$ ,  $p < 0.05$ ,  $p=0.02$ ). Slika 6.2.5.2 grafički prikazuje zastupljenost strukture endotela u defektima ispunjenim različitim koštanim zamenicama nakon 8 nedelje zarastanja.



Slika 6.2.5.3. Imunohistohemijski prikaz neoangiogeneze primenom primarnih antitela: CD31, CD34, FVIII i trombomodulin. Endotel vidljiv u svim vaskularnim prostorima (CD34+), mestimično nezreo (CD34+, CD31+) a mestimično funkcionalno aktivan (FVIII+, trombomodulin+).

## 6.2.6. Intenzitet zapaljenja

Tabela 6.2.6.1. Intenzitet zapaljenja kod različnih koštanih zamenika nakon 4 nedelje

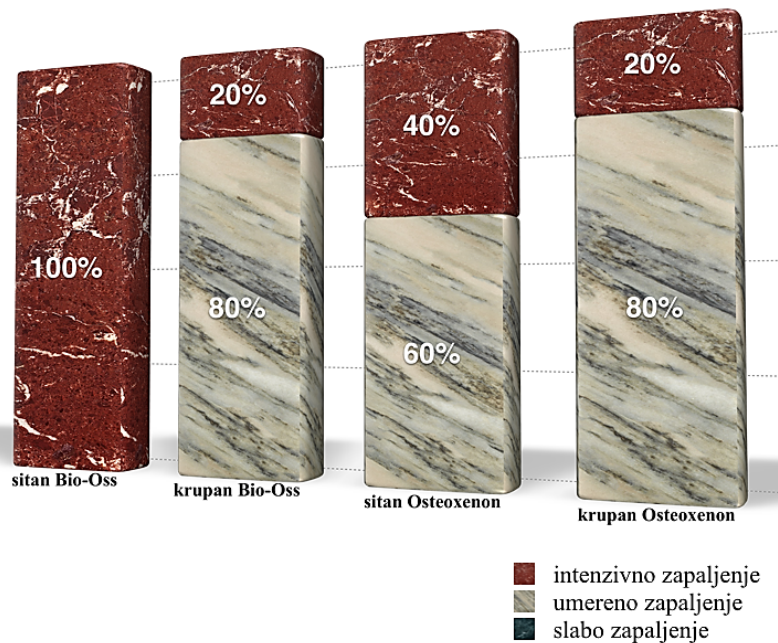
Materijal		Slabo zapaljenje	Umereno zapaljenje	Intenzivno zapaljenje	Total	Značajnost <sup>a</sup> u 4.nedelji
Sitan Bio-Oss	broj %	0 0%	0 0%	5 100.0%	5 100%	$X^2=8.687$ $df=3$ $p<0.05$ ; $p=0.034^*$
Krupan Bio-Oss	broj %	0 0%	4 80.0%	1 20.0%	5 100%	
Sitan Osteoxenon	broj %	0 0%	3 60.0%	2 40.0%	5 100%	
Krupan osteoxenon	broj %	0 0%	4 80.0%	1 20.0%	5 100%	

<sup>a</sup>Pirsonov Hi-kvadrat test; \* statistički značajna razlika

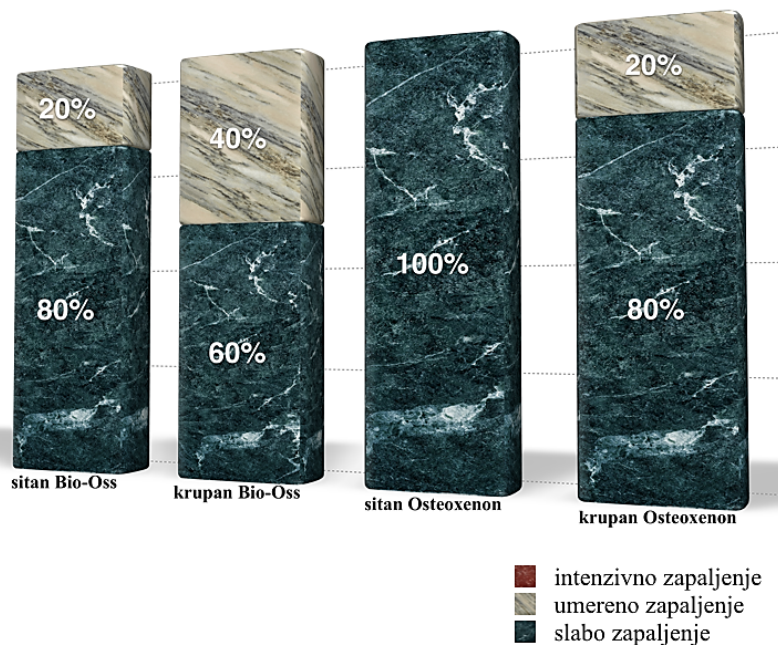
Tabela 6.2.6.2. Intenziteta zapaljenja kod različnih koštanih zamenika nakon 8 nedelja

Materijal		Slabo zapaljenje	Umereno zapaljenje	Intenzivno zapaljenje	Total	Značajnost <sup>a</sup> u 8.nedelji
Sitan Bio-Oss	broj %	4 80.0%	1 20.0%	0 0%	5 100%	$X^2=2.500$ $df=3$ $p<0.05$ ; $p=0.475$
Krupan Bio-Oss	broj %	3 60.0%	2 40.0%	0 0%	5 100%	
Sitan Osteoxenon	broj %	5 100.0%	0 0%	0 0%	5 100%	
Krupan osteoxenon	broj %	4 80.0%	1 20.0%	0 0%	5 100%	

<sup>a</sup>Pirsonov Hi-kvadrat test



Slika 6.2.6.1. Semikvantitativna analiza intenziteta zapaljenja kod defekata ispunjenih različitim koštanim zamenicima nakon 4 nedelje



Slika 6.2.6.2. Semikvantitativna analiza intenziteta zapaljenja kod defekata ispunjenih različitim koštanim zamenicima nakon 8 nedelje

Analizirajući intenzitet zapaljenja unutar defekata ispunjenih ispitivanim koštanim zamenicama **nakon 4 nedelje** zarastanja utvrđeno je intenzivno zapaljenje u 100% defekata ispunjenih sitnim granulama Bio-Ossa (5 defekata). U defektima ispunjenim sitnim granulama Osteoxenona uočeno je prisustvo umerenog i intenzivnog zapaljenja (60% i 40%, po pomenutom redosledu). Distribucija intenziteta zapaljenja unutar defekata ispunjenih krupnim granulama bila je identična bez obzira na karakteristike ispitivanog materijala. Umereno zapaljenje zabeleženo je u 80% defekata dok je intenzivno zabeleženo u 20% defekata. Prisustvo slabog zapaljenja nije zabeleženo u nijednom defektu. Distribucija intenziteta zapaljenja po defektima nakon 4 nedelje zarastanja prikazana je u tabeli 6.2.6.1 i na slici 6.2.6.1. Analizirajući dobijene rezultate Hi-kvadrat testom dobijena je statistički značajna razlika na nivou  $p < 0.05$  između četiri posmatrane grupe prema intenzitetu zapaljenja ( $X^2=8.687$ ,  $df=3$ ,  $p < 0.05$ ,  $p=0.034$ ).

**Nakon 8 nedelja** zarastanja zabeleženo je odsustvo intenzivnog zapaljenja unutar defekata. Defekti ispunjeni sitnim granulama Osteoxenona pokazali su karakteristike slabog zapaljenja u 100% slučajeva (5 defekata). Unutar defekata ispunjenih sitnim granulama Bio-Ossa slabo zapaljenje je uočeno u 80% defekata (4 defekta) dok je samo jedan defekt pokazivao znake umerenog zapaljenja (20%). Kod defekata ispunjenih krupnim granulama Bio-Ossa uočeno je prisustvo slabog i umerenog zapaljenja (60% i 40%, po navedenom redosledu). U defektima ispunjenim krupnim granulama Osteoxenona slabo zapaljenje bilo je prisutno u 80% slučajeva dok je samo jedan defekt pokazivao karakteristike umerenog zapaljenja (20%). Distribucija intenziteta zapaljenja po defektima nakon 8 nedelja zarastanja prikazana je u tabeli 6.2.6.2 i na slici 6.2.6.2. Analizirajući dobijene rezultate Hi-kvadrat testom nije dobijena statistički značajna razlika na nivou  $p < 0.05$  između četiri posmatrane grupe prema intenzitetu zapaljenja ( $X^2=2.500$ ,  $df=3$ ,  $p=0.475$ ).

### 6.2.7. Intenzitet mikrokrvarenja

Tabela 6.2.7.1. Intenzitet mikrokrvarenja kod različitih koštanih zamenika nakon 4 nedelje

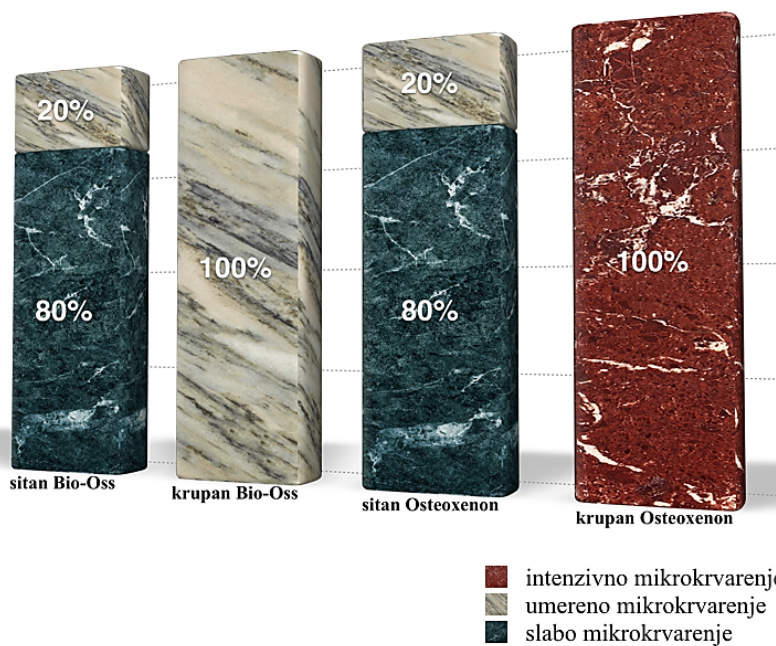
Materijal		Slabo mikrokrvarenje	Umereno mikrokrvarenje	Izraženo mikrokrvarenje	Total	Značajnost <sup>a</sup> u 4.nedelji
Sitan Bio-Oss	broj %	4 80.0%	1 20.0%	0 0%	5 100%	$X^2=31.429$ $df=6$ $p<0.05$ ; $p=0.000^*$
Krupan Bio-Oss	broj %	0 0%	5 100.0%	0 0%	5 100%	
Sitan Osteoxenon	broj %	4 80.0%	1 20.0%	0 0%	5 100%	
Krupan osteoxenon	broj %	0 0%	0 0%	5 100.0%	5 100%	

<sup>a</sup>Pirsonov Hi-kvadrat test; \*statistički značajna razlika

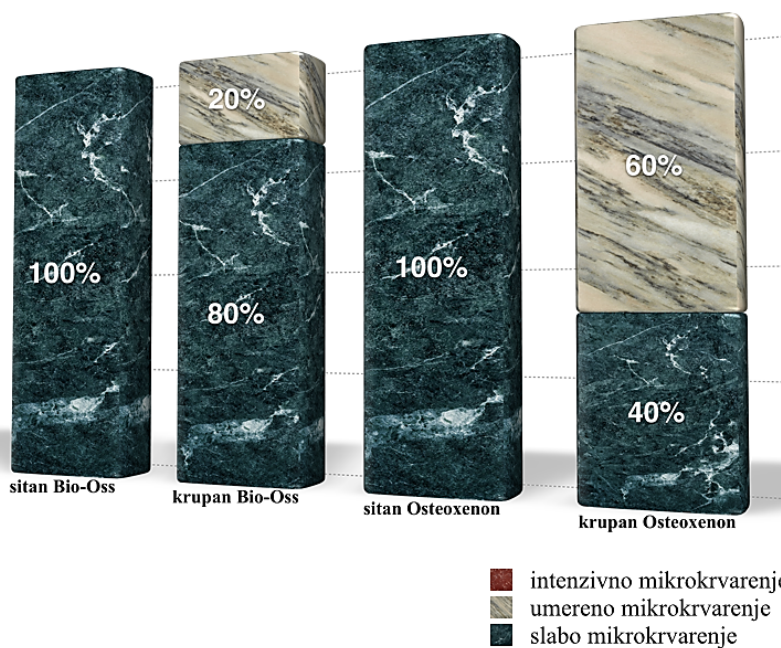
Tabela 6.2.7.2. Intenzitet mikrokrvarenja kod različitih koštanih zamenika nakon 8 nedelja

Materijal		Slabo mikrokrvarenje	Umereno mikrokrvarenje	Izraženo mikrokrvarenje	Total	Značajnost <sup>a</sup> u 8.nedelji
Sitan Bio-Oss	broj %	5 100.0%	0 0%	0 0%	5 100%	$X^2=7.500$ $df=3$ $p<0.05$ ; $p=0.058$
Krupan Bio-Oss	broj %	4 80.0%	1 20.0%	0 0%	5 100%	
Sitan Osteoxenon	broj %	5 100.0%	0 0%	0 0%	5 100%	
Krupan osteoxenon	broj %	2 40.0%	3 60.0%	0 0%	5 100%	

<sup>a</sup>Pirsonov Hi-kvadrat test



Slika 6.2.7.1. Semikvantitativna analiza intenziteta mikrokrvarenja kod defekata ispunjenih različitim koštanim zamenicima nakon 4 nedelje



Slika 6.2.7.2. Semikvantitativna analiza intenziteta mikrokrvarenja kod defekata ispunjenih različitim koštanim zamenicima nakon 8 nedelja



Analizirajući intenzitet mikrokrvarenja **nakon 4 nedelje** zarastanja uočeno je da su defekti ispunjeni sitnim granulama Bio-Ossa pokazali u 80% slučajeva slabo mikrokrvarenje dok je samo jedan defekt (20%) ukazivao na prisustvo umerene ekstravazacije eritrocita. Isti rezultati karakterisali su i defekte ispunjene sitnim granulama Osteoxenona. Suprotno tome, u defektima ispunjenim krupnim granulama Bio-Ossa umereno mikrokrvarenje bilo je prisutno u 100% slučajeva (5 defekata), dok su defekti ispunjeni krupnim granulama Osteoxenona pokazivali izraženo mikrokrvarenje u svih 5 defekata (100% slučajeva). Distribucija intenziteta mikrokrvarenja po defektima nakon 4 nedelje zarastanja prikazana je u tabeli 6.2.7.1. i na slici 6.2.7.2. Analizirajući dobijene rezultate Hi-kvadrat testom dobijena je statistički značajna razlika na nivou  $p < 0.05$  između četiri posmatrane grupe prema intenzitetu mikrokrvarenja ( $X^2=31.429$ ,  $df=6$ ,  $p < 0.000$ ).

**Nakon 8 nedelja** zarastanja defekti ispunjeni sitnim granulama biomaterijala, bez obzira na njihovo poreklo, pokazivali su prisustvo slabog mikrokrvarenja u 100% slučajeva. U defektima ispunjenim krupnim granulama Bio-Ossa slabo mikrokrvarenje uočeno je u 80% defekata (4 defekta) dok je samo jedan defekt ukazivao na prisustvo umerenog mikrokrvarenja (20%). U slučaju korišćenja krupnih granula Osteoxenona, unutar defekata je uočeno slabo mikrokrvarenje u 40% slučajeva (2 defekta) dok je u 60% slučajeva (3 defekta) registrovano prisustvo umerene ekstravazacije eritrocita. Distribucija intenziteta mikrokrvarenja po defektima nakon 8 nedelja zarastanja prikazana je u tabeli 6.2.7.2. i na slici 6.2.7.2. Analizirajući dobijene rezultate Hi-kvadrat testom nije dobijena statistički značajna razlika na nivou  $p < 0.05$  između četiri posmatrane grupe prema intenzitetu mikrokrvarenja ( $X^2=7.500$ ,  $df=3$ ,  $p=0.058$ ).

## 7. DISKUSIJA

Koštano tkivo, bogato faktorima rasta i celularnim elementima, karakteriše izražen regenerativni potencijal što omogućava da manji koštani defekti zarastaju spontano pri čemu novoformirano tkivo, strukturno i funkcionalno, u potpunosti odgovara prvobitnom tkivu. Međutim, kod defekata kritične veličine defekti samo delimično bivaju ispunjeni koštanim, dok istovremeno jedan deo defekta biva popunjen i fibroznim tkivom. To ukazuje da pored regeneracije ovi defekti delimično zarastaju i reparacijom.

Terapija ovakvih defekata ima za cilj stvaranje mikrosredine koja će omogućiti koštano zarastanje i nadoknadu izgubljenog volumena koštanog tkiva. U ove svrhe koriste se različite hirurške tehnike. Tehnika vođene regeneracije kosti (Guided Bone Regeneration – GBR), kao jedna od najčešće primenjivanih, bazirana je na primeni barijerne membrane kao fizičke barijere koja sprečava prodor neosteogenih, slabo diferentovanih, brzo proliferišućih ćelija okolnog vezivnog i epitelnog tkiva u koštani defekt (90, 132, 133). Na taj način je omogućena neometana migracija osteoprogenitornih i angiogenih ćelija iz zidova koštanog defekta i stvaranje pogodne mikrosredine za uspešnu koštanu regeneraciju (7). Pored barijernih membrana koriste se i koštani zamenici različitog porekla. Oni ne samo da pružaju mehaničku potporu membrani sprečavajući njen kolaps ka defektu već različitim mehanizmima utiču i na regeneraciju koštanih defekata (10, 134, 135). Autologna kost se smatra „zlatnim standardom” u rekonstrukciji koštanih defekata, jer jedina među koštanim zamenicima poseduje osteogeni, osteoinduktivni i osteokonduktivni potencijal(136). Međutim, primena autologne kosti zahteva sekundarno hirurško polje, veći stepen morbiditeta i produžava trajanje hirurške intervencije (137, 138). Uz to, ograničen volumen raspoložive kosti i brza i nepredvidiva stopa resorpcije predstavljaju (139, 140) značajan nedostatak primene autolognih koštanih zamenika. Kako bi se prevazišli navedeni nedostaci, autologna kost biva zamenjena alogenim, ksenogenim ili aloplastičnim koštanim zamenicima. Optimalno bi bilo da hemijski sastav, poroznost, distribucija pora po veličini, ukupna površina i tekstura koštanih zamenika budu što sličniji humanoj kosti.

Strukturne karakteristike humane kosti su blisko povezane sa funkcionalnim zahtevima određene anatomske regije. One mogu pokazivati čitavu paletu strukturnih varijacija od izrazito trabekularne kosti sa 90% poroznosti do solidne, kortikalne kosti sa poroznošću od 3% (141, 142). Shodno tome, biomaterijali koji se koriste u regenerativnim procedurama pored odgovarajućeg hemijskog sastava moraju posedovati određene morfološke i mikrostrukturne karakteristike koje odgovaraju humanoj kosti i koje igraju ključnu ulogu u njihovoj integraciji sa okolnim koštanim tkivom (143, 144). To je ujedno i osnovni razlog zašto su u ovom istraživanju isključivo korišćeni prirodni biomaterijali (biomaterijali ksenogenog porekla – goveđeg i konjskog). Bio-Oss (goveđeg porekla) i Osteoxenon (konjskog porekla) su prirodni materijali čija se mineralna komponenta formira na prethodno nastaloj organsko-kolagenoj osnovi (32), kao što je slučaj sa formiranjem humane kosti. U procesu obrade izlagani su niskim temperaturama čime mineralna komponenta u vidu poroznog hidroksiapatita ostaje nepromenjena. Hemijski sastav Bio-Ossa je skoro identičan sastavu humanog koštanog minerala sa ukupnom poroznošću od oko 75% i strukturom koju čini bimodalna distribucija pora (33). Pored toga, kompresivna čvrstoća goveđe kosti je vrlo bliska humanoj (145) čime se postiže neometana distribucija opterećenja kroz regiju u čijoj regeneraciji učestvuje goveđa kost (146). Kada je u pitanju kost konjskog porekla (Osteoxenon), iako je njena poroznost bliska humanoj kosti, poroznost goveđe kosti u većoj meri odgovara poroznosti humane kosti (147). Međutim, hrapavost površine konjske kosti je najbližnja karakteristikama humane kosti (147).

U našem istraživanju, mikroCT analizom nasumično odabranih granula pomenutih biomaterijala definisane su strukturne karakteristike kojima se mogu objasniti njihove razlike u *in vivo* ponašanju. Ovakvom vrstom analize dobijaju se podaci o dva tipa pora – otvorenim i zatvorenim, a zbir njihovih volumena odgovara ukupnoj zapremini pora. Zapremina otvorenih pora se odnosi na onu frakciju ukupnog volumena koja je dostupna uplivu fluida. S druge strane, volumen zatvorenih pora odnosi se na onu zapreminu u koju fluidi ne mogu da dospeju. S obzirom da su nedostupne za fluide i celularne elemente, zatvorene pore su praktično bez funkcije. Kada se radi o mikroCT ispitivanju prirodne kosti, nazivi „zatvorene pore” i „zatvorena poroznost” predstavljaju terminološku grešku iako je njena primena utemeljena u savremenoj literaturi. Zapravo, mikroarhitekturu native kosti predstavlja porozni sistem sa Haverzovim i

Volkmanovim kanalim koji su preko koštanih kanalića povezani s osteocitnim lakunama formirajući otvoreni porozni sistem. U sprovedenom istraživanju, tehnička ograničenja mikroCT opreme bazirana su na pravljenju slike gde vrednost jednog piksela odgovara jednom mikrometru. Kao posledica toga, na skeniranom objektu ne mogu se videti strukture manje od jednog mikrometra tj. kanalikularni sistem koji povezuje mikropore već se one vide kao zatvorene, međusobno nezavisne porozne strukture. Iz tog razloga, kada je u pitanju prirodna kost čini se da je mnogo preciznije podatke koji se odnose na zatvorenu poroznost interpretirati kao „mikroporoznost” što je i primenjeno u daljem toku diskusije. S obzirom da je mikroCT analiza obuhvatila skeniranje pojedinačno prezentovane granule van konglomerata, bilo je neophodno metodološki adekvatno definisati pojam otvorenih pora tj. njihovu granicu. Na osnovu postojeće literature poznato je da je vrednost dijametra pore spongiozne kosti veličine do 500 $\mu$ m, što su u metodologiji svoje studije primenili i Ylä-Soininmäki i sar. Stoga, u sprovedenom istraživanju spoljašnja granica otvorenih pora je dobijena naprednom poluautomatskom softverskom funkcijom koja je podrazumevala premošćavanje otvorenih pora veličine do 500 $\mu$ m, uz primenjenu dinamičku interpolaciju pri kreiranju konačnog volumena od interesa.

Eksperimentalno ispitivanje biomaterijala u *in vivo* uslovima podrazumeva korišćenje različitih animalnih modela koje se bazira na sličnosti i analogiji fizioloških i patoloških procesa između životinje i čoveka. Na osnovu toga, evidentno je da što je životinja filogenetski bliža čoveku i što su anatomske sličnosti veće to su i molekularna osnova i biohemijski mehanizmi sličniji onima u humanom tkivu. Kunići predstavljaju široko korišćeni animalni model u istraživanjima oseointegracije različitih biomaterijala. Glavna prednost korišćenja kunića, pored njihovog lakog održavanja i lake manipulacije u toku i nakon hirurgije, jeste brzo dostizanje skeletne zrelosti (nakon 6-8 meseci) i brzo zarastanje koštanog tkiva (149). Defekti na kranijumu kunića čine adekvatan model za procenu koštane regeneracije što je uslovljeno prisustvom dovoljne količine kostne srži koja obezbeđuje izvor vaskularnih elemenata neophodnih za uspešnu regeneraciju (150, 151). Uz to, kunići imaju veći svod lobanje u odnosu na pacove, što omogućava formiranje većeg broja defekata smanjujući tako mogućnost greške uslovljene individualnim razlikama. Proces zarastanja i remodelovanja koštanog tkiva kod kunića je oko tri puta brži u odnosu na proces zarastanja humanog koštanog tkiva pa tako period

praćenja od 4 nedelje odgovara ranoj fazi zarastanja kod čoveka, dok period praćenja od 8 nedelja odgovara kasnoj fazi zarastanja (152-154).

Angiogeneza je proces koji prostorno i vremenski prethodi osteogenezi (77, 155). Shodno tome, integracija koštanih zamenika zavisi od razvijenosti mikrovaskularne mreže u augmentiranoj regiji (156, 157) čime se obezbeđuje mikrosredina bogata funkcionalnom vaskularnom mrežom. Jedan od metoda procene prisustva krvnih sudova u tkivu jeste brojanje krvnih sudova čime se definiše gustina mikrovaskularne mreže (microvessel density – MVD) (158). U ovom istraživanju, stepen neoangiogeneze granuliranih koštanih zamenika procenjivan je nakon 4 i nakon 8 nedelja zarastanja. U regenerišućoj kosti zabeležen je značajno veći broj krvnih sudova kod primene krupnih granula biomaterijala u odnosu na defekte ispunjene sitnim granulama. Ovakav rezultat se može objasniti većim intergranularnim prostorima koji se formiraju primenom krupnih granula biomaterijala. Tako izražena makroporoznost koštanog agregata omogućava lakše prorastanje krvnih sudova kroz implantirani materijal (159, 160). Takođe, povećanjem veličine granula u granuliranom agregatu povećava se i udeo pora većih od 250 $\mu$ m što ide u prilog većoj ukupnoj poroznosti granuliranog agregata (160). Pore malog dijametra, od 25-50  $\mu$ m, samo u ograničenom stepenu podržavaju revaskularizaciju dok biomaterijali sa porama većeg promera (50-100 i 100-150 $\mu$ m) obezbeđuju dovoljno prostora za formiranje zrelog vaskularizovanog tkiva kroz čitav volumen materijala (161). Takođe, materijali čije su pore veće od 140 $\mu$ m ne samo da obezbeđuju brže formiranje i prorastanje novih krvnih sudova već je i gustina kapilarne mreže veća u odnosu na materijale sa manjim dijametrom pora (162). Medjutim, postoji optimalan opseg u okviru koga makropora ispunjava svoju funkciju. Eksperimentalno je pokazano da ne postoji razlika u stepenu revaskularizacije ukoliko se dimenzija pora povećava iznad 400 $\mu$ m (105). Komercijalno dostupni koštani zamenici, bez obzira što se najčešće mogu naći u formi sitnih i krupnih granula, obično nemaju međusobno uniformnu veličinu granula, jer je raspon veličine granula u okviru pakovanja relativno veliki. U ovom istraživanju od krupnih granula korišćeni su Osteoxenon (2000-3000 $\mu$ m) i Bio-Oss (1000-2000 $\mu$ m). Nakon 8 nedelja zarastanja gustina vaskularne mreže kod primene krupnih granula Osteoxenona bila je statistički značajno veća u odnosu na krupne granule Bio-Ossa ( $p=0.004$ ). S obzirom na to da Osteoxenon čine granule koje su za oko 1000 $\mu$ m veće u odnosu na krupne granule Bio-Ossa, ovakav

rezultat je najverovatnije uslovljen razlikom u veličini krupnih granula. Pored toga, mikroCT analiza je ukazala na različitu distribuciju veličine pora kod pomenutih granula što može objasniti razliku u gustini vaskularne mreže. Naime, veća zastupljenost pora u rasponu od 140-400 $\mu$ m kod granula Osteoxenona u odnosu na Bio-Oss čini ove granule pogodnijim za vaskularno prorastanje (Osteoxenon – 59.93% u odnosu na ukupnu poroznost; Bio-Oss – 53.06% u odnosu na ukupnu poroznost). S druge strane, pore čija je veličina u rasponu od 11-50 $\mu$ m su procentualno mnogo manje zastupljene u granuli Osteoxenona (Osteoxenon – 6.80% u odnosu na ukupnu poroznost; Bio-Oss – 12.84% u odnosu na ukupnu poroznost). Navedene strukturne razlike u poroznom sistemu krupnih granula Osteoxenona i Bio-Ossa mogu biti odgovorne za različit stepen njihove revaskularizacije. Takođe, uočena je i razlika u revaskularizaciji defekata ispunjenih sitnim granulama pomenutih biomaterijala. Defekti ispunjeni sitnim granulama Bio-Ossa pokazali su značajno veći broj krvnih sudova po mm<sup>2</sup> kako u ranoj tako i kasnoj fazi zarastanja ( $p < 0.000$ , u obe faze zarastanja). Iako je po navodima proizvođača raspon dimenzija sitnih granula Bio-Ossa 250-1000 $\mu$ m, laser difrakcionom spektrometrijom utvrđeno je da je raspon granula od 510-1030 $\mu$ m (163) što može značajno uticati na *in vivo* ponašanje biomaterijala. Upravo ovo može biti razlog veće gustine kapilara kod defekata ispunjenih sitnim granulama Bio-Ossa u odnosu na defekte ispunjene sitnim granulama Osteoxenona. Međutim, mikroCT analizom ustanovljeno je da 46.86% poroznog sistema sitne granule Osteoxenona čine pore veće od 100 $\mu$ m (sa najvećom vrednošću od 219.8 $\mu$ m) dok taj procenat kod poroznog sistema Bio-Ossa iznosi 21.35%, uz maksimalnu vrednost od 133.9 $\mu$ m. Rezultati pokazuju još veću razliku u poroznosti kada se posmatraju samo pore veće od 140 $\mu$ m, obzirom da Bio-Oss ne poseduje takve pore, a kod Osteoxenona čine 35.88% ukupnog volumena poroznosti. Ovakve strukturne karakteristike bi mogle da ukažu na superiorniju revaskularizaciju konglomerata sitnih granula Osteoxenona što je suprotno dobijenim *in vivo* rezultatima. Iako zastupljenost „optimalne” veličine pora i kompleksnost građe sitnog Osteoxenona idu u prilog vaskularnom prorastanju, apsolutna vrednost ukupnog volumena poroznog sistema koji je veći kod granule sitnog Bio-Ossa može biti razlog intenzivnije neoangiogeneze. Na osnovu svega navedenog, može se pretpostaviti da je neoangiogeneza sitno-granuliranih konglomerata uglavnom

ograničena na intergranularne prostore dok se kod krupno granuliranih agregata taj proces pored intergranularnih prostora odvija i intragranularno.

Proces zarastanja koštanog defekta nakon popunjavanja granulama biomaterijala počinje krvarenjem iz krvnih sudova smeštenih u zidovima defekta. Za uspešnu integraciju koštanih zamenika od presudnog značaja je struktura biomaterijala, njihova makro i mikroporoznost. Mikroporozna struktura biomaterijala omogućava protok fluida kroz čitav porozni sistem unutar granule povećavajući tako koncentraciju biološki aktivnih molekula kako unutar granule tako i oko nje. Pored toga, ovakvom strukturom poboljšava se adsorpcija makromolekula i jonska razmena u *in vivo* uslovima (164, 165). Zahvaljujući ovome Bio-Oss i Osteoxenon, kao granule sa očuvanom mikroporoznom strukturom, bivaju ispunjene krvlju pre nego što otpočne proces koagulacije. Nakon ispunjavanja granula krvlju sledi process koagulacije, unutar i oko biomaterijala, čime se stvaraju preduslovi za uspešnu integraciju granula. Dalje tokom zarastanja koagulum se postepeno zamenjuje dobro vaskularizovanim granulacionim tkivom koje je bogato inflamatornim ćelijama (110). Privremeni matriks postepeno zamenjuje granulaciono tkivo i predstavlja osnovu iz koje nastaje prvo osteoid a potom i nezrela i zrela lamelarna kost. Provizorni matriks čine novoformirani krvni sudovi, nediferentovane mezenhimalne ćelije koje krvnim sudovima bivaju transportovane do defekta, različiti tipovi leukocita i kolagena vlakna (110). U našem istraživanju prisustvo i produkcija nemineralizovanog fibroznog matriksa bogatog mezenhimalnim ćelijama s potencijalnom osteoplastičnom diferencijacijom praćena je kroz histomorfometrijsko merenje maksimalne širine vezivnih traka dok je produkcija koštanog tkiva praćena merenjem maksimalne širine koštanih gredica. Rezultati našeg istraživanja su pokazali da su nakon 4 i nakon 8 nedelja zarastanja defekti ispunjeni krupnim granulama biomaterijala, bez obzira na vrstu koštanog zamenika, imali značajno veću produkciju koštanog tkiva. Ovakav uticaj veličine granula na produkciju kosti može se objasniti prisustvom makroporoznog sistema s međusobno povezanim makroporama. Veliki intergranularni prostori dozvoljavaju formiranje većeg broja krvnih sudova i stvaranje mikrosredine koja zadovoljava visoke metaboličke potrebe regenerišuće regije. Pored toga, gusta vaskularna mreža omogućava adekvatno snabdevanje hranljivim materijama, nediferentovanim mezenhimalnim ćelijama pa čak i osteoprogenitornim ćelijama (npr. pericitima) (166, 167), što sve može uticati na

superiorniju produkciju kosti unutar defekata ispunjenih krupnim granulama biomaterijala. Međutim, literatura po pitanju uticaja veličine granula na produkciju kosti nije uniformna. Takođe, kategorisanje onoga što se definiše kao „krupno“ i „sitno“ među publikacijama se značajno razlikuje što doprinosi poteškoćama i konfuziji u interpretaciji rezultata. Testori i sar. su u multicentričnoj kliničko-histomorfometrijskoj studiji pokazali da primena krupnih granula Bio-Ossa u augmentiranom sinusu omogućava značajno veću produkciju kosti u odnosu na sitne granule istog materijala (128). Takođe, granule  $\beta$ -trikalcijum fosfata veličine 250-500 $\mu$ m podstiču veću produkciju kosti u odnosu na granule veličine 100-250 $\mu$ m (168). Malinin i sar. su na animalnom modelu babuna pokazali da su granule alografta veličine 25-75 $\mu$ m i 75-106 $\mu$ m neefikasne u podsticanju koštanog zarastanja dok su granule veličine 90-300 $\mu$ m pokazale rezultat koji je bio sličan autolognoj kosti (169). Iako koštane zamenike različitog porekla karakteriše različito *in vivo* ponašanje, stav da primena krupnih granula stvara bolje uslove za zarastanje koštanih defekata odgovara rezultatima našeg istraživanja. Suprotno našim rezultatima, postoje studije koje ukazuju na odsustvo bilo kakve razlike u pogledu produkcije kosti kod primene sitnih i krupnih granula koštanih zamenika. Čakartči (Chackartchi) i sar. (170) su poredili produkciju kosti kod sinusa augmentiranih sitnim i krupnim granulama Bio-Ossa. Na humanim uzorcima uzetim nakon 6-9 meseci zarastanja nije nađena značajna razlika u produkciji koštanog tkiva. Ovakav rezultat se može pripisati korišćenoj hirurškoj tehnici pri aplikovanju krupnih granula Bio-Ossa. Izražena kondenzacija granula unutar šprica (Bio-Oss Pen) može dovesti do njihovog odlamanja i usitnjavanja čime dimenzije granula poprimaju dimenzije bliske veličini sitnih granula Bio-Ossa. Tako redukovani intergranularni prostori mogu uticati na smanjenu produkciju kosti. U eksperimentalnom istraživanju na animalnom modelu mini svinje Jensen i sar. (126) su dobili slične rezultate. Nasuprot ovakvim stavovima, postoje i one publikacije koje su zasnovane na rezultatima da sitne granule daju veću produkciju koštanog tkiva. Klupel (Kluppel) i sar. (123) su pokazali da granule goveđeg koštanog minerala koje su bile manje od 450 $\mu$ m daju i kvantitativno i kvalitativno bolje koštano tkivo u odnosu na srednje (450-749 $\mu$ m) i velike granule (750-1000 $\mu$ m). Ovakav rezultat može se pripisati većoj površini kontakta između biomaterijala i okolnog tkiva što može uzrokovati veći stepen resorpcije granula i veću količinu istaložene novoformirane kosti. Goveđi koštani matriks koji je korišćen u



Klupelovom istraživanju proizveden je od strane drugog proizvođača pa su i razlike u *in vivo* ponašanju u odnosu na Bio-Oss veoma moguće. S ovim rezultatima saglasni su i rezultati nekoliko drugih autora (124, 125). Koristeći autolognu kost, Palsen (Pallsen) i sar. (122) su dokazali da granule čija je zapremina  $500-2000\mu\text{m}^3$  ( $0.5-2\text{mm}^3$ ) pokazuju značajno veću produkciju kosti u odnosu na granule zapremine  $10000\mu\text{m}^3$  ( $10\text{mm}^3$ ). Ovakav rezultat se takođe može pripisati različitim karakteristikama autologne kosti. Kako autologna kost podleže resorpciji, smanjenjem veličine granula povećava se stepen resorpcije (122) čime se stvara više prostora za novoformiranu kost. Uz to, za razliku od goveđeg koštanog minerala, autologna kost sadrži brojne faktore rasta (136). Kako se veličina granule smanjuje, tako se povećava njena aktivna površina sa koje faktori rasta deluju što može imati uticaj na veću produkciju koštanog tkiva. Kon i sar. (121) smatraju da je osteogeneza u prostorima između velikih granula autologne kosti ograničena i da je kroz posmatran period zarastanja stvaranje trabekula usporeno.

Pored jasne razlike u vaskularizaciji i osteogenezi nakon primene krupnih i sitnih granula, rezultati našeg istraživanja ukazuju i na međusobne razlike kako između krupnih granula Bio-Ossa i Osteoxenona tako i između sitnih granula ovih biomaterijala.

U defektima ispunjenim krupnim granulama Osteoxenona zabeležena je značajno veća širina novoformiranih koštanih gredica u odnosu na defekte ispunjene krupnim granulama Bio-Ossa i nakon 4 i nakon 8 nedelja zarastanja ( $p < 0.000$ ). To se može objasniti znatno većom ukupnom poroznošću granule Osteoxenona u odnosu na Bio-Oss (Ostoxenon – 56.6%, Bio-Oss – 29.7%). Pored toga, ukupna zapremina pora Osteoxenona je veća dok je koštana zapremina same granule manja u odnosu na Bio-Oss. Na ovaj način obezbeđuje se veći prostor za prorastanje krvnih sudova i formiranje nove kosti. Na intergranularnu poroznost može uticati i oblik granula biomaterijala. Nepravilniji oblik i veća kompleksnost oblika omogućavaju formiranje većih intergranularnih prostora suprotno granulama pravilnog oblika, sa ravnim stranama paralelnim uzdužnoj osovini granule (166). Odnos površine kosti i njene zapremine može aproksimirati kompleksnost oblika granule koštanog zamenika. U tom pogledu, sprovedene mikroCT analize su ukazale da Osteoxenon pokazuje kompleksniju građu što takođe može doprineti superiornijem formiranju nove kosti u odnosu na Bio-Oss.

Ovakvi rezultati su u skladu sa rezultatima koje su dobili Park i sar. (166). Oni su pokazali da smanjen intergranularni prostor kod granula štapićastog oblika utiče na manji procenat novoformirane kosti.

S obzirom na to da veća poroznost podstiče raniju neovaskularizaciju i intenzivniju produkciju kosti (171) može se očekivati da i krupne granule Bio-Ossa nakon zarastanja dužeg od 8 nedelja dostignu stepen produkcije kosti kao kod primene krupnih granula Osteoxenona. Tome ide u prilog i veća produkcija fibrovaskularnog tkiva kod kranijalnih defekata ispunjenih krupnim granulama Bio-Ossa ( $p < 0.000$ , nakon 8 nedelja zarastanja). Kako ne dolazi do regresije vaskularne mreže već postoji značajan rast broja krvnih sudova između 4 i 8 nedelje, proces regeneracije u defektima ispunjenim krupnim granulama je u 8. nedelji i dalje u toku. Kraniofacijalni skelet osifikuje direktno-intramembranoznom osifikacijom pa se može pretpostaviti da će ovo fibrovaskularno tkivo nakon završenog procesa regeneracije biti transformisano u koštano.

MikroCT analizom mikroporoznog sistema uočeno je da postoji evidentna razlika koja ide u korist krupnim granulama Bio-Ossa. Kod njih je broj mikropora oko tri puta veći u odnosu na Osteoxenon. Njihova zapremina je takođe veća kao i njihova zastupljenost u odnosu na ukupni volumen pora (Bio-Oss 4.22%, Osteoxenon 1.74%). Međutim, ukupna mikroporoznost Bio-Ossa je manja u odnosu na Osteoxenon (Bio-Oss – 1.75%, Osteoxenon – 2.21%). S obzirom da na izračunavanje mikroporoznosti veliki udeo ima ukupni volumen kosti, prikazan rezultat je posledica oko dva puta veće koštane zapremine Bio-Ossa. Ovakav mikroporozni sistem krupnih granula Bio-Ossa mogao bi takođe da bude odgovoran, stvarajući proosteogenu mikrosredinu, za potencijalno povećanje produkcije kosti u kasnijim fazama zarastanja. Na osnovu mikroporoznih, makroporoznih, i dobijenih histomorfometrijskih parametara posmatranih krupnih granula može se pretpostaviti da oba materijala imaju mikroporozni sistem koji stvara mikrosredinu povoljnu za regeneraciju kosti, ali da makroporozne karakteristike Osteoxenona omogućavaju intenzivniju angio i osteogenezu.

Defekti ispunjeni sitnim granulama ispitivanih biomaterijala takođe pokazuju značajne razlike u *in vivo* uslovima. Nakon 4 nedelje zarastanja defekti ispunjeni sitnim granulama Bio-Ossa pokazali su značajno veću širinu novoformiranih koštanih gredica

( $p=0.004$ ). Ovo se može pripisati prisustvu trostruko većeg broja mikropora, većoj zapremini koju čine mikroporozne strukture kao većoj ukupnoj površini kosti. Ukupna površina sitne granule Bio-Ossa ja evidentno veća u odnosu na Osteoxenon (Bio-Oss –  $5.76\text{mm}^2$ , Osteoxenon –  $3.93\text{mm}^2$ ) što može obezbediti veću površinu kontakta biomaterijala i angiogenih i drugih proteina doprinoseći bržoj i efikasnijoj koštanoj integraciji materijala (172, 173). Takođe, povećanjem mikroporoznosti povećava se i adsorpcija proteina za površinu biomaterijala (174) stvarajući povoljnu mikrosredinu za regeneraciju kosti. Suprotno ovome, nakon 8 nedelja zarastanja razlika u produkciji kosti nije bila statistički značajna ( $p=0.083$ ). To se može objasniti prisustvom nešto veće makroporoznosti i kompleksnijim oblikom granule Osteoxenona što može uticati na povećanje intergranularnog prostora i „kompenzovanje” manje mikroporoznosti čime se stvaraju uslovi za produkciju širih koštanih gredica. Intenzivnija fibroplazija kod sitnog Osteoxenona nakon 8. nedelje zarastanja ide u prilog mogućoj većoj produkciji kosti. Uzimajući u obzir dobijene rezultate, čini se da mikroporoznost ima odlučujući uticaj na neoangiogenezu i produkciju kosti sitno-granuliranih agregata.

Nakon aplikovanja biomaterijala u tkivo, da bi došlo do reakcije s ćelijama domaćina neophodno je da dođe do formiranja sloja proteina na površini biomaterijala. Tokom rane faze hemostaze sloj ovih proteina čine albumini, fibrinogen, proteini komplementa, fibronektin, vitronektin i globulini (175, 176). Površinske karakteristike biomaterijala utiču na vrstu i konformaciju adsorbovanih proteina i predstavljaju glavni determinator tkivne reakcije na implantirani materijal (177). Veličina, oblik, hemijske i fizičke osobine biomaterijala mogu uticati na intenzitet inflamacije i trajanje inflamatornog odgovora, bilo akutnog ili hroničnog (178). Inflamatorni odgovor čini niz tkivnih reakcija gde su različite ćelijske populacije, njihovo brojno stanje, aktivnost i funkcija pod kontrolom različitih endogenih medijatora. Akutni inflamatorni odgovor je relativno kratak i karakteriše ga većinsko prisustvo polimorfonuklearnih leukocita – pretežno neutrofilnih granulocita koji iz krvnog suda migriraju u perivaskularno tkivo i u okolinu prisutnog biomaterijala (179). Glavna uloga neutrofila u akutnoj inflamaciji jeste fagocitoza mikroorganizama i stranog materijala. Fagocitoza se odvija kroz tri faze: prepoznavanje i vezivanje neutrofila za strani materijal, njegovo obuhvatanje i uvlačenje u citoplazmu neutrofila i konačno, njegovo razlaganje. Međutim, kada su u pitanju biomaterijali, poslednje dve faze se mogu ili ne moraju odigrati, u zavisnosti od

njihovih karakteristika (178). Velika razlika između veličine granule i neutrofila dovodi do tzv. „frustrated phagocytosis” (180) gde ne dolazi do obuhvatanja i uvlačenja biomaterijala u unutrašnjost neutrofila već dolazi do ekstracelularnog oslobađanja enzima koji učestvuju u degradaciji materijala (181). U našem istraživanju, nakon 4 nedelje zarastanja, u augmentiranim koštanim defektima zabeleženo je prisustvo neutrofila iako je faza akutne inflamacije prošla, što može biti odraz intenziteta prethodne akutne inflamatorne reakcije. Defekti ispunjeni sitnim granulama, bez obzira na korišćeni koštani zamenik, pokazali su prisustvo intenzivnijeg zapaljenja. S obzirom da veći stepen zapaljenja dovodi do većeg oštećenja ćelija, to može biti jedan od razloga manje produkcije kosti u odnosu na defekte ispunjene krupnim granulama koštanih zamenika. Nakon 8 nedelja zarastanja, neutrofilni su samo sporadično, u malom broju bili prisutni unutar sve četiri ispitivane grupe biomaterijala što ukazuje na smanjenje intenziteta inflamacije. Ovo ide u prilog povećanju produkcije kosti između dva perioda praćenja. Rezultati sprovedenog istraživanja su u skladu sa pretpostavkama pojedinih autora da sitnije granule imaju ulogu u ćelijskoj aktivaciji jer podstiču oslobađanje citokina i kalcijumovim/fosfatnih jona tokom rane faze zarastanja dok krupnije granule uzrokuju blažu inflamatornu reakciju ali služe kao osteokonduktivni skelet (182, 183).

Pored neutrofila, inflamatorni infiltrat oko biomaterijala čine i makrofagi. Oni imaju znatno duži životni vek od neutrofila (nekoliko nedelja do nekoliko meseci) i kako vremenom neutrofilni podležu apoptozi tako makrofagi postaju dominantne ćelije sada već nastale hronične inflamatorne reakcije (184). Jedna od funkcija makrofaga jeste fagocitoza. Ustanovljeno je da proces fagocitoze zavisi od veličine implantiranog materijala (185). Tokom fagocitoze dolazi do reorganizacije ćelijske membrane makrofaga i postepenog obuhvatanja stranog materijala koji na kraju biva internalizovan, smešten unutar organele koja se zove fagozom (186). Dalje, lizozomi, hidrolitički enzimi i druge materije bivaju fuzionisane s fagozomom a sve u cilju degradacije i dezintegracije stranog materijala (186). Međutim kada su granule materijala veće od one veličine koju jedan makrofag može da fagocituje (između 10-100 $\mu$ m) dolazi do njihovog fuzionisanja i formiranja džinovske ćelije tipa oko stranog tela (184). Prisustvo granulocita, limfocita, makrofaga i džinovskih ćelija tipa oko stranog tela ukazuje na prisustvo inflamatorne reakcije na biomaterijal (187). Ove ćelije predstavljaju ćelijske komponente reakcije na strano telo. Hemijski sastav (188), fizičke

(189) i površinske karakteristike (190) biomaterijala utiču na ćelijske komponente i intenzitet reakcije na strano telo. Promenom fizičkih karakteristika, među kojima je i odnos površine i zapremine biomaterijala, može se uticati na karakteristike reakcije na strano telo (191). Materijali koje karakteriše visoka vrednost odnosa površina-zapremina, a takvi su porozni materijali, u inflamatornom infiltratu pokazuju dominantno prisustvo makrofaga i džinovskih ćelija tipa oko stranog tela (192). Rezultati našeg istraživanja pokazuju da i Bio-Oss i Osteoxenon, bez obzira na veličinu granula, imaju potencijal da indukuju stvaranje džinovskih ćelija tipa oko stranog tela. Međutim, zabeleženo je prisustvo značajno većeg broja ovih ćelija u defektima ispunjenim sitnim granulama biomaterijala i nakon 4 i nakon 8 nedelja zarastanja. Ovakav rezultat odgovara rezultatima istraživanja Ganatija (Ghanaati) i sar. (187) koji su ukazali da na aktivaciju džinovskih ćelija tipa oko stranog tela utiče veličina granula, a ne njihova poroznost. S obzirom na to da se radi o prokataboličkim ćelijama čije prisustvo inhibira lokalno formiranje kosti (193), ovim se dodatno može objasniti značajno manja produkcija kosti kod primene sitnih granula biomaterijala.

Iako se prvobitno smatralo da makrofagi imaju štetan uticaj na proces oseointegracije (194, 195), savremena literatura ukazuje na važnu i potencijalno korisnu ulogu ovih ćelija (196, 197). Naime, različite površinske karakteristike titanijuma mogu uticati na ekspresiju osteoinduktivnih (koštani morfogenetski protein 2) i osteogenih citokina (transformišući faktor rasta 1) u ćelijskim linijama makrofaga. Prisustvo makrofaga u inflamatornom infiltratu oko biomaterijala, kao i prisustvo džinovskih ćelija tipa oko stranog tela podržava koncept da je uspešna oseointegracija zapravo reakcija na strano telo (198, 199). Unutar mekog tkiva, nakon nekoliko nedelja ili meseci po aplikaciji biomaterijala dolazi do njegove fibrozne inkapsulacije. Organizacija i ćelijska struktura ovako nastalog tkiva potpuno se razlikuje u odnosu na strukturu zdravog mekog tkiva. Fibroznu kapsulu karakteriše prisustvo sloja paralelnih, dominantno kolagenih vlakana debljine nekoliko stotina mikrona koji je slabo vaskularizovan i hipocelularan (200). Ćelije koje su prisutne u strukturi fibrozne kapsule su prvenstveno fibroblasti i monociti/makrofagi, a u kasnijim fazama zarastanja i džinovske ćelije tipa oko stranog tela (200). Analogno reakciji u mekom tkivu, unutar koštanog tkiva oko biomaterijala se formira tanak sloj slabo vaskularizovane kondenzovane kosti. Ovakvo formiran sloj koštanog tkiva koji odvaja biomaterijal od okolnog tkiva predstavlja tipičnu reakciju na

strano telo gde postoji uspostavljena ravnoteža imunog odgovora („imunološki ekvilibrijum”) (201). U ovom slučaju strani materijal tj. biomaterijal biva biofunktionalan. Međutim, narušavanje ovog ravnotežnog stanja dovodi do reaktivacije i regrutovanja makrofaga, njihovog fuzionisanja, povećanja broja džinovskih ćelija tipa oko stranog tela i aktivacije osteoklastogeneze što vodi ka dezintegraciji biomaterijala (199).

U našem istraživanju u defektima ispunjenim sitnim granulama Bio-Ossa i Osteoxenona nakon 8 nedelja zarastanja broj džinovskih ćelija tipa oko stranog tela se značajno smanjio u odnosu na 4. nedelju, dok je u defektima ispunjenim krupnim granulama Bio-Ossa takođe zabeleženo smanjenje njihovog broja ali bez statističke značajnosti. U defektima ispunjenim krupnim granulama Osteoxenona zabeležen je zanemarljiv broj ovih ćelija nakon 4 nedelje zarastanja pri čemu je njihov broj i nakon 8 nedelja ostao nepromenjen. Tendencija smanjenja broja džinovskih ćelija tipa oko stranog tela ili samo njihovo sporadično prisustvo mogu ukazivati na postojanje imunološkog ekvilibrijuma i uspešnu oseointegraciju kao vid reakcije na strano telo. Životni vek ovih ćelija je još uvek nepoznat iako se zna da one mogu perzistirati u tkivu godinama pa i decenijama (178). Honma & Hamasaki (202) su pokazali da nakon resorpcije biomaterijala dolazi do apoptoze džinovskih ćelija tipa oko stranog tela i njihovog potpunog odsustva unutar tkiva. Uklanjanjem faktora koji inicira formiranje džinovskih ćelija tipa oko stranog tela, svrsishodnost njihovog postojanja prestaje pa se samim tim one povlače iz tkiva. Današnja saznanja ukazuju da je Bio-Oss materijal, koji kada se nađe unutar osteogene sredine, neresorptivan ili veoma sporo resorptivan (42-44). To se objašnjava odsustvom džinovskih ćelija tipa osteoklasta i resorptivnih lakuna na površini biomaterijala. U našem istraživanju i nakon 8 nedelja zarastanja nije zabeleženo prisustvo ovih ćelija na površini Bio-Ossa što ukazuje na permanentno prisustvo stranog materijala u tkivu. Ovim se može objasniti prisustvo džinovskih ćelija tipa oko stranog tela što je u saglasnosti s objavljenim rezultatima u literaturi. Naime, Mordenfeld i sar. (45) su uočili prisustvo džinovskih ćelija tipa oko stranog tela na humanom uzorku nakon 11 godina što sve ukazuje na postojanje uspešne integracije materijala i imunološkog ekvilibrijuma. Kada je u pitanju kost konjskog porekla Annibali i sar. (203) su na humanoj biopsiji posle 6 meseci zarastanja uočili evidentnu resorpciju granula. Ovakav rezultat je u suprotnosti s rezultatima našeg istraživanja gde

je nakon 8 nedelja zarastanja uočeno odsustvo litičkih procesa na površini granula konjskog porekla. Odsustvo resorptivnih procesa i konstatno prisustvo stranog materijala unutar tkiva idu u prilog prisutnoj reakciji na strano telo. S obzirom na to da je period zarastanja u našem istraživanju limitiran na 8 nedelja, neophodno je uraditi praćenje u dužem vremenskom periodu kako bi se procenila dugoročna promena broja džinovskih ćelija tipa oko stranog tela i stabilnost reakcije na strano telo.

Pored morfoloških osobenosti koje prave razliku između ispitivanih koštanih zamenika, Bio-Oss i Osteoxenon se razlikuju i po hemijskoj strukturi. Oba materijala kao neorgansku osnovu poseduju kalcijum i fosfor s tom razlikom što Osteoxenon poseduje i organsku komponentu u vidu kolagena koji je sačuvan tokom procesa obrade biomaterijala. Kolagen tip I direktno utiče na diferencijaciju osteoprogenitornih ćelija i funkciju osteoblasta (115) dok s druge strane inhibira osteoklastogenezu (116). Pored toga, indirektno, utičući na brzinu rasta krvnih sudova (117) stvara uslove neophodne za odvijanje procesa osteogeneze. Rezultati našeg istraživanja, kao što je već spomenuto, nakon 8 nedelja zarastanja pokazuju da defekti ispunjeni krupnim granulama Osteoxenona imaju gušću vaskularnu mrežu i veću produkciju kosti u odnosu na krupne granule Bio-Ossa. Međutim, kada su u pitanju defekti ispunjeni sitnim granulama istih materijala, zabeležen je superiorniji regenerativni potencijal onih defekata koji su ispunjeni granulama Bio-Ossa. Na osnovu toga može se pretpostaviti da kolagen zarobljen unutar mineralne komponente nema značajan uticaj na regeneraciju koštanih defekata. U prilog ovome ide i činjenica da FDB i pored prisutne organske komponente unutar mineralne strukture ispoljava prevashodno osteokonduktivna svojstva (27) jer je neophodna aktivnost osteoklasta kako bi organska komponenta bila oslobođena i dostupna. U našem istraživanju nakon 8 nedelja zarastanja nije zabeležena osteoklastična aktivnost na površini granula Osteoxenona što može objasniti odsustvo uticaja kolagena na regeneraciju koštanih defekata. S druge strane, nedovoljna koncentracija i gustina kolagena unutar granula Osteoxenona može biti razlog izostanka očekivanog proangiogenog i proosteogenog potencijala.

## 8. ZAKLJUČCI

Na osnovu komparativne mikroCT analize *in vivo* ponašanja krupnih i sitnih granula Bio-Ossa i Osteoxenona pri zarastanju koštanih defekata može se zaključiti sledeće:

1. Bez obzira na vrstu primenjenog koštanog zamenika u svim koštanim defektima zabeležena je uspešna neoangio i osteogeneza.
2. Koštani zamenici sa krupnim granulama obezbeđuju intenzivniju neoangiogenezu tokom procesa regeneracije koštanog tkiva.
3. Koštani zamenici sa krupnim granulama pokazuju naglašeniju osteokonduktivnost.
4. Optimalna veličina pora za prorastanje krvnih sudova zastupljena je u znatno većem procentu kod krupnih granula.
5. Krupne granule Osteoxenona omogućavaju najintenzivniju angio i osteogenezu.
6. Sitne granule Bio-Ossa omogućavaju intenzivniju angio i osteogenezu u odnosu na sitne granule Osteoxenona.
7. Primena sitnih granula koštanih zamenika praćena je prolongiranim nespecifičnim inflamatornim odgovorom uz kombinovanu gigantocelularnu reakciju tipa oko stranog tela.
8. Smanjenje broja džinovskih ćelija tipa oko stranog tela u toku procesa zarastanja ili njihovo sporadično prisustvo oko granula Bio-Ossa i Osteoxenona ukazuje na uspešnu oseintegraciju koštanih zamenika kao vid reakcije na strano telo.
9. Kolagen unutar mineralne komponente Osteoxenona nema uticaja na angiogenezu i osteogenezu.



## 9. LITERATURA

1. Sandor GK CR, Ylikontiola LP, Jan A, Duval M, Clokie CM. Healing of large dentofacial defects. *Endodontic topics* 2012; 25:63-94.
2. Mc Kibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 1978;16-B:150-162.
3. Simmons D. Fracture healing. In: Urist MR, ed. *Fundamental and Clinical Bone Physiology*. Philadelphia: JB Lippincott, 1980; 283-330.
4. Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 1999, 87:57-66.
5. Marx RE, Carlson E, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998,85:638-646.
6. Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg.* 2006 Apr;35(3):232-42.
7. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: A histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994,9:13-29.
8. Slotte C, Lundgren D, Sennerby L, Lundgren AK. Surgical intervention in enchondral and membranous bone: Intraindividual comparisons in the rabbit. *Clin Implant Dent Relat Res* 2003,5:263-268.
9. Nishimura I, Shimizu Y, Ooya K. Effects of cortical bone perforations on experimental guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res* 2004,15:293-300.
10. Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1993,13:29-45.
11. Nevins M, Mellonig J. The advantages of localized ridge augmentation prior to implant placement. A staged event. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1994,14:97-111.

12. Buser D, Hoffmann B, Bernard JP, Lussi A, Mettler D, Schenk RK. Evaluation of filling materials in membrane-protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. *Clin Oral Implants Res* 1998, 9:137-150.
13. Jensen SS, Bosshardt D, Buser D. Bone Grafts and Bone Substitute Materials. In: Buser D. (ed). *20 Years of Guided Bone Regeneration*, second edition, Quintessence publishing, 2009, 71-96.
14. Cypher TJ, Grosmann J. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg* 1996, 35:413-417.
15. Glowacki J, Mulliken J. Demineralized bone implants. *Clin Plast Surg* 1985, 12:233-241.
16. Friedlander GE. Bone grafts: the basic science rationale for clinical application. *J Bone Joint Surg* 1987, 69A:786-790.
17. Urist MR, McLean F. Osteogenic potency and new bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. *J Bone Joint Surg* 1952, 34A:443.
18. Urist MR, Mikulski AJ, Nakagawa M, Yen K. A bone matrix calcification-initiator noncollagenous protein. *Am J Physiol* 1977, 232:C115-127.
19. Buchardt H. The biology of bone graft repair. *Clinical Orthop* 1983, 174:28-42.
20. Constantino PD, Freidmann C. Synthetic bone graft substitutes. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 1994, 27:1037-73.
21. Gazdag AR, Lane J, Glaser PM, Forster RA. Alternatives to autogenous bone grafts, efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg.* 1995, 3: 1-8.
22. Ray RD. Bone grafts and bone implants. *Otolaryngol. Clin. N. Am.* 1972, 5:389.
23. Ray RD. Vascularisation of bone graft and implants. *Clin Orthop* 1972, 87:43-48.
24. Hammack BL, Enneking W. Comparative vascularization of autogenous and homogenous bone transplants. *J Bone Joint Surg* 1960, 42A:811.
25. Pallesen L, Schou S, Aabou M, Hjorting-Hansen E, Nattestad A, Melsen F. Influence of particle size on the early stages of bone regeneration: A histologic and stereologic study in the rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002, 17:498-506.

26. Jensen SS, Brogгинi N, Hjorting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and  $\beta$ -tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res* 2006,17:237-243.
27. Misch CE, Misch-Dietsch F. Keys to Bone Grafting and Bone Grafting Materials. In Misch CE (ed). *Contemporary Implant Dentistry*, 2008,839-869.
28. Cunningham NS, Reddi AH. Biological principles of bone induction: application of bone grafts. In Habal MB, Reddi HA, editors: *Bone grafts and bone substitutes*, Philadelphia, 1992, Saunders.
29. Mulliken JB, Glowacki J. Induced osteogenesis for repair and construction in craniofacial region. *Plast Reconstr Surg* 1980,65:553.
30. Schwartz Z, Mellonig JT, Carnes DL Jr, et al. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J Periodontol* 1996,67:918-926.
31. Reddi AH, Wientroub S, Muthukumaran N. Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am* 1987,18:207-212.
32. Beneza Rosen V, Hobs L, Spector M. . The ultrastructure of anorganic bovine bone and selected hydroxyapatites used as bone graft substitute materials. *Biomaterials* 2002,23:921-928.
33. Bufler MA. Material analysis, department of analytical research, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Switzerland.
34. Tadic D, Epple M. A thorough physicochemical characterization of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials* 2004,25: 987-994.
35. Daculsi G, Passuti N. Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 1990,11: 86-87.
36. De Groot K. Degradable ceramics. In: Williams DF, ed. *Biocompatibility of Clinical Implant Materials*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1981, 199-222.
37. Jensen SS, Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E, Melsen F, Ruyter IE. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996,11:55-66.

38. Ong JL, Hoppe C, Cardenes HL, et al. Osteoblast precursor cell activity on HA surface of different treatments. *J Biomed Mater Res* 1998,39:176-183.
39. Klinge B, Alberius P, Isaksson S, Jonsson J. Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in the repair of the experimental skull bone defects. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1992,50:241-249.
40. Piattelli M, Favero G, Scarano A, Orsini G, Piattelli A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999,14:835-840.
41. Perrotti V, Nicholls B, Horton MA, Piattelli A. Human osteoclast formation and activity on a xenogenous bone mineral. *J Biomed Mater Res Part A* 2009,90:238-246.
42. Schlegel AK, Donath K. Bio-Oss –a resorbable bone substitute? *J of Long Term Effects of Medical Implants* 1998,8:201-209.
43. Schlegel AK, Fichtner G, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J. Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003,18:53-58.
44. Hallman M, Thor A. Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *Peridontol* 2000 2008,47:172-192.
45. Mordenfeld A, Hallman M, Johansson CB, Albrektsson T. Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. *Clin Oral Impl Res* 2010,21:961-970.
46. Piattelli A, Ricci L. Is there a preferential indication for a biomaterial in sinus bone augmentation. 2nd Scientific Round Table Biofunctionality. November 2009, Kusnacht, Switzerland.
47. Orsini G. Histological and ultrastructural evaluation of bone around Bio-Oss particles in sinus augmentation. *Oral Dis* 2007,13(6):586-593.
48. Nevins M, Heinemann F, Janke UW, Lombardi T, Nisad D, Rocchietta I, Santoro G, Schupbach P, Kim DM. Equine-derived bone mineral matrix for

- maxillary sinus floor augmentation: A clinical, radiographic, histologic, and histomorphometric case series. *Int J Periodontics Restor Dent* 2013,33:483-439.
49. Di Stefano DA, Artese L, Lezzi G, Piattelli A, Pagnutti S, Piccirilli M, Perrotti V. Alveolar ridge regeneration with equine spongy bone: A clinical, histological, and immunohistochemical case series. *Clin Impl Dent Relate Res* 2009,11(2):90-100.
  50. Perrotti V, Nicholls B, Piattelli A. Human osteoclast formation and activity on an equine spongy bone substitute. *Clin Oral Impl Res* 2009,20:17-23.
  51. Benić GI, Thoma D, Munoz F, Martin IS, Jung R, Hammerle CH. Guided bone regeneration of peri-implant defects with particulated and block xenogenic bone substitutes. *Clin Oral Impl Res* 2015,00:1-10.
  52. Moore WR, Graves S, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 2001,71:354-361.
  53. Polverini PJ. The pathophysiology of angiogenesis *Crit Rev Oral Biol Med* 1995, 6(3):230-247.
  54. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine* 2003, 9:653-660.
  55. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-674,1997.
  56. Heil M, Eitenmuller I, Schmitz-Rixen T, Schaper W. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and difference. *J Cell Mol Med* 10:45-55,2006.
  57. Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis *Cell Tissue Res* 314:15-23,2003.
  58. Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sesse J, Ekblom P, Kemler R et al. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 102:471-478,1988.
  59. Dieterlen-Lievre F, Pardanaud L. Embryonic development of blood vessels. In: *Angiogenesis in health and disease*. Maragoudakis ME, Gullino P, Lelkes PI, editors. New York:Plenum,pp.1-16,1991.
  60. Krah K, Mironov V, Risau W, Flamme I. Induction of vasculogenesis in quail blastodisc-derived embryoid bodies. *Dev Biol* 164:123-132,1994.
  61. Simons M. Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation* 111:1556-1566,2005.

62. Kovacic JC, Moore J, Herbert A, Ma D, Boehm M, Graham R Endothelial progenitor cells, angioblasts, and angiogenesis – old terms reconsidered from a current perspective *Trends Cardiovasc Med* 18:45-51,2008.
63. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis *Nature Medicine* 6:389-395,2000.
64. Phelps EA, Garcia A. Update on therapeutic vascularization strategies. *Regenerative Medicine* 4:65-80,2009.
65. Kim SJ, Kim J, Papadopoulos J et al. Circulating monocytes expressing CD31: implications for acute and chronic angiogenesis. *American Journal of Pathology* 2009; 174:1972-1980.
66. Purhonen S, Palm J, Rossi D. Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 105:6620-6621,2008.
67. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nature Medicine* 9:702-712,2003.
68. Suh W, Kim K, Kim JM et al. Transplantation of endothelial progenitor cells accelerates dermal wound healing with increased recruitment of monocytes/macrophages and neovascularization. *Stem Cells* 2005;23:1571-1578.
69. Galiano RD, Tapper O, Pelo CR, et al. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells, 2004, 164:1935-1947.
70. Urbrich C, Heeschen C, Aicher A et al. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* 2003, 108:2511-2516.
71. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003, 107:1164-1169.
72. Pollard J. Trophic macrophages in development and disease. *Nature Reviews Immunology* 2009, 9:259-270.

73. Lingen MW. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 2001, 125:67-7.
74. Grunewald M, Avraham I, Dor Y et al. VEGF-induced adult neovascularization:recruitment,retention,and role of accessory cells. *Cell* 2006, 124:175-189.
75. DiPietro LA, Polverini P. Angiogenic macrophages produce the angiogenic inhibitor trombospondin 1. *American Journal of Pathology* 1993, 143:678-684.
76. DiPietro LA, Nissen N, Gamelli RL et al. Trombospondin 1 synthesis and function in wound repair. *American Journal of Pathology* 1996, 148:1851-1860.
77. Carano RA, Filvaroff E. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 2003, 8:980-989.
78. Clarkin CE, Emery R, Pitsillides AA, Wheeler-Jones CPD. Evaluation of VEGF-modulated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells. *J Cell Physiol* 2008,214(2):537-544.
79. Chung U,I Kawaguchi H, Takao T, Nakamura K. Distinct osteogenic mechanisms of bones of distinct origins. *J Orthop sci* 2004, 9(4):410-414.
80. Red-Horse K, Crawford Y, Shojaei F, Ferrara N. Endothelium-microenvironment interactions in the developing embryo and in adults. *Dev Cell* 2007,12(2):181-194.
81. Eckardt H, Bundgaard K, Christensen KS, Lind M, Hansen ES, Hvid I. Effects of locally applied vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-inhibitor to the rabbit tibia during distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 2003, 21:335-340.
82. Cetinkaya BO, Keles G, Ayas B, Sakallioglu EE, Acikgoz G. The expression of vascular endothelial growth factor in a rat model at destruction and healing stages of periodontal disease. *J Periodontol* 2007, 78:1129-1135.
83. Eriksson C, Nygren H, Ohlson K. Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium discs in rat tibia: cellular reactions on the surfaces during the first 3 weeks in bone. *Biomaterials* 2004,25:4759-4766.

84. Bouletreau PJ, Warren S, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA, et al. Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implication for fracture healing. *Plast Reconstr Surg* 2002,109:2384-2389.
85. Deckers MM, Karperien M, Van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Lowik CW. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation *Endocrinology* 2000,141:1667-1674.
86. Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Gunther KP, Dehio C, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone* 2002, 81:82-92.
87. Pinholt EM, Solheim E, Talsnes O, Larsen TB, Bang G, Kirkeby OJ. Revascularisation of calvarial,mandibular,tibial and iliac bone grafts in rats. *Ann Plast Surg* 1994, 33:193-197.
88. Winet H. The role of microvasculature in normal and perturbed bone healing as revealed by intravital microscopy. *Bone* 1996,19:39S-57S.
89. De Marco AC, Jardini M, Lima LP. Revascularisation of autogenous block grafts with or without an e-EPTFE membrane. *Int J Oral Maxillofac Impl* 2005,20:867-874.
90. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1988, 81:672-676.
91. Schwarz F, Rothamel D, Hertel M, Sager M, Ferrari D, Becker J. Immunohistochemical characterisation of guided bone regeneration at a dehiscence-type defect using different barrier membranes:an experimental study in dogs. *Clin Oral Impl Res* 2008, 19:402-415.
92. Ogiso B, Huges F, Melcher AH et al. Fibroblasts inhibit mineralized bone nodule formation by rat bone marrow stromal cells in vitro. *J Cell Physiol* 1991,146:442-450.
93. Lakeley LA, Akella R, Ranieri JP. Angiogenesis: implications for tissue repair. In Davies JE, ed. *Bone engineering*. Em Squared Incorporated: Toronto, 2000, pp. 137-142.



94. Kannan RY, Salacinski H, Sales K, Butler P, Seifalian AM. The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: a review. *Biomaterials* 2005, 26(14):1857-1875.
95. Rouwkema J, Rivron N, van Blitterswijk CA. Vascularisation in tissue engineering. *Trends in Biotechnology* 2008, 26(8):434-441.
96. Said S, Parke W, Neufeld DA. Vascular supplies differ in regenerating and non regenerating amputated rodent digits. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004, 278A:443-449.
97. Mour M, Das D, Winkler T, Hoenig E, Mielke G, Morlock MM, Schilling AF. Advances in Porous Biomaterials for Dental and Orthopaedic Applications. *Materials* 2010, 3:2947-2974.
98. Kuhne JH, Bartl R, Frisch B, Hammer C, Jansson V, Zimmer M. Bone formation in coralline hydroxyapatite-effects of pore size studied in rabbits. *Acta Orthopædica Scandinavia* 1994, 65(3):246-252.
99. Rose FR, Cyster L, Grant DM, Scotchford CA, Howdle SM, Shakesheff KM. In vitro assessment of cell penetration into porous hydroxyapatite scaffolds with a central aligned channel. *Biomaterials* 2004, 25:5507-5514.
100. O'Brien FJ, Harle B, Yannas IV, Gibson LJ. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* 2005, 26:433-441.
101. Schumacher M, Deisinger U, Detsch R, Ziegler G. Indirect rapid prototyping of biphasic calcium phosphate scaffolds as bone substitutes: influence of phase composition, macroporosity and pore geometry on mechanical properties. *J Mater Sci Mater Med* 2010, 21:3119-3127.
102. Egli PS, Muller W, Schenk RK. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bone ingrowth and implant substitution. *Clin Orthop Relat Res* 1988; 232:127-138.
103. Bonfield W. Designing porous scaffolds for tissue engineering. *Philos Trans A: Math Phys Eng Sci* 2006, 364:227-232.
104. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005, 26(27):5474-5491.

105. Bai F, Wang Z, Lu J, Liu J, Chen G, Lv R, et al. The correlation between the internal structure and vascularization of controllable porous bioceramic materials in vivo: a quantitative study. *Tissue Eng Part A* 2010,16:3791-3803.
106. Traini T, Valentini P, Iezzi G, Piattelli A. A histologic and histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone retrieved 9 years after a sinus augmentation procedure. *J Periodontol.* 2007 May; 78(5): 955–61.
107. Jovanović D, Engels G, Plantinga JA, Bruinsma M, van Oeveren W, Schouten AJ, van Luyn MJA, Harmsen MC. Novel polyurethanes with interconnected porous structure induce in vivo tissue remodeling and accompanied vascularization. *J Biomed Mater Res A* 2010,95A(1).198-208.
108. Bufler MA. The wettability of biomaterials: comparative studies and new insights. Department of analytical research, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Switzerland.
109. Schafer B. Department of core technology, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Switzerland.
110. Cardaropoli G AM, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2003,30:809-818.
111. Cooperman L, Michaeli D. The immunogenicity of injectable collagen.I. A 1-year prospective study. *J Am Acad Dermatol.* 1984,10:638-646.
112. Schlegel AK, Mohler H, Busch F, Mehl A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide). *Biomaterials* 1997,18:535-538.
113. Yaffe A, Ehrlich J, Shoshan S. Restoration of periodontal attachment employing enriched collagen solution in the dog. *J Periodontol* 1984,55:623-628.
114. Locci P, Calvitti M, Belcastro S, et al. Phenotype expression of gingival fibroblasts cultured on membranes used in guided tissue regeneration. *J Periodontol* 1997,68:857-863. .
115. Takeuchi Y, Suzawa M, Kikuchi T, Nishida E, Fujita T, Matsumoto T. Differentiation and transforming growth factor-beta receptor down-regulation by collagen-alpha2beta1 integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its downstream signals in murine osteoblastic cells. *J Biol Chem* 1997,272(46):29309-29316.

116. Fernandes H, Mentink, A., Bank, R., Stoop, R., van Blitterswijk, C. & de Boer, J. Endogenous Collagen Influences Differentiation of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Tissue Engineering. Part A.* 2010,16(5):1693-1702.
117. M. Markowicz, Koellensperger E, S. Neuss, Steffens GCM and Pallua N. Enhancing the Vascularization of Three-Dimensional Scaffolds: New Strategies in Tissue Regeneration and Tissue Engineering. *Topics in Tissue Engineering* 2005,2:1-15.
118. Nasr HF Aichelmann-Reidy M, Yukna RA. Bone and bone substitutes. *Periodontology* 2000, 1998,19:74-86.
119. Klawitter JJ, Hulbert S. Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic application. *J Biomed Mater Res Sympos* 1971,2:161.
120. Hirschorn JS McBeath A, Dustoor MR. Porous titanium surgical implant materials. *J Biomed Mater Sympos* 1971,2:49.
121. Kon K, Shiota M, Ozeki M, Yamashita Y, Kasugai S. Bone augmentation ability of autogenous bone graft particles with different sizes: a histological and micro-computed tomography study. *Clin Oral Impl Res* 2009,20:1240-1246.
122. Pallesen L, Schou S, Aaboe M, Hjorting-Hansen E, Nattestad A, Melsen F. Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002,17:498-506.
123. Kluppel LE, Antonini F, Olate S, Nascimento FF, Albergaria-Barbosa JR, Mazzonetto R. Bone repair in influenced by different particle sizes of anorganic bovine bone matrix: histologic and radiographic study in vivo. *J Craniofac Surg* 2013,24:1074-1077.
124. Zhou X, Zhang Z, Li S, Bai Y, Xu H. Osteoconduction of different sizes of anorganic bone particles in a model of guided bone regeneration. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2011,49:37-41.
125. Xu H, Shimizu Y, Asai S, Ooya K. Experimental sinus grafting with the use of deproteinized bone particles of different sizes. *Clin Oral Implants Res* 2003,14:548-555.

126. Jensen SS, Aaboe M, Janner SFM, Saulacic N, Bornstein MM, Bosshardt DD, Buser D. Influence of particle size of deproteinized bovine bone mineral on new bone formation and implant stability after simultaneous sinus floor elevation :a histomorphometric study in minipigs. *Clin Implant Dent Relat Res* 2013,1:1-12.
127. Chackartchi T, Lezzi G, Goldstein M, Klinger A, Soskolne A, Piattelli A, Shapira L. Sinus floor augmentation using large (1-2mm) or small (0.25-1mm) bovine bone mineral particles:a prospective, intra-individual controlled clinical, micro-computerized tomography and histomorphometric study. *Clin Oral Impl Res* 2011,22:473-480.
128. Testori T, Wallace S, Trisi P, Capelli M, Zuffetti F, Del Fabbro M. . Effect of Xenograft (ABBM) particle size on vital bone formation following maxillary sinus augmentation: a multicenter, randomized, controlled, clinical histomorphometric trial. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2013,33:467-475.
129. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2010, 25(7):1468-86.
130. Djuric M, Djonic D, Milovanovic P, Nikolic S, Marshall R, Marinkovic J, et al. Region-Specific Sex-Dependent Pattern of Age-Related Changes of Proximal Femoral Cancellous Bone and Its Implications on Differential Bone Fragility. *Calcif Tissue Int*. 2010, 86(3):192-201.
131. Odgaard A. Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture. *Bone* 1997, 20 (6): 315-328.
132. Nyman S, Lang N, Buser D, Bragger U. Bone regeneration adjacent to titanium dental implants using guided tissue regeneration: a report of two cases. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990, 5:9-14.
133. Dahlin C, Sennerby L, Lekholm U, Linde A, Nyman S. . Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1989, 4: 19–25.
134. Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration.1.Surgical procedure in the mandible. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1995,15:10-29.

135. Nevins M, Mellonig J. Enhancement of the damaged edentulous ridge to receive dental implants: A combination of allograft and the Gore-Tex membrane. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1992,12:97-111.
136. Schliephake H, Dard M, Planck H, Hierlemann H, Stern U. Alveolar ridge repair using resorbable membranes and autogenous bone particles with simultaneous placement of implants: an experimental study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000,15:364-373.
137. Cricchio G, Lundgren S. Donor site morbidity in two different approaches to anterior iliac crest bone harvesting. *Clin Impl Dent Relat Res* 2003,5:161-169.
138. Clavero J, Lundgren S. Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation: comparison of donor site morbidity and complications. *Clin Impl Dent Relat Res* 2003,5:154-160.
139. Cordaro L, Amade D, Cordaro M. Clinical results of alveolar ridge augmentation with mandibular bone block grafts in partially edentulous patients prior to implant placement. *Clin Oral Impl Res* 2002,13:103-111.
140. Schlegel AK, Fichtner G, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J. Histological findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003,18:53-58.
141. Cooper DM, Matyas J, Katzenberg MA, Hallgrimsson B. Comparison of microcomputed tomographic and microradiographic measurements of cortical bone porosity. *Calcified Tissue International* 2004,74:437-447.
142. Cooper DM, Turinsky A, Sensen CW, Hallgrimsson B. Quantitative 3D analysis of the canal network in cortical bone by microcomputed tomography. *The Anatomical Record Part B*. 2003,274:169-179.
143. Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, Meijer G, van Blitterswijk CA, Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials* 2005,26:3565-3575.
144. Chang BS, Lee C, Hong KS, Youn HJ, Ryu HS, Chung SS, Park KW. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials* 2000, 21:1291-1298.

145. Orr TE, Villars P, Mitchell SL, Hsu HP, Spector M. Compressive properties of cancellous bone defects in a rabbit model treated with particles of natural bone mineral and synthetic hydroxyapatite. *Biomaterials* 2001, 22:87-96.
146. Spector M. Anorganic bovine bone and ceramic analogs of bone mineral as implants to facilitate bone regeneration. *Clin Plast Surg* 1994,21:437-444. .
147. Zielak JC Locatelli P, Giovanini AF, Deliberador TM, Urban CA et al. Comparative ultrastructure evaluation of particle biomaterial of ovine origin. *RSBO* 2011,8(1):36-42.
148. Ylä-Soininmäki A MN, Turco G, Paoletti S, Aro HT. Quantitative characterization of porous commercial and experimental bone graft substitutes with microcomputed tomography. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2013, 101(8):1538-48.
149. Glisanz V, Roe T, Gibbens DT, Schulz EE, Carlos ME, Gonzalez O, Boechat MI. Effects of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. *Am J Physiol* 1988,255:E416-E421.
150. Newman E, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia:current status and comparison with other animal models. *Bone* 1995,16:277S-284S.
151. Castaneda S ,Largo R, Calvo E et al. Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. *Skeletal Radiol* 2006,35:34-41.
152. Cavalcanti SC, Pereira C, Mazzonetto R, de Moraes M, Moreira RW. Histological and histomorphometric analyses of calcium phosphate cement in rabbit calvaria. *J Craniomaxillofac Surg* 2008,36:354-359.
153. Torres J, Tamimi F, Tresguerres IF, et al. Effect of solely applied platelet-rich plasma on osseous regeneration compared to Bio-Oss:a morphometric and densitometric study on rabbit calvaria. *Clin Oral Implants Res* 2008,10:106-112.
154. Sohn JY, Park J, Um YJ, et al. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. *J Periodontal Implant Sci* 2010,40:180-187.
155. Rompen EH, Biewer R, Vanheusden A, Zahedi S, Nusgens B. The influence of cortical perforations and of space filling with peripheral blood on the kinetics of guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res* 1999,10:85-94.

156. Williams SK, Kleinert L, Hagen KM, Clapper DL. Covalent modification of porous implants using extracellular matrix proteins to accelerate neovascularisation. *J Biomed Mater Res A* 2006,78:59-65.
157. Sung HJ, Meredith C, Johnson C, Galis SZ. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials* 2004,25:5735-5742.
158. Duda DG, Cohen K, Scadden DT, Jain RK. A protocol for phenotypic detection and enumeration of circulating endothelial cells and circulating progenitor cells in human blood. *Nat Protoc* 2007,2:805-810.
159. Peters F, Reif D. Functional materials for bone regeneration from  $\beta$ -tricalcium phosphate. *Materwiss Werksttech* 2004,35:203-207.
160. Klein M, Goetz H, Pazen S, Al-Nawas B, Wagner W, Duschner H. Pore characteristics of bone substitute materials assessed by microcomputed tomography. *Clin Oral Impl Res* 2009,20:67-74.
161. Chiu YC, Cheng M, Engel H, Kao SW, Larson JC, Gupta S, Brey EM. The role of pore size on vascularisation and tissue remodeling in PEG hydrogels. *Biomaterials* 2011,32:6045-6051.
162. Klenke FM, Liu Y, Yuan H, Hunziker EB, Siebenrock KA, Hofstetter W. Impact of pore size on the vascularisation and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. *J Biomed Mater Res A* 2008,85:777-786.
163. Figueiredo M, Henriques J, Martins G, Guerra F, Judas F, Figueiredo H. Physicochemical characterization of biomaterials commonly used in dentistry as bone substitutes- comparison with human bone. *J Biomed Mater Res part B* 2010,92B:409-419.
164. Rouahi M, Gallet O, Champion E, Dentzer J, Hardouin P, Anselme K. Influence of hydroxyapatite microstructure on human bone cell response. *J Biomed Mater Res A* 2006,78:222-235.
165. Lecomte A, Gautier H, Bouler JM, Gouyette A, Pegon Y, Daculsi G, Merle C. Biphasic calcium phosphate: a comparative study of interconnected porosity in two ceramics. *J Biomed Mater Res B:Applied Biomaterials* 2008,84:1-6.
166. Park JW, Kim E, Jang JH, Suh JY, Park KB, Hanawa T. Healing of rabbit calvarial bone defects using biphasic calcium phosphate ceramics made of

- submicron-sized grains with a hierarchical pore structures. *Clin Oral Impl Res* 2010, 21:268-276.
167. Kusumbe AP, Ramasamy S, Adams RK. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature* 2014,507:323-328.
  168. Murai M, Sato S, Fukase Y, Yamada Y, Komiyama K, Ito K. Effects of different sizes of beta-tricalcium phosphate particles on bone augmentation within a titanium cap in rabbit calvarium. *Dentistry Material Journal* 2006,25:87-96.
  169. Malinin TI, Carpenter E, Temple HT. Particulate bone allograft incorporation in regeneration of osseous defects;importance of particle sizes. *The Open Orthopaedics Journal* 2007,1:19-24.
  170. Chackartchi T, Iezzi G, Goldstein M, Klinger A, Soskolne A, Piattelli A, Shapira L. Sinus floor augmentation using large (1-2mm) or small (0.25-1mm) bovine bone mineral particles: a prospective, intra-individual controlled clinical, micro-computerized tomography and histomorphometric study. *Clin Oral Impl Res* 2011,22:473-480.
  171. Champion CR, Chander C, Buckland T, Hing KA. Increasing strut porosity in silicate-substituted calcium phosphate bone graft substitutes enhances osteogenesis. *J Biomed Mater Res B: App Biomater* 2011,97(2):245-254.
  172. Bignon A, Chouteau J, Chevalier J, Fantozzi G, Carret JP, Chavassieux P et al. Effect of micro and macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response. *J Mater Sci: Mater Med* 2003,14(12):1089-1097.
  173. Ohtsubo S, Matsuda M, Takekawa M. Angiogenesis after sintered bone implantation in rat parietal bone. *Histol Histopathol* 2003,18(1):153-163.
  174. El-Ghannam A, Ducheyne P, Shapiro IM. Effect of serum proteins on osteoblast adhesion to surface-modified bioactive glass and hydroxyapatite. *J Orthop Res* 1999,17:340-346.
  175. Jenney CR, Anderson J. Adsorbed serum proteins responsible for surface dependant human macrophage behavior. *J Biomed Mater Res* 2000,49:435-447.



176. Brodbeck WG, Colton E, Anderson J. Effects of adsorbed heat labile serum proteins and fibrinogen on adhesion and apoptosis of monocytes/macrophages on biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* 2003,14:671-675.
177. Milleret V, Buzzi S, Gehrig P, Ziogas A, Grossmann J, Schilcher K, Zinkernagel AS, Zucker A, Ehrbar M. . Protein adsorption steers blood contact activation on engineered cobalt chromium alloy oxide layers. *Acta Biomater* 2015, 24:343-351.
178. Anderson JM. Biological Responses to Materials *Annu Rev Mater Res* 2001, 31:81-110.
179. Henson PM, Johnston R. Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. *J Clin Invest* 1987, 73(3):669-674.
180. Henson PM. Pathologic mechanisms in neutrophil-mediated injury. *Am J Pathol.* 1972,68(3): 593–612.
181. Henson PM. Mechanisms of exocytosis in phagocytic inflammatory cells. Parke-Davis Award Lecture. *Am J Pathol* 1980,101:494-511.
182. Gauthier O, Bouler J, Weiss P, Bosco J, Aguado E, Dacuisi G. Short-term effects of mineral particle sizes on cellular degradation activity after implantation of injectable calcium phosphate biomaterials and the consequences for bone substitution. *Bone* 1999, 25(2Suppl):71s-74s.
183. Fellah BH, Delorme B, Sohier J, Magne D, Hardouin P, Layrolle P. Macrophage and osteoblast response to biphasic calcium phosphate microparticles. *J Biomed Mater Res A* 2010,93:1588-1595.
184. Xia Z, Triffitt J. A review on macrophage responses to biomaterials. *Biomed Mater* 2006,1(1):R1-9.
185. Tondravi M, McKercher S, Anderson K, Erdmann J, Quiroz M, Maki R, Teitelbaum S. Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature* 1997,386:81-84.
186. Jutras I, Desjardines M. Phagocytosis:at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2005,21:511-527.
187. Ghanaati S, Barbeck M, Orth M, Willershausen I, Thimm BW, Hoffmann C, Rasic A, Sader RA, Unger RE, Peters F, Kirkpatrick CJ. Influence of  $\beta$ -tricalcium

- phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo. *Acta Biomaterialia* 2010,6:4476-4487.
188. Thevenot P, Hu W, Tang L. Surface chemistry influence implant biocompatibility. *Curr Top Med Chem* 2008,8:270-280.
  189. McNally AK, Jones J, Macewan SR, Colton E, Anderson JM. Vitronectin is a critical protein adhesion substrate for IL-4 induced foreign body giant cell formation. *J Biomed Mater Res A* 2008,86:535-543.
  190. Paul NE, Skazik C, Harwardt M, Bartneck M, Denecke B, Klee D, Salber J, Zwadlo-Klarwasser G. Topographical control of human macrophages by a regular microstructured polyvinylidene fluoride surface. *Biomaterials* 2008,29:4056-4064.
  191. Vardaxis N, Ruijgrok J, Rietveld D, Marres E, Boom M. Chemical and physical properties of collagen implants influence their fate in vivo as evaluated by light and confocal microscopy. *J Biomed Mater Res* 1994, 28:1013-1025.
  192. Mitragotri S, Lahann J. Physical approaches to biomaterial design. *Nat Mater* 2009,8:15-23.
  193. Gwinnett A, Tay F. Early and intermediate time response of the dental pulp to an acid etch technique in vivo. *Am J Dent* 1998, 11:S35-S44.
  194. Rich A, Harris A. Anomalous preferences of cultured macrophages for hydrophobic and roughened substrata. *J Cell Sci* 1981,50:1-7.
  195. Salthouse TN. Some aspects of macrophage behavior at the implant interface. *J Biomed Mater Res* 1984,18:395-401.
  196. Takebe J, Champagne C, Offenbacher S, Ishibashi K, Cooper L. Titanium surface topography alters cell shape and modulates bone morphogenetic protein 2 expression in the macrophage cell line. *J Biomed Mater Res Part A* 2003,64:207-216.
  197. Champagne C, Takabe J, Offenbacher S, Cooper L. Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that induce bone morphogenetic protein-2. *Bone* 2002,30:26-31.
  198. Albrektsson T, Dahlin C, Jemt T, Sennerby L, Turri A, Wennerberg A. Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign body reaction? *Clin Implant Dent Relat Res* 2014, 16(2):155-65.

199. Trindade R, Albrektsson T, Pentti Tengvall, Ann Wennerberg. Foreign body reaction to biomaterials: On mechanisms for buildup and breakdown of osseointegration. *Clin Impl Dent Relat Res* 2016,1(18):192-203.
200. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 2008,20:86-100.
201. Trindade R, Albrektsson T, Wennerberg A. A current concept for the biological basis of dental implants: Foreign body equilibrium and osseointegration dynamics. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2015,27:175-183.
202. Honma T, Hamasaki T. Ultrastructure of multinucleated giant cells apoptosis in foreign body granuloma. *Virchows Arch* 1996,428(3):165-176.
203. Annibali S, Lezzi G, Sfasciotti GL, Cristalli MP, Voza I, Mangano C, La Monaca G, Polimeni A. Histological and histomorphometric human results of HA-Beta-TCP 30/70 compared to three different biomaterials in maxillary sinus augmentation at 6 months:a preliminary report. *BioMed Research International* 2015,1-7.

## **BIOGRAFSKI PODACI**

Dr Marko Pejović je rođen 04.11.1982. godine u Beogradu, Republika Srbija. Osnovnu i srednju Zubotehničku školu je završio u Beogradu. Na Stomatološki fakultet, Univerziteta u Beogradu, upisan je školske 2001/2002 godine i diplomirao je u julu 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,00 (devet i 00/100).

Učestvovao je na 47. kongresu studenata biomedicinskih nauka sa jednim studentskim radom. Pripravnički staž je obavio na klinikama Stomatološkog fakulteta u Beogradu i položio stručni ispit marta 2010. godine.

Doktorske studije na Stomatološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, upisao je školske 2009/2010 godine, na modulu „Klinička istraživanja zasnovana na bazičnim naukama“ i položio sve ispite sa prosečnom ocenom 9,73 (devet i 73/100). Bio je učesnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Genetička kontrola i molekularni mehanizmi inflamatornih, razvojnih i malignih oboljenja glave i vrata“ (175075) u periodu od 2011-2013. godine.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Marko Pejović

број индекса 17/09

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Uticaj strukture i veličine granula različitih koštanih zamenika  
na neoangiogenezu pri regeneraciji kosti

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

### Потпис докторанда

У Београду, 07.09.2016.

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Marko Pejović

Број индекса 17/09

Студијски програм Klinička istraživanja zasnovana na bazičnim naukama

Наслов рада Uticaj strukture i veličine granula različitih koštanih zamenika na neoangiogenezu pri regeneraciji kosti

Ментор prof. dr Snježana Čolić

Потписани/а Marko Pejović

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 07.09.2016.

\_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

---

### Uticaj strukture i veličine granula različitih koštanih zamenika na neoangiogenezu pri regeneraciji kosti

---

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство – некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_  
07.09.2016.

\_\_\_\_\_

1. Ауторство – Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.