

УНИВЕРЗИТЕТ У ПРИШТИНИ СА ПРИВРЕМЕНИМ  
СЕДИШТЕМ У КОСОВСКОЈ МИТРОВИЦИ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Момир З. Стевановић

Утицај новосинтетисаних скафолда на  
остеогенезу *in vivo*

Докторска дисертација

Косовска Митровица, 2022.

UNIVERSITY OF PRISTINA TEMPORARY SETTLED IN  
KOSOVSKA MITROVICA  
FACULTY OF MEDICINE

Momir Z. Stevanović

Influence of newly synthesized scaffolds on *in vivo*  
osteogenesis

Doctoral Dissertation

Kosovska Mitrovica, 2022.

Ментор:

Проф. др Саша Табаковић, ванредни професор, Медицински факултет, Универзитет у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици

Чланови комисије:

Проф. др Горан Виденовић, редовни професор - председник  
Медицински факултет, Универзитет у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици

Проф. др Милица Мијовић, редовни професор - члан  
Медицински факултет, Универзитет у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици

Проф. др Драган Марјановић, ванредни професор - члан  
Медицински факултет, Универзитет у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици

Проф. др Саша Табаковић, ванредни професор - члан  
Медицински факултет, Универзитет у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици

Доц. др Мирослав Васовић, доцент - члан  
Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу

Датум одбране:

## **Захвалница**

## Сажетак

**Увод.** Коштано ткивно инжењерство (КТИ) представља специјализован хируршки поступак надокнаде изгубљеног коштаног ткива посебном мимикријом дефекта који се испуњава заменицима за кост (скафолдима) који служе као матрица матичним остеопрогениторним ћелијама за стварање новог коштаног ткива. Синтетички стехиометријски хидроксиапатит (НАР) представља најчешће примењени биоматеријал за израду скафолда у КТИ због изузетне биоактивности, биокомпатибилности, остеокондуктивности као и хемијског састава сличног костима. Уочено је да танке композитне превлаке природним биоразградивим полимерима поспешују механичке особине НАР, хемијску стабилност, биоактивност, биокомпатибилност и антимикуробна својства. Један од могућих полимера за примену у КТИ је и полиетилен имин (PEI), који је до сада коришћен у генској терапији као вектор, због биокомпатибилности.

**Циљ.** Циљ ове студије био је испитивање ефекта новосинтетисаних скафолда: хидроксиапатит - полиетиленимина (НАР/PEI) и хидроксиапатит поли (лактид-ко-гликолида) (НАР/PLGA) на коштану регенерацију *in vivo* на *critical-size* дефекту мандибуле свиње у поређењу са конвенционално примењиваним ксенографтом Bio-Oss®Geistlich, као контролном групом.

**Материјал и метод.** Синтеза НАР/PEI и НАР/PLGA скафолда обављена је у Институту за нуклеарна истраживања у Винчи у три фазе: синтеза праха хидроксиапатита (НАР), добијање гранула НАР-а и депозиција танког филма поли (лактид-ко-гликолида) (PLGA) или полиетиленимина (PEI) на површину гранула. Експерименталне животиње биле су домаће свиње (*Sus scrofa domestica*) старе 3 месеца (тежине 20-25 kg). У студију је укључено 15 домаћих свиња. Укупно је овом методом направљено 90 дефеката на 15 мандибула те су формиране три групе са по 30 дефеката: Bio-Oss група, НАР/PLGA група и НАР/PEI група. После 4 месеца животиње су жртвоване на хуман начин. Потом су мандибуле извађене и исечене на једнаке половине ради радиолошке и патохистолошке анализе. Коштани дефекти су анализирани помоћи СВСТ апарата. Хистолошка анализа и генска експресија на остеокалцин, рецепторски активатор за нуклеарни фактор κВ лиганд (RANKL) и остеопротегерин (OPG) су спроведене након припреме ткива.

**Резултати.** Добијени резултати показали су да постоји статистички значајна разлика у густини новоформираног ткива у формираном дефекту у НАР/PLGA и НАР/PEI групама у поређењу са Bio-Oss групом. Добијени резултати су показали да је број активних остеобласта значајно мањи у Bio-Oss групи у поређењу са НАР/PLGA и НАР/PEI групама. Имунохистохемијска анализа коштаног ткива доње вилице показала је да је имунореактивност на остеокалцин значајно нижа у Bio-Oss групи у поређењу са НАР/PEI. Патохистолошка анализа је показала да је количина колагена у новоствореној кости била значајно мања у Bio-Oss графту у поређењу са НАР/PLGA и НАР/PEI. У сва три истраживана региона, показано је да је релативна експресија OPG гена била значајно нижа у Bio-Oss групама у поређењу са НАР/PLGA и НАР/PEI. Показано је да је однос RANKL/OPG био значајно нижи у Bio-Oss групи у поређењу са НАР/PLGA, као и НАР/PEI групама у свим истраживаним регионима.

**Закључак.** Примена композитних скафолда НАР/PLGA и НАР/PEI резултује значајно бољом репарацијом коштаног дефекта у поређењу са комерцијалним скафолдом у виду веће густине и минерализованости кости, формирања нормалног коштаног ткива, правилне хистолошке структуре, већег број активних остеобласта који депонују коштани матрикс унутар коштаног дефекта, веће депозиције колагена у остеоиду, веће експресије остеокалцина и нижег RANKL/OPG односа.

**Кључне речи:** композитни скафолд, полиетилен имин, хидроксиапатит, поли (лактид-ко-гликолид), дефект мандибуле

Научна област: Стоматологија

Ужа научна област: Пародонтологија и орална медицина

УДК број:

## Abstract

**Introduction.** Reconstruction of the facial and jaw bone defects is a significant problem in oral and maxillofacial surgery due to specific esthetic and functional requirements. To overcome drawbacks of conventional bone regeneration procedures, extensive research on bone tissue engineering (BTE) with bio-mimicking inspired bone replacement materials, has been performed in past three decades. BTE comprise interaction of several key factors in bone regeneration: a biocompatible scaffold serving as a extracellular matrix in which osteogenic cells form bone tissue matrix, morphogenic signals and proteins that help to direct the cells differentiation to osteogenic phenotype and sufficient vascular supply. Bone tissue is a natural composite built as a mixture of organic (collagen fibers) and inorganic substance (hydroxyapatite crystals). Thus, composite scaffolds combining advantages of biodegradable polymers with bioceramics to induce bone repair, have been extensively studied. Biocomposites hydroxyapatite ceramics (HAP) are highly biocompatible and resemble the natural bone structure and its mechanical and osteoconductive properties are enhanced with thin biodegradable polymer coating. Recent studies found that composite scaffolds composed of HAP and poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) had numerous desirable characteristics such as excellent biocompatibility, adequate mechanical properties and desirable structural requirements (>50% total porosity and >100  $\mu\text{m}$  average pore size) for successful bone repair. In regard to biocompatible polymers, polyethyleneimine (PEI) could be an interesting novel biopolymer for scaffold construction due to its biocompatibility, chemical structure and cellular activity.

**Aim.** The main purpose of this study was to introduce novel bone scaffold based on non-stoichiometric HAP with surface modification based on PEI deposition (HAP/PEI) and evaluate its effect on bone repair in swine's mandibular defects. Additionally, the obtained results for radiological and histological analysis were compared with those for the well-known commercial products composite scaffold HAP/PLGA (ALBO OS) and xenograft Bio-Oss®Geistlich.

**Material and methods.** Scaffolds were prepared using the method of polymer foam template in three steps. Pigs, 3 months old, were used and defects were made in the canine, premolar and molar area of their mandibles. Four months following the surgical procedure, the bone was analyzed using radiological, histological and gene expression techniques.

**Results.** Regardless of localization, our results showed that bone density was significantly lower in the Bio-Oss group compared to HAP/PLGA and HAP/PEI groups. Obtained results demonstrated that the number of active osteoblasts was significantly lower in the Bio-Oss group compared to HAP/PLGA and HAP/PEI groups in canine, premolar and molar areas. Immunohistochemical analysis of mandibular bone tissue demonstrated that the immunoreactivity to osteocalcin was significantly lower in the Bio-Oss group compared to HAP/PEI. Pathohistological analysis demonstrated that the amount of collagen in the newly created bone was significantly lower in Bio-Oss grafts compared to HAP/PLGA and HAP/PEI in canine, premolar and molar regions. RANKL/OPG ratio was significantly lower in the Bio-Oss group compared to HAP/PLGA as well as HAP/PEI groups in all investigated regions.

**Conclusion.** Hydroxyapatite ceramics/Polyethylenimine composite scaffold demonstrated improved biological behavior compared to conventional allograft in treatment of swine's mandibular defects, in term of bone density and bone tissue histological characteristics.

**Key words:** composite scaffolds, polyethylenimine, hydroxyapatite ceramics, poly (lactide-co-glycolide), mandibular defect

Scientific field: Dentistry

Scientific subfield: Periodontology and Oral Medicine

UDC number:



# Садржај

1	УВОД.....	1
1.1	Грађа кости .....	1
1.2	Коштани екстрацелуларни матрикс .....	2
1.3	Остеобласти и остеоцити.....	3
1.4	Остеогенеза и ремоделовање кости.....	4
1.5	Зарастање дефекта кости и коштани заменици.....	4
1.6	Заменици за кост .....	5
1.7	Коштано - ткивно инжењерство .....	11
1.8	Скафолди.....	13
1.8.1	Хидроксиапатит .....	17
1.8.2	НАР/PLGA скафолд.....	19
1.8.3	Полиетиленимин и КТИ.....	24
2	ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА .....	26
3	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ .....	28
3.1	Синтеза скафолда .....	28
3.1.1	Синтеза праха НАР .....	28
3.1.2	Синтеза гранула НАР .....	29
3.1.3	Депозиција танког филма PLGA или PEI на површину гранула НАР .....	29
3.2	<i>In vivo</i> експеримент на животињама.....	30
3.2.1	Хируршка процедура.....	30
3.3	Мерење густине кости у дефекту помоћу компјутеризоване томографије конусног зрака (СВСТ).....	36
3.4	Хистолошка и хистоморфометријска анализа.....	37
3.4.1	Припрема ткива за патохистолошку анализу.....	37
3.4.2	Бојење хематоксилином и еозином.....	38
3.4.3	Бојење колагена Sirius red методом.....	38
3.4.4	Бојење колагена трихромном методом по Masson-у .....	39
3.4.5	Имунохистохемија .....	40
3.4.6	Alizarin red хистохемијска техника .....	41
3.4.7	Toluidin blue хистохемијска техника.....	41

3.5	RT-PCR анализа активности RANKL/OPG .....	41
3.6	Испитивање токсичности материјала.....	42
3.7	Статистичка обрада података.....	43
4	РЕЗУЛТАТИ .....	45
4.1	Евалуација густине кости применом СВСТ .....	45
4.2	Број ћелија у истраживаним регионима.....	50
4.3	Имунореактивност на остеокалцин .....	59
4.4	Депозиција колагена .....	63
4.5	Експресија гена укључених у ремоделацију кости.....	71
4.6	Резултати испитивања системске токсичности препарата.....	87
5	ДИСКУСИЈА .....	91
6	ЗАКЉУЧАК .....	109
7	СКРАЋЕНИЦЕ .....	111
8	ЛИТЕРАТУРА .....	113

# I

# УВОД

# 1 УВОД

Хируршко лечење бенигнух и малигнух тумора костију максилофацијалне регије, акутних и хроничних инфекција као и деформитета максилофацијалне регије резултује коштаном дефектом. Терапија коштаног дефекта максилофацијалне регије представља деликатан проблем савремене регенеративне хирургије због специфичних естетских и функционалних захтева. Услед проблема које са собом носи примена аутологних трансплантата, који представљају златни стандард у регенеративној терапији, као што су додатна хируршка интервенција и морбидитет донорске регије, у терапији коштаног дефекта све више се користе скафолди у виду коштаног ткивног регенерације. Механизам коштаног ткивног регенерације подразумева примену скафолда који служе као матрица матичним остеопрогениторним ћелијама за стварање новог коштаног ткива.

Предмет докторске дисертације је испитивање утицаја новосинтетисаних композитних скафолда на бази синтетисаног хидроксиапатита (НАР) и синтетских биокompatibilних полимера поли (лактид-ко-гликолида) (PLGA) и полиетилен-имина (PEI) на коштану регенерацију дефекта критичне величине у *in vivo* условима и упоређивање са истим параметрима постигнутим најчешће примењиваним комерцијалним коштаном замеником.

## 1.1 Грађа кости

Кост је минерализовано потпуно ткиво грађено од коштаног ткива и минерализованог екстрацелуларног матрикса (ЕЦМ). У погледу односа минерализованог матрикса и ћелијског удела дели се на компактну и спонгиозну кост. Компактна кост прекрива површину свих костију, чини 80% скелета, јаче је минерализована, са мањим уделом ћелија, отпорнија на савијање и торзију. Коштано ткиво је распоређено у виду

ламела између којих се налазе Хаверсови (Haversian) канали који се пружају паралелно с осовином кости као и попречни, Волкманови (Volkmann) канали. Спонгиозна кост је мекша, еластичнија, обликује коштане гредице, а просторе између њих испуњава коштана срж. Остеобласти су ћелије одговорне за стварање кости, синтетишу органски екстрацелуларни матрикс и учествују у његовој минерализацији. Диференцијација и развој остеобласта из недиферентованих остеопрогениторских ћелија је под утицајем коштаних морфогенетских протеина (BMP) и других фактора раста који се ослобађају из макрофага, остеокласта и имуногених ћелија. Остеобласти по завршетку минерализације бивају трајно диферентовани у остеоците, унутар коштаног матрикса, где задржавају минималну метаболичку активност. Остеоцити остају повезани са остеопрогениторним ћелијама те имају механорецепторну улогу и улогу у регулацији хомеостазе нивоа калцијума.<sup>1,2</sup> Остеокласти су мултинуклеарне ћелије чија је функција разградња коштаног ткива. Регулација њихове диференцијације је под утицајем остеопротегерина, рецепторског активатора за нуклеарни фактор κВ лиганд (RANKL), трансформишућег фактора раста β (TGF-β) и макрофагног стимулишућег фактора.<sup>1,2</sup>

## 1.2 Коштани екстрацелуларни матрикс

Минерализован коштани матрикс се састоји од органског (30 - 40 %) и неорганског (60 - 70%) дела. Неоргански део претежно чини калцијум фосфат у облику кристала хидроксиапатита ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) док органски део у највећем проценту сачињава колаген тип I уз мањи удео протеогликана, гликопротеина, еластина, фактора раста и диференцијације попут BMP-а.<sup>1,2</sup>

Органски део матрикса назива се остеоид и састоји се претежно из протеина колагена (90%) у виду колагених влакана и у мањем уделу остеокалцина (протеин специфичан за

кост), остеопонтинина, киселих сијалопротеина, адхезивних протеина, гликопротеина, протеогликана и липида који чине основну супстанцу матрикса.<sup>3</sup> У ЕЦМ присутни су и различити фактори раста и цитокини, као што су: фактор трансформације раста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), коштани морфогенетски протеини (BMP 1-6), инсулину слични фактори раста и интерлеукини (IL-1, IL-6) који учествују у пролиферацији, диференцијацији и активацији ћелија и регенерацији коштаног ткива.<sup>4</sup>

Неоргански део матрикса чине кристали слични хидроксиапатиту, а у коштаном кристалима поред калцијума и фосфата налазе се и карбонати, магнезијум, натријум цитрат, у мањој мери флуориди. У траговима су присутни гвожђе, бакар, олово, манган и алуминијум.<sup>4</sup> Кристали хидроксиапатита су дужине око 10 nm, пречника 1,5-3 nm и везани су за колагена влакна.<sup>4</sup>

### 1.3 Остеобласти и остеоцити

Остеобласти воде порекло од недиферентованих остеопрогениторских ћелија и имају улогу у синтези органских компоненти матрикса. Одликују се поларизацијом једара која се налазе насупрот коштане површине на којој се депонује органски материјал.<sup>5</sup> У току процеса минерализације, соли калцијума депонују се у остеоид, док танак слој неминерализованог остеоида дели површинске остеобласте од минерализованог матрикса. У току минерализације остеообласти су све време повезани цитоплазматским наставцима, али бивају окружени минерализованим ткивом и када се потпуно окрузе у коштаној лакуну, трансформишу се у зреле коштане ћелије – остеоците или умиру у процесу апоптозе.<sup>5</sup> На функцију остеобласта најјачи ефекат имају паратхормон (PTH), витамин Д3, глукокортикоиди, естроген, простагландини и фактори раста. Када остеообласти депонујући матрикс постану потпуно окружени матриксом и престану да га луче, прелазе

у мирујуће стање, смањују се и називају остеоцити тј. зреле коштане ћелије, смештене у малим шупљинама - лакунама.

#### **1.4 Остеогенеза и ремоделовање кости**

Остеогенеза представља процес стварања кости који се одвија у фазама изградње (апозиција) и разградње (ресорпција) коштаног ткива. Изградња и ресорпција кости су уравнотежени процеси који одржавају хомеостазу коштаног ткива.<sup>1,2</sup> Ремоделовањем кости се мења облик кости у складу са физиолошким и спољним променама без промене масе коштаног ткива, већ његове прерасподеле у складу са функционалним оптерећењем.<sup>6</sup>

Ремоделација започиње пре рођења и траје до смрти. Брже се одвија у спонгиозној кости. Ремоделација кости је под утицајем системских (паратиреоидни хормон, калцитриол, калцитонин, естроген, андрогени хормони, тиреоидни хормони, глукокортикоиди) и локалних фактора (систем OPG/RANK/RANKL).<sup>1,2</sup>

#### **1.5 Зарастање дефекта кости и коштани заменици**

Урођени и посттрауматски деформитети, акутне и хроничне инфекције захтевају одређене хируршке интервенције на коштаном ткиву. Зарастање коштаног ткива одвија се као:

1. примарно коштано зарастање – подразумева зарастање без формирања калуса применом компресивне остеосинтезе у којој су коштани фрагменти у интимном односу и у потпуном мировању. У оваквим условима иницијална фрактурна пукотина активацијом остеокласта бива проширена да би се формирао простор за урастање остеопрогениторних ћелија и неоангиогенезу.
2. секундарно коштано зарастање је најчешћи тип зарастања у клиничкој пракси.

Зарастање дефеката кости протиче кроз 4 фазе:

- a) фаза формирања крвног угрушка
- b) фаза миграције инфламаторних ћелија (неутрофили, макрофаги) и ресорпција угрушка
- c) фаза миграције васкуларног ткива и мезенхималних ћелија у коагулум, настајање гранулационог ткива (остеоид), активација остеопрогениторних ћелија и минерализација
- d) фаза ремоделације у складу са физиолошким стимулусима

## 1.6 Заменици за кост

Иако коштано ткиво показује велики регенеративни потенцијал, већи коштани дефекти не могу у потпуности зарастати. У ту сврху се користе заменици за кост.

Врсте заменика за кост:

1. Аутографтови
2. Алогграфтови
3. Ксенографтови
4. Алопластични материјали

Коштани заменици би требало да испуне неколико улога: да пружају потпору ткиву, да имају улогу скелета кроз који прораста новоформирана кост, да стимулишу прорастање остеопрогениторних ћелија, да делују биокompatибилно и остеоиндуктивно.



У Табели 1. су дати примери комерцијално доступних коштаних замена.

**Табела 1.** Комерцијално доступни коштани заменици

<b>Коштани заменик</b>	<b>Материјал</b>
<b>Аутографт</b>	Интраорално: Мандибула: симфиза, корпус, рамус Максила: предњи зид горње вилице Екстраорално: васкуларизовани или аваскуларизовани коштани графт (илијачни гребен, скапула, фибула, ребра)
<b>Алографт</b>	OraGRAFT® (Life Net Health) MinerOss® (BioHorizons) Creos™ (Nobel Biocare) Puros® (Zimmer dental)
<b>Ксенографт</b>	Bio-OSS® (Geistlich) Zcore™ (Osteogenics) MinerOSS X® (BioHorizons)
<b>Скафолд</b>	ALBO-OS (Albos) Reprobone™ (Ceramysis) Novabone® (Novabone Products) Perioglass® (Novabone Products)

- **Аутографт** је коштани трансплантат са једног на друго место унутар исте јединке и сматра се златним стандардом међу трансплантатима јер уједињује остеогена, остеоиндуктивна и остеокондуктивна својства. Може бити трансплантат кортикалне кости, спонгиозне кости или њихова комбинација.

За дефекте у усној дупљи, аутографт се може узети интра- или екстраорално у зависности од величине дефекта. Остеогена својства аутогене кости обезбеђују остеогене прекурсорске ћелије и остеобласти. Остеоиндуктивна својства су омогућена присуством фактора раста у графту који утичу на миграцију и диференцијацију ћелија. Остеокондуктивна својства произилазе из тродимензионалне структуре трансплантата која одговара структури кости у дефекту. Ипак, примена аутографта има и озбиљних недостатака као што су додатна хируршка интервенција, инфекција, бол и утрнулост, морбидитет доворске регије и висок степен ресорпције графта.<sup>7,8</sup>

- **Алогени трансплантати** су трансплантати између генетски неједнаких припадника исте врсте а узимају се са живих или преминулих донора. Алографт нема остеогени потенцијал, а регенерација кости је продужена. Такође постоји могућност преноса болести и антигеност самог трансплантата. Ризик од ХИВ инфекције приликом примене алогених трансплантата процењује се на 1:1600000, у поређењу са ризиком приликом трансфузије који износи 1 на 450 000.<sup>9,10</sup> Поред свих метода припреме графта у доворском графту су присутни доворски остеоцити, хондроцити и фибробласти у суво смрзнутим препаратима кости, као и МНС протеини класе I и II.<sup>10,11</sup>

Доступне врсте алогених трансплантата су: свежа и смрзнута кост, минерализирани суво смрзнута коштани трансплантат (freeze-dried bone allograft, FDBA) и деминерализирани суво смрзнута коштани трансплантат (demineralized freeze-dried bone allograft, DFDBA). Свежа и смрзнута кост, иако имају највећи остеоиндуктивни и остеокондуктивни потенцијал, ретко се користе због повећаног ризика од имунолошке реакције и преноса болести.<sup>7,8</sup> DFDBA поседује остеоиндуктивна и остеокондуктивна својства, али слабије механичке карактеристике, због чега се користи у структурно стабилним дефектима, а у случају померања графта неће доћи до доброг срастања са ивицама дефекта.<sup>10</sup> Такође, ресорпција графта је израженија у поређењу са аутографтом.<sup>10</sup>

- **Ксеногени графт** је трансплантат узет од јединке друге врсте: коштаних минерала животињског порекла или од минерала који воде порекло од калцификованих корала код којих је органска компонента уклоњена како би се елиминисао ризик од имуногене реакције и од трансмисије разних обољења. Најчешће коришћени препарат је Bio-Oss (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland), депротеинизирани препарат говеђе кости који има 3Д архитектуру компарабилну са хуманим коштаном ЕЦМ. Ксенографт је инертан остеоиндуктивни материјал који служи као калуп за стварање нове кости. Споро се ресорбује, одликује се високом порозношћу која му даје висок остеоиндуктивни индекс али знатно смањује стабилност материјала.<sup>12,13</sup> Хемијски састав Bio-Oss-а је скоро идентичан саставу хуманог апатита, укупне порозности од око 75%.<sup>12,13</sup> 3Д порозност скафолда омогућава добра остеоиндуктивна својства овог графта, као и миграцију

и фиксирање ћелија за површину биоматеријала, инфилтрацију фиброваскуларног ткива и реваскуларизацију.<sup>12,13</sup>

- **Алопластични материјали** су синтетски, аноргански, инертни материјали који имају остеокондуктивни ефекат. Идеалан алопластични графт треба да буде биокомпатибилан, да не изазива инфламаторну реакцију, да подстиче остеогенезу, да буде ресорптиван и да поседује одговарајућа механичка својства. На тржишту постоје различити синтетски материјали: биоактивна стакла, стаклени иономери, алуминијев оксид, калцијум сулфат,  $\alpha$ - и  $\beta$ -трикалцијум фосфат (TCP), синтетски хидроксиапатит (HAP) и полимери.<sup>12</sup> Они својом 3Д архитектоницом имитирају грађу природне кости и служе као калуп за урастање остеопрогениторних ћелија.<sup>14</sup> Препарати калцијум фосфата имају одличну биокомпатибилност и не изазивају инфламаторну реакцију, примењени у коштани дефект стимулишу синтезу остеоида на површини материјала. Негативно својство ових материјала је њихова крхкост па нису погодни за употребу на местима која су под великим оптерећењем. Ради побољшања механичких особина комбинују се са различитим полимерима. Долазе на тржиште у облику гранула или блокова различите порозности. Материјали веће порозности и мање густине имају већу површину за васкуларизацију и урастање нове кости, али се и брже ресорбују.<sup>15</sup> Полиестри поли- $\epsilon$ -капролактон (PCL), полилактична киселина (PLA), полигликолична киселина (PGA) и њихов кополимер полилактид-ко-гликолид (PLGA) најчешће су коришћени због механичке стабилности, биокомпатибилности и ресорптивности. Због слабе остеокондуктивности и неодговарајућих механичких својстава користе се у комбинацији с другим материјалима (биостакло, керамика, колаген, хитосан).

Табела 2. Прегледна табела коштаних графтова

Коштани графт	Остеокондукција	Остеоиндукција	Остеогенеза	Предности	Недостаци
Аутографт узет интра- или екстраоралном методом	+	+	+	Одлична биолошка својства	Додатна операција Морбидитет донорске регије
Алогени трансплантат са живог или преминулог донора	+	+	-	Солидна биолошка својства	Имунолошка реакција Споро зарастање Трансмисија болести
Ксенотрансплантат (BioOss)	+	-	-	Доступност Предвидив механизам остеогенезе	Ресорпција Механичке особине
Алопластични материјали (калцијум фосфат, полимери, биокерамика, биостакло)	+	+	-	Механичке особине Биолошке особине	Механичке особине

## 1.7 Коштано - ткивно инжењерство

Коштано ткивно инжењерство (КТИ) представља специјализован хируршки поступак надокнаде изгубљеног коштаног ткива посебном мимикријом дефекта који се испуњава заменицима за кост који служе као матрица матичним остеопрогениторним ћелијама за стварање новог коштаног ткива.<sup>16</sup> Треба рећи да највећи број коштаных дефеката зараста примарно или уз помоћ стандардних конзервативних или хируршких метода. Ипак, коштани дефекти критичне величине који не могу примарно зарастати захтевају сложеније процедуре надокнаде коштаног ткива хируршким техникама са или без примене метода ткивног инжењеринга. Дакле, главни циљ КТИ јесте израда заменика за кост посебних карактеристика који ће не само испунити дефект кости критичне величине већ и омогућити оптималне услове за насељавање остеопрогениторних ћелија.<sup>17,18</sup>

Сами коштани заменици у контакту са коштаном ткивом изазивају један или више ефеката а то су<sup>19</sup>:

1. **остеокондукција** - тип зарастања кости апозицијом остеобласта из биоматеријала на кост домаћина и обрнуто
2. **остеоиндукција** - стимулација и активација мезенхималних матичних ћелија из ткива око графта за диференцијацију у остеопрогениторне ћелије
3. **остеогенеза** - способност стварања кости чак и у одсуству локалних остеопрогениторних ћелија
4. **остеоинтеграција** - премештавање површине кости домаћина и површине коштаног заменика коштаном ткивом. Остеокондукција, остеоиндукција и остеогенеза резултирају остеоинтеграцијом кости домаћина и заменика коштаног ткива.

У циљу решавања проблема изгубљеног коштаног ткива, инжењерство коштаног ткива главни акценат ставља на ткивну регенерацију а не на замену ткива, због чега постаје предмет све већег интересовања.<sup>20</sup>

Процес иницијације остеогенезе на месту апликовања коштаног графта умногоме зависи од иницијалне интеракције остеобласт/графт и карактеришу га 4 фазе:

- a. адсорпција протеина на површину графта
- b. контакт са округлим остеобластима
- c. везивање ћелије за графт и
- d. промена облика ћелије у пљоснат облик и активација<sup>21,22</sup>

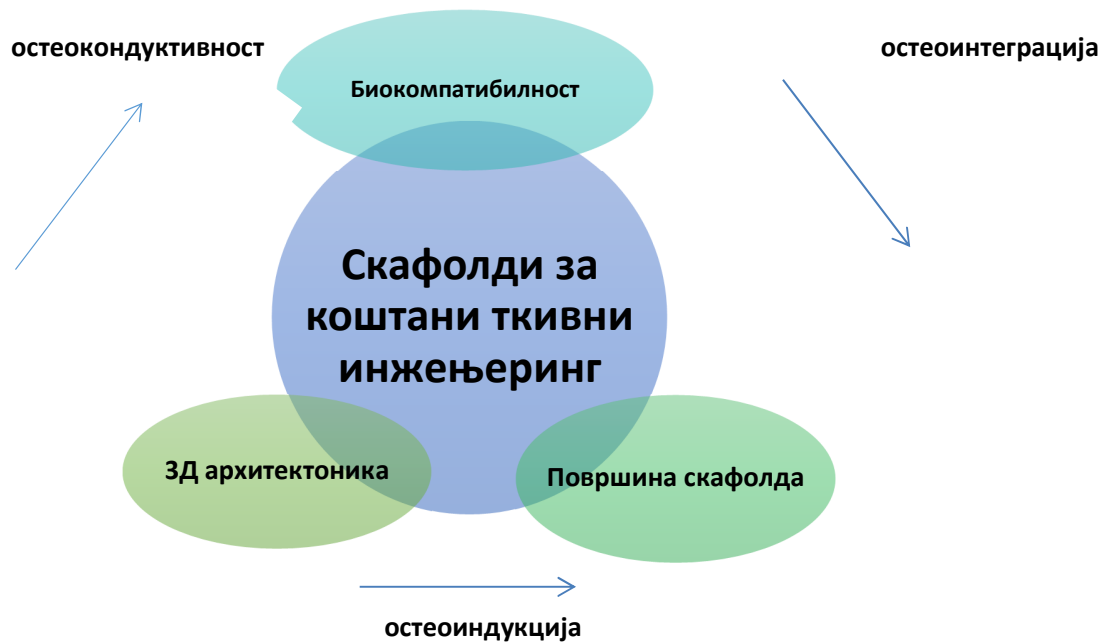
Познато је и да се прве две фазе дешавају унутар 90 минута након апликације графта, а цео процес активације остеобласта и промене облика на површини графта се завршава унутар 24h од имплантације у зависности од типа супстрата и ћелија.<sup>22</sup>

Разумевање основних механизма за настанак остеогене диференцијације матичних ћелија може бити од помоћи за дизајнирање функционалних биоматеријала за побољшавање остеогенезе и изградњу 3Д коштаних ткива. Скафолди као остеокондуктивни материјали побољшавају везивање, миграцију и дистрибуцију ћелија које учествују у процесу зарастања кости.<sup>23</sup> Савременим технолошким методама добија се скафолд одговајуће порозности и 3Д архитектонике који када се имплантира у коштани дефект имитира ЕЦМ, испољава остеокондуктивна својства, ћелије мигрирају у слободан простор матрикса што је праћено урастањем фиброваскуларног ткива и нових крвних судова а то је услов за диференцијацију остеобласта који почињу депоновање остеоида.<sup>23</sup>

## **1.8 Скафолди**

Ранија истраживања показала су да је конвенционална примена ауто- и алографтова за коштану регенерацију повезана са бројним ограничењима у смислу морбидитета донорске регије, доступности, преноса болести, имунолошке реакције.<sup>24-26</sup> Да би се премостили ови проблеми, велики број истраживача се бави изградом биодеградабилних порозних скафолда са оптималном 3Д архитектуром који служе као вештачки коштани ЕЦМ, у циљу добијања најбољег материјала за привремену мимикрију коштаног дефекта за ткивно инжењерство.<sup>27,28</sup> Посебан технолошки услов за израду скафолда оптималних карактеристика је стварање површине која одговара адхезији ћелија, са одговарајућом архитектоницом, величином и обликом пора, погодном за насељавање ћелија.<sup>29</sup> Такође, уз све наведене факторе велики број сигналних молекула има утицаја на процес коштаног зарастања.<sup>30,31</sup>





Фигура 1.1. Шема захтева које скафолд треба да испуњава у процесу коштаног ткивног инжењеринга

Захтеви које скафолд треба да испуни да би се имплантирао у организам подразумевају:

1. **Биокомпатибилност** у контакту са организмом је један од основних захтева. Подразумева да имплантирани материјал није токсичан, не изазива алергијску реакцију, није канцероген и мутаген, не изазива имунолошки одговор.
2. **Биодеградабилност** подразумева да се материјал скафолда постепено разграђује пратећи истовремено и регенерацију ткива. Овим путем разградња скафолда и регенерација ткива прате процес ремоделације ткива и умањују опасност од инфламаторног одговора. Такође, крајњи производи разградње скафолда морају бити биокомпатибилни и не смеју изазивати имуни одговор.

**3. Механичка својства** - скафолд мора бити довољно чврст да се може њиме руковати током хируршке интервенције али и да пружа довољну потпору ткиву на месту повреде због 3Д реконструкције дефекта. У коштаном - ткивном инжењерингу посебан је изазов одредити адекватне механичке карактеристике скафолда како због функционалних захтева тако и због процеса ремоделације који почиње брзо након остеогенезе.

**4. Површина скафолда** - Познато је да микро- и нанохрапавост површине материјала, хидрофилност површине и слабе ковалентне везе подржавају адсорпцију протеина на површини и омогућавају везивање ћелија за примарни протеински матрикс што је неопходно за остеоиндуктивна својства материјала.

**5. 3Д архитектура скафолда** је кључна за остеоиндуктивна и остеоиндуктивна својства скафолда. Идеалан скафолд треба да буде високо порозан, са адекватним распоредом и повезаношћу пора.

**5.1. Порозност и повезаност пора** - висок индекс порозности и међусобна повезаност пора омогућавају неометано насељавање остеопрогениторних ћелија, обезбеђују дифузију хранљивих материја из ЕЦМ, али и одвођење продуката разградње ткива.

**5.2. Величина пора скафолда** - сваки високо порозан скафолд састоји се из великог броја микро- и нанопора. Микропоре су значајне за насељавање ћелија и повољно је да у матриксу постоји што мања дискрепанца промера ових пора. Нанопоре значајно повећавају унутрашњу површину скафолда како би се омогућило ефикасно везивање критичног броја ћелија на скафолд.<sup>32</sup>

Данас се као скафолд најчешће користе комбинација керамичких носача (због механичких особина и биоактивности те служе као потпора током стварања коштаног

ткива) и полимерни носачи (због своје хидрофилне површине која погодује адхезији ћелија слично природном екстрацелуларном матриксу) (Фигура 2).<sup>33,34</sup> Тренутно постоји више техника за обраду конвенционалних полимерних материјала, прилагођене и проширене на уградњу неорганских биоактивних фаза у порозну 3Д полимерну мрежу са међусобно повезаним порама високе просторне густине, са правилном морфологијом, величином и дистрибуцијом.<sup>8</sup>



Фигура 1.2. Шема композитних скафолда

Имајући у виду да је природни коштани ЕЦМ комбинација органског/неорганског композита (колагена и хидроксиапатита), неопходно је синтетисати коштани супституент

који ће комбиновати предности обе компоненте.<sup>8,32</sup> Одличне хемијске и биолошке карактеристике НАР омогућавају његову биокомпатибилност и остеокондуктивност што га чини главним носачем скафолда.<sup>34,35</sup> Бројна истраживања НАР као скафолда у КТИ показала су да је висока биокомпатибилност његова главна предност, док је главни недостатак слабија механичка отпорност и крхкост па нису предвиђени за реконструкцију коштаног дефекта под оптерећењем.<sup>34-36</sup> Да би се премостили ови недостаци, бројне студије су показале да се механичка и биолошка својства НАР значајно поспешују када се у комбинацији са НАР користе полимери у виду танког слоја на површини материјала.<sup>37-40</sup>

Најчешће коришћен полимер у комбинацији са НАР је поли (лактид-ко-гликолид) (PLGA), чији је скафолд НАР/PLGA побољшаних механичких особина, ћелијске активности и пролиферације.<sup>37-40</sup>

### **1.8.1 Хидроксиапатит**

Хидроксиапатит ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) је у природи главни минерални састав коштаног ткива а као скафолд то је биоактивни керамички материјал високе биокомпатибилности јер формира директне хемијске везе са коштаном ткивом.<sup>41,42</sup> У коштаном ткиву НАР је депонован околу и унутар колагених влакана у виду танких плоча и штапића (дужине 20 - 40 nm, ширине 15 nm и дебљине 1,5 - 3 nm) у правилним размацима од 60 до 70 nm.<sup>43</sup> Стехиометријски хидроксиапатит, по саставу и структури најсличнији минералној компоненти у костима, има састав - 39,89 % Са, 18,50 % Р, Са/Р масени однос 2,151 и Са/Р моларни однос 1,67.<sup>44</sup> Биолошки апатити обично имају нешто нижи удео калцијума и у њиховој структури је углавном извршена супституција фосфатних јона карбонатним јонима (карбонатни апатит).<sup>45</sup>

Синтетички стехиометријски НАР представља најчешће примењени биоматеријал за израду скафолда у КТИ због изузетне биоактивности, биокompatibilности, остеокондуктивности као и хемијског састава сличног костима.<sup>32</sup> Ипак, због слабих механичких особина и крхкости, углавном се користи у форми композитних скафолда са полимерним материјалима.<sup>32</sup> Због особине да се чврсто везује за кост и поспешује минерализацију, НАР се наноси у виду превлаке на титанијумске имплантате.<sup>46</sup> Морфологија и механичка својства НАР у великој мери зависе од поступка синтетисања полазног праха хидроксиапатита.<sup>8</sup> Идеалан Са/Р однос је 1,67 који одговара стехиометријском НАР са теоријском густином од  $3,156 \text{ g/cm}^3$  и најсличнији је неорганској компоненти у костима.<sup>41</sup>

Велики број *in vivo* и *in vitro* истраживања показао је да се након примене НАР скафолда јавља брза активација и везивање остеобласта јер после имплантације скафолда долази до брзог таложења биолошког карбонатног НАР који је основни супстрат за везивање остеопрогениторних ћелија.<sup>47</sup> Такође, негативно наелектрисана површина растворљивих стехиометријских НАР поспешује ћелијску адхезију и рану фазу ћелијске диференцијације остеобласта.<sup>48</sup>

Познато је да се остеопрогениторне ћелије боље везују за храпавије површине него за глатке површине. У ту сврху, осим добрих биолошких карактеристика, топографија НАР скафолда на микроскопском и макроскопском нивоу има утицаја на ћелијску адхезију, пролиферацију и диференцијацију.<sup>8,32</sup> Ћелије на храпавој површини показују фенотип сличан остеобластима и ослобађају више фактора остеогенезе попут простагландина и TGF- $\beta$ .<sup>49</sup> *In vitro* истраживања су показала да остеопрогениторне ћелије не разликују површину синтетичког хидроксиапатита и кости, што указује на сличну биоактивност.<sup>32</sup>

Механичке карактеристике синтетичког хидроксиапатита углавном зависе од начина његове синтезе, притиска, услова синтеровања.<sup>8,32</sup> Техником синтеровања на високим температурама добијају се наночестице НАР високе порозности што доводи до добијања материјала са значајном адсорпцијом протеина и адхезијом остеопрогениторних ћелија.<sup>50</sup> Уочено је да танке композитне превлаке природним биоразградивим полимерима поспешују механичке особине НАР, хемијску стабилност, биоактивност, биокомпатибилност и антимикробна својства, али и упрошћују поступак синтеровања НАР.<sup>51</sup>

### **1.8.2 НАР/PLGA скафолд**

Бројне студије су показале одличне особине НАР/PLGA скафолда у реконструкцији коштаних дефеката. Одличне биолошке карактеристике НАР су искоришћене за носача скафолда, а недостаци у механичкој стабилности су премошћени премазивањем НАР скелета танким слојем PLGA полимера што је резултовало добијањем композитног скафолда одличних биолошких и механичких карактеристика. Улога танког слоја PLGA на НАР скафолду је вишеструка:

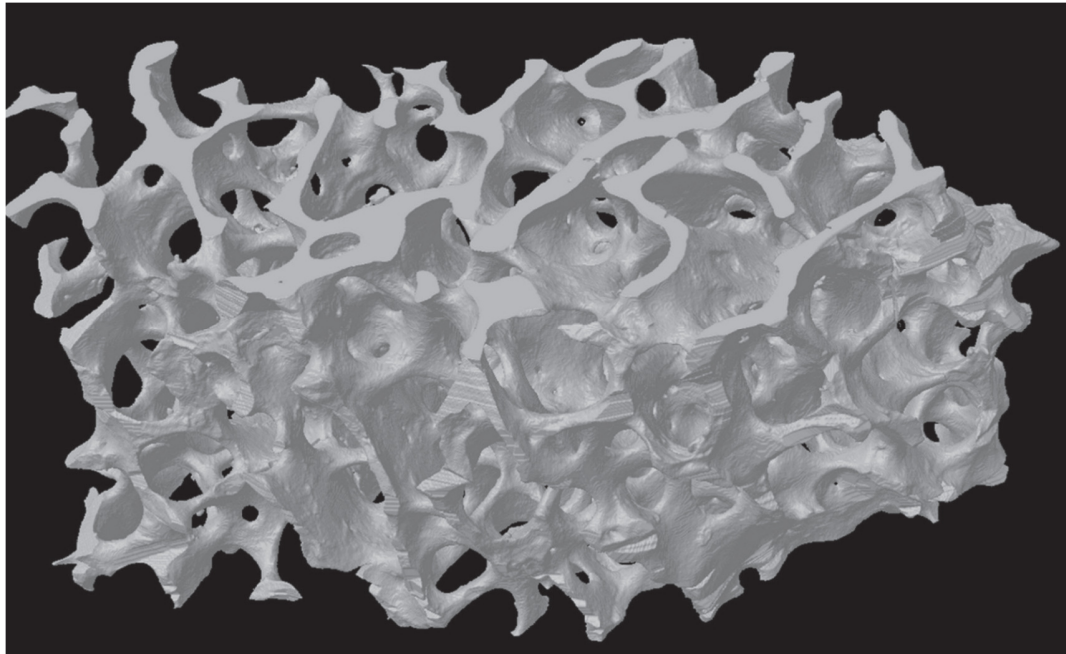
- Побољшава механичке карактеристике
- Висока чистоћа материјала
- Оптималан степен деградације који одговара брзини зарастања ткива
- Побољшање адхезије ћелија и ослобађање цитоплазматских метаболита<sup>52-54</sup>

Познато је да макро- и микро структура материјала има велики утицај на остеокондуктивни потенцијал скафолда. Морфологија НАР/PLGA скафолда се одликује високом порозношћу материјала и веома високим индексом повезаности пора (број

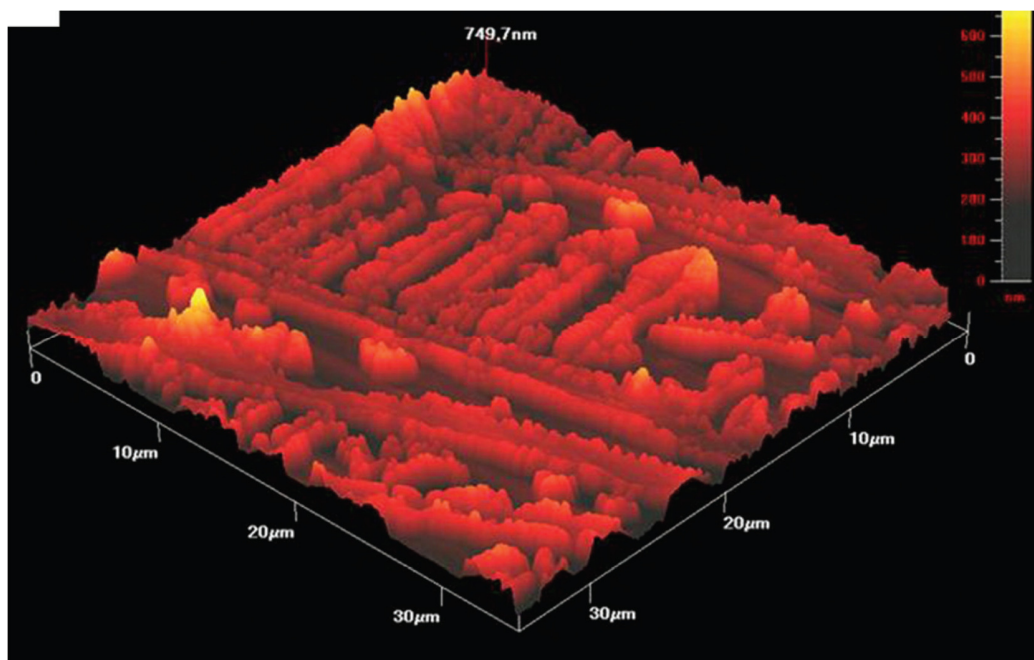
међусобно повезаних пора/mm<sup>2</sup>).<sup>38</sup> Распоред пора унутар скафолда је регуларне геометрије, величина пора HAP/PLGA скафолда се креће 30-400μм, са највећим бројем пора величине 115μм.<sup>38</sup> Такође, површина скафолда на нано нивоу показује висок степен порозности и неравну површину скафолда.<sup>38</sup> У поређењу са најчешће коришћеним ксенографтом, HAP/PLGA скафолди имају знатно већу порозност, већу међусобну повезаност пора, храпавију површину и већу учесталост ширих пора, на макро-, микро и наноскали.<sup>8,32,38</sup>



Фигура 1.3. Увећана слика блока HAP/PLGA скафолда (ALBO OS) (Преузето из Јокановић и сар.<sup>38</sup>)



Фигура 1.4. Увећана слика блока HAP/PLGA скафолда (ALBO OS) (Преузето из Јокановић и сар.<sup>38</sup>)



Фигура 1.5. Увећана слика блока HAP/PLGA скафолда (ALBO OS) (Преузето из Јокановић и сар.<sup>38</sup>)



Површинска топографија, број, величина и повезаност пора утичу на адхезију и пролиферацију остеобласта на скафолду.<sup>22</sup> Повољна топографија HAP/PLGA скафолда показала је у *in vitro* и *in vivo* студијама одличне биолошке карактеристике овог материјала. *In vitro* студије су указале на брзо везивање остеопрогениторних ћелија, адхезију за протеински биофилм на скафолду и промену облика ћелије као одраза метаболичке активности.<sup>22</sup> Јокановић и сар.<sup>32,38</sup> доказали су у *in vivo* условима да HAP/PLGA скафолд не изазива инфламаторну реакцију, узрокује неоангиогенезу и готово потпуну минерализацију дефекта критичне величине калварије зеца након 12 недеља, док су сви наведени параметри били статистички значајно бољи у поређењу са Bio-Oss ксенографтом.

Биоразградивост скафолда треба да је довољно брза да прати стопу неоостеогенезе и природан ток ремоделације кости, јер спора ресорпција скафолда може довести до касне инфламаторне реакције и фиброзног зарастања дефекта.<sup>55</sup> Претходне студије су показале да је ресорпција HAP/PLGA скафолда потпуна унутар 3-4 недеље, тј. стопа неоостеогенезе је пратила ресорпцију скафолда што је резултовало одсуством инфламаторне реакције.<sup>56</sup> Такође, разградња привременог ЕЦМ (скафолда) омогућава премошћавање дефекта новоствореном кости, тј. доказује остеоиндуктивни потенцијал скафолда. Постепена разградња скафолда је посредована активношћу остеокласта. PLGA се разграђује хидролизом естарских веза у воденој средини.<sup>57</sup> Имплантирани PLGA материјали могу изазвати инфламаторни одговор око графта услед киселих продуката хидролизе што може да угрози коштану регенерацију.<sup>58,59</sup> Са друге стране, бројне студије показују да примена HAP/PLGA скафолда повољно утиче на регенерацију дефеката критичне величине

калварије пацова или улне зеца, без инфламаторне реакције и са довољном аугментацијом коштане масе.<sup>60-62</sup>

Након опсежних операција на коштаном ткиву када се ради о потпуној ресекцији кости, попуњавање коштаног дефекта и омогућавање пуне функције вилице или екстремитета је изузетан захтев за регенеративну хирургију. Након ресекције кости пуне дебљине, кост се мора надокнадити тако да може да поднесе будућа оптерећења. Након ресекције костију вилице настали дефект се може премостити *load bearing* контурном плочицом и аутологним коштаном замеником, који може бити васкуларан и аваскуларан. Подаци у литератури о ефикасности HAP/PLGA скафолда су охрабрујући што се тиче будуће примене скафолда за реконструкцију оваквих дефеката. Истраживања HAP/PLGA скафолда за реконструкцију дефеката пуне дебљине кости на улни зеца показала су одличну коштану регенерацију и потпуно зарастање кости након 9 недеља.<sup>61</sup> Иако је спроведен велики број *in vitro* и *in vivo* студија, мало клиничких студија о употреби HAP/PLGA скафолда је објављено у литератури. Велики број студија говори о употреби HAP скафолда у регенеративној пародонтолошкој хирургији и њиховом повољном ефекту на реконструкцију мањих коштаных дефеката насталих услед хроничне ресорпције коштаног ткива, као и у реконструкцији *non-load bearing* дефеката у спиналној хирургији (Periosteum). Неколико студија се бавило применом HAP/PLGA скафолда у пародонталној хирургији. Стевановић и сар.<sup>63</sup> показују повољан утицај HAP/PLGA скафолда на репарацију инфракоштаных дефеката код пацијената са пародонтопатијом која је била боља у поређењу са истим параметрима након примене HAP скафолда. Сличне резултате су објавили Верарди и сар.<sup>64</sup> у студији у којој је показана значајно боља коштану регенерација инфракоштаных дефеката и 12 месеци након иницијалне интервенције.

### 1.8.3 Полиетиленимин и КТИ

Полиетиленимин (PEI) је полимер с понављајућом јединицом амина и уметнута два алифатична ланца [-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-]. Од раније је PEI коришћен за културе ткива у биолошким лабораторијама ради повезивања ћелијских култура. Разгранати PEI полимери поседују велику густину примарних, секундарних и терцијерних амино група, што им омогућава да у одговарајућој средини (pH <10) адсорбују протоне чиме амино ланци бивају позитивно наелектрисани.<sup>65,66</sup> Због ових особина PEI је дуго времена популарно средство за трансфекцију. PEI кондензује ДНК у позитивно набијене честице које се везују за анјонске остатке и уносе се у ћелију ендцитозом.<sup>67,68</sup> Ова особина разгранатих PEI полимера показала се ефикасном у авиралној генској терапији и регенерацији. Добра растворљивост, цитокомпатибилност у нижим концентрацијама и изражено побољшање адхезије хондрогених ћелија хитосан/ PEI скафолда представља могућ метод регенерације дефеката хрскавице.<sup>69</sup> Један од могућих полимера за примену у КТИ је и PEI, који је до сада коришћен у виду наночестичног вектора за имплементацију различитих фактора раста у коштани дефект због своје растворљивости.<sup>40</sup>

У литератури за сада нема података о примени композитних НАР/PEI скафолда у регенерацији коштаног ткива.

# II

## ЦИЉЕВИ

# ИСТРАЖИВАЊА

## 2 ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Основни циљ истраживања је испитивање утицаја новосинтетисаних скафолда хидроксиапатит полиетилен имина (НАР/РЕИ) и хидроксиапатит поли (лактид-ко-гликолида) (НАР/PLGA) на коштану регенерацију у *in vivo* условима, као и поређење добијених параметара са параметрима коштане регенерације након примене Bio-Oss препарата, најчешће примењиваног ксенографта за коштану регенерацију.

На основу тога, постављени су следећи циљеви:

1. Утврдити утицај скафолда хидроксиапатит поли (лактид-ко-гликолида) (НАР/PLGA) на коштану регенерацију у *in vivo* условима на дефекту критичне величине мандибуле свиња.
2. Утврдити утицај скафолда хидроксиапатит полиетилен имина (НАР/РЕИ) на коштану регенерацију у *in vivo* условима на дефекту критичне величине мандибуле свиња.
3. Упоредити ефекте коштане регенерације резултате биокompatитних скафолда (хидроксиапатит полиетилен имина (НАР/РЕИ) и хидроксиапатит поли лактид-ко-гликолида) (НАР/PLGA) са резултатима најчешће примењиваног (BioOss-a) ксенографта.
4. Испитати системску токсичност скафолда хидроксиапатит полиетилен имина (НАР/РЕИ) и хидроксиапатит поли (лактид-ко-гликолида) (НАР/PLGA).

# III

# МАТЕРИЈАЛ И

# МЕТОДЕ

### 3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

У студији је испитиван ефекат новосинтетисаних скафолда: хидроксиапатит - полиетиленимина (НАР/РЕИ) и хидроксиапатит поли (лактид-ко-гликолида) (НАР/PLGA) на коштану регенерацију *in vivo* на *critical-size* дефекту мандибуле свиње у поређењу са конвенционално примењиваним ксенографтом Bio-Oss Geistlich, као контролном групом.

#### 3.1 Синтеза скафолда

Синтеза НАР/РЕИ и НАР/PLGA скафолда обављена је у Институту за нуклеарна истраживања у Винчи према претходно утврђеним поступцима.<sup>8,32,38</sup> Укратко, поступак се састоји из три фазе:

1. синтеза праха хидроксиапатита (НАР)
2. добијање гранула НАР
3. депозиција танког филма поли (лактид-ко-гликолида) (PLGA) или полиетиленимина (РЕИ) на површину гранула.

##### 3.1.1 Синтеза праха НАР

Прах НАР се синтетише хидротермалним поступком из приближно стехиометријске смеше  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  и  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Процедура припреме раствора за хидротермални третман састоји се у додатку раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ( $c=0,05 \text{ mol/dm}^3$ ) у водену дисперзију  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ( $c=0,06 \text{ mol/dm}^3$ ), уз интензивно мешање, чија је рН вредност тако припремљене смеше подешена на 7,4 додатком 0,1М НСI или  $(\text{NH}_4)\text{OH}$ .

У ову смешу се додаје површински активна супстанца у облику праха, која има улогу да раздваја апатитне честице, а делује и као диспергујући агенс. Затим се овај

раствор хидротермално третира под следећим условима: на температури од 120-150°C, притиску 3-15 бара, у трајању од 2-8 h. После хидротермалног третмана, преципитат се одваја и суши на температури од 80°C током 48 h. Прах је након тога механохемијски обрађен и хомогенизован. Потом се мешавина 5g хидротермално синтетизованог НА и 1,5g поли(етилен винилацетат)/поли(етилен винил версатат) (PEVA/PEVV) процесуира у аутоклаву на 120 °C током 2h.

### **3.1.2 Синтеза гранула НАР**

За добијање гранула НАР, од праха НАР прави се водена суспензија са оптимално подешеном вискозношћу. Као матрица за набацивање суспензије користи се одговарајућа полимерна пена са адекватном расподелом величине пора. Након умакања пене у суспензију, суспензија се механички набаца на полимерну матрицу.

Након тога, добијени полупроизвод се суши и потом загрева у пећи до температуре од 350°C, да се омогући потпуно сагоревање органских компоненти, а потом се синтерира на 800°C, да би се добио компакт задовољавајућих механичких особина. Тако добијени порозни компакт НАР је дезинтегрисан у грануле одговарајуће величине (300  $\mu\text{m}$  – 1 mm).

### **3.1.3 Депозиција танког филма PLGA или PEI на површину гранула НАР**

У циљу депоновања танког филма PLGA или PEI на површину гранула НАР, PLGA коцкице (Durect Corporation, 50:50,  $M = 45000-70000$ ) се растварају у хлороформу а PEI коцкице (Sigma-Aldrich, USA) у етанолу, и затим се један, односно други раствор прелива преко гранула. Након сушења, добијају се грануле превучене танким филмом PLGA односно PEI.



### 3.2 *In vivo* експеримент на животињама

У овом *in vivo* истраживању коришћен је модел коштаног дефекта критичне величине, у којем се артефицијално прави дефект у кости, који не може примарно да зарасте. Као експерименталне животиње коришћене су свиње, а дефекти су прављени на мандибулама. За експериментални модел коришћене су мандибуле свиња због њихове анатомске и физиолошке блискости људском организму, због чега се овај модел све чешће користи у истраживањима у оралној и максилофацијалној хирургији.<sup>70-72</sup> Показано је да коштаног ткиво свиња има сличну ламеларну структуру, ниво ремоделације и ниво коштане регенерације у поређењу са истим параметрима код људи.<sup>70-72</sup>

Експерименталне животиње коришћене у студији након добијања одобрења Етичког комитета Медицинског факултета Универзитета у Приштини са седиштем у Косовској Митровици (број 09-3176), су домаће свиње (*Sus scrofa domestica*) старе 3 месеца (тежине 20-25 kg). Истраживање је спроведено према ISO 10993-2 стандардима за етичко поступање према експерименталним животињама. У студију је укључено 15 домаћих свиња, 10 мужјака и 5 женки. Само клинички здраве животиње су укључене у студију. Здравље животиња је праћено свакодневно за време трајања студије. Животиње су чуване у одговарајућим просторима, под истим условима, уз слободан прилаз храни током трајања испитивања.

#### 3.2.1 Хируршка процедура

Хируршке интервенције извођене су у лабораторији Пољопривредне школе из Приштине са седиштем у Лешку. После интрамускуларне премедијације ксилазином (2% Xylazine, 5 mg/kg, Ср Pharma, Bergdorf, Germany), све хируршке интервенције извођене су

у општој анестезији са кетамин-хидрохлоридом (Ketamine 500 mg/ mL, 35 mg/kg, Laboratorio Sanderson SA, Santiago, Chile) и ацепромазином (Acepromazine 50 mL, 0.75 mg/kg body weight, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., St. Joseph, MO 64506, USA). Након увођења животиња у општу анестезију, место интервенције инфилтровано је локалним анестетиком (по 2 ml артикаин хидрохлорида 4% + 1:200000 епинефрина). Обострано у пределу вестибулума доње вилице радила се инцизија од региона очњака до ретромоларне регије. Потом се врши одизање мукопериосталног режња и идентификовање коштаног ткива доње вилице које се депериостира до базе доње вилице. Водећи рачуна о положају зуба доње вилице, начине се дефекти у кости величине 1,0 cm x 1,0 cm x 0,6 cm у пределу премолара, молара и угла мандибуле обострано помоћу трепан борера (AC Dental Implant System, трепан борер 6 mm, укупне дужине 32 mm, радна дужина 15,8 mm, унутрашњи дијаметар 6 mm, спољашњи дијаметар 6.95 mm, титанијумска легура) уз константну иригацију физиолошким раствором. Комуникација дефекта са усном дупљом, мандибуларним каналом и зубима се избегава у склопу интервенције. Потом се коштани дефект испуни једним од коштаних супституената који се одабира методом случајности. Метода случајности је извршена компјутерски уз помоћ убачене листе. Укупно је овом методом направљено 90 дефеката на 15 мандибула те су формиране три групе:

- I. Дефекти испуњени BioOss графтом - 30
- II. Дефекти испуњени HAР/PLGA скафолдом - 30
- III. Дефекти испуњени HAР/PEI скафолдом - 30

Ране су ушиване ресорптивним концем дебљине 3,0 (3-0 SofsilK TM, Synture R, England). Све интервенције на животињама изводио је исти истраживач. Постоперативно

животиње су примале антибиотску терапију (Клиндамицин 4 g im. + Бензопеницилин 4 ml im). Животиње су чуване у оптималним условима на фарми и храњене специјално сувом храном и водом *ad libitum*.

После 4 месеца животиње су жртвоване на хуман начин интравенском ињекцијом пентобарбитала (Pentobarbital sodium salt 100 mg/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) у комбинацији са премедикацијом и анестезијом. Потом су мандибуле извађене и исечене на једнаке половине.



Фигура 3.1. Преоперативно апликовање локалног анестетика



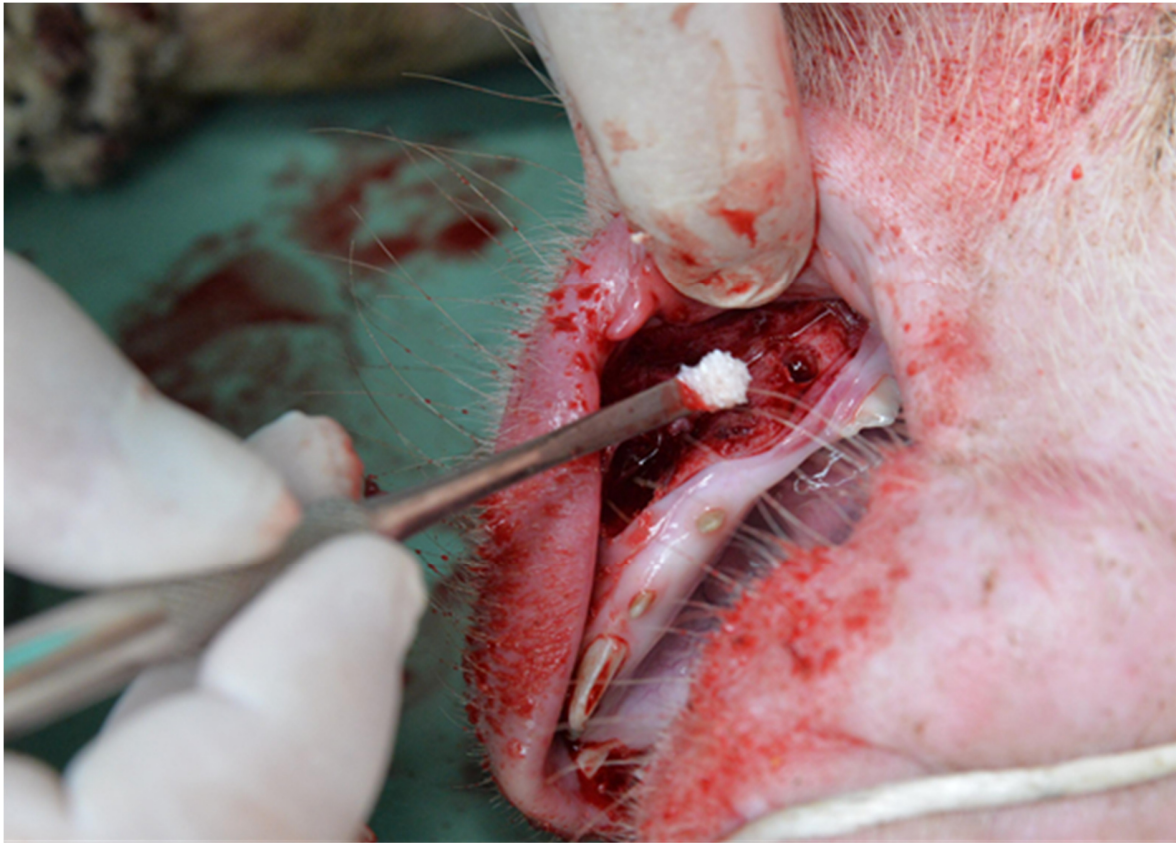
Фигура 3.2. Одизање мукопериосталног режња



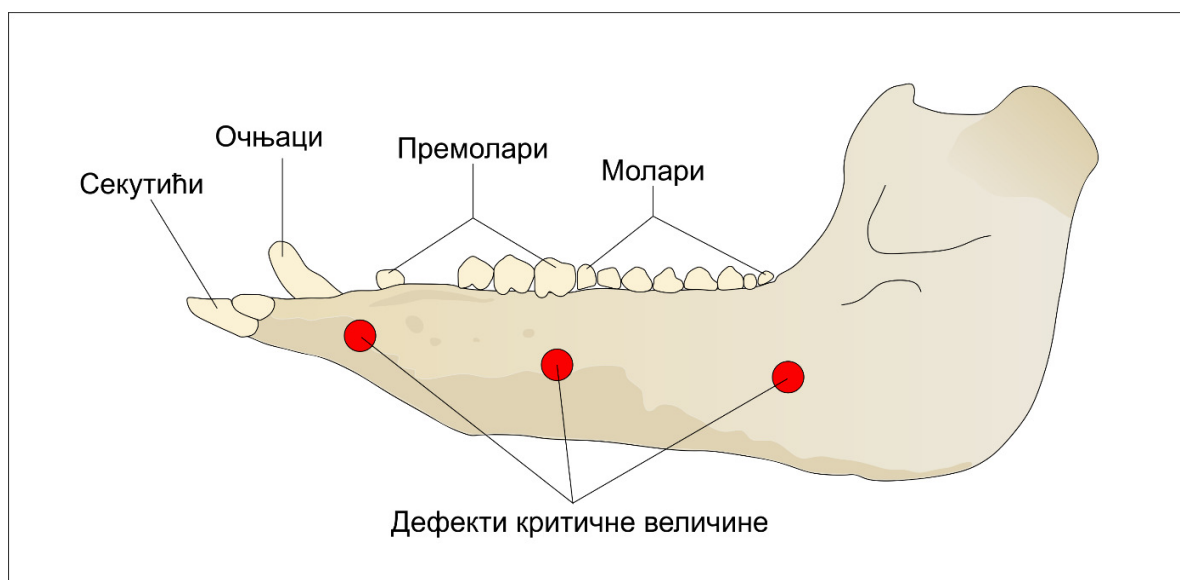
Фигура 3.3. Формирање дефеката



Фигура 3.4. Дефект критичне величине у мандибули



Фигура 3.5. Апликовање скафолда

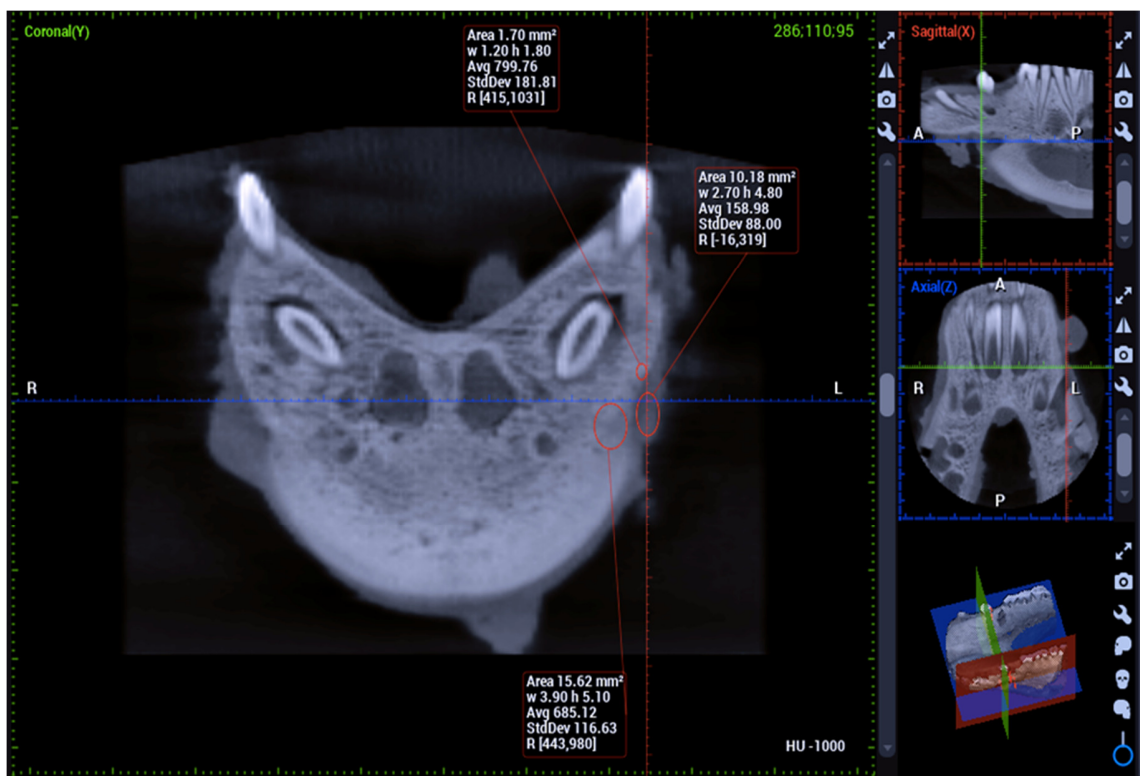


Фигура 3.6. Локализација дефеката критичне величине

### 3.3 Мерење густине кости у дефекту помоћу компјутеризоване томографије конусног зрака (СВСТ)

Коштани дефекти су анализирани помоћи СВСТ апарата (Planmеса Romexis 5.3.4.39, Finland). Пре мерења на мандибулама су обележавана места мерења како би се иста регија обрађивала и радиолошки и хистолошки. Добијена мерења су анализирана помоћу одговарајућег софтвера (Planmеса Romexis Software, Planmеса Romexis 5.3.4.39, Finland). Као региони од интереса означени су: коштани дефект, кост непосредно уз дефект и нормална кост око дефекта. Сви резултати представљени су у *Hounsfield* јединицама (HU).

Густина кости анализирана је применом СВСТ у регијама од интереса: у пределу дефекта, у непосредној близини дефекта и нормалне околне кости (Фигура 3.7).



Фигура 3.7. Регије од интереса за мерење густине кости применом СВСТ технологије

### 3.4 Хистолошка и хистоморфометријска анализа

За хистопатолошку анализу су коришћени формалином фиксирани и парафином укалупљени (енгл. Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded, FFPE) исечци ткива мандибуле. Од парафинских калупа направљени су пресеци дебљине 5-7  $\mu\text{m}$  који су бојени различитим хистохемијским и имунохистохемијским техникама. Архитектура ткива и укупан број ћелија испитивани су на препаратима бојеним хематоксилин еозин техником. За одређивање депозиције колагена у ткиву кости коришћене су две селективне хистохемијске технике: *Sirius red* бојење и трихромно бојење по *Masson*-у. Анализа коштаног ткива и активност остеобласта анализирани су *Toluidin blue* техником, док је степен депоновања калцијума у ткиву процењен коришћењем *Alizarin red* хистохемијске технике на недекалцификованим узорцима ткива.

#### 3.4.1 Припрема ткива за патохистолошку анализу

Репрезентативни узорци коштаног ткива мандибуле, који су макроскопски одговарали дефектима пуне дебљине и критичне величине, након изолације и обраде су фиксирани у 10% формалину 24 сата. Након фиксације, узорци су декалцификовани у 10% раствору мравље киселине.

Раствор је мењан једном у 3 дана, а рН и температура су бележени свакодневно. Степен декалцификације је одређен мануелно, сондирањем узорака и коришћењем контролних узорака мандибуле. Након потпуне декалцификације, узорци ткива су испирани дестилованом водом током 30 минута, након чега су узорци подвргнути аутоматској обради ткива. Након потпуне декалцификације, узорци су дехидрирани у алкохолу и укалупљени у парафинске калупе. Из парафинских калупа сечени су серијски ткивни пресеци стандардне дебљине 5-7  $\mu\text{m}$ .



### 3.4.2 Бојење хематоксилином и еозином

Парафински исечци који су претходно загрејани у термостату на +56°C у трајању од 45 минута су потољени у ксилолу са циљем да се uklони парафин. Затим је урађен поступак рехидратације ткива испирањем у опадајућим концентрацијама етил алкохола: 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу, потом 5 минута у 96% алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 70% алкохолу и на крају 5 минута у дестилованој води. Након серије испирања препарати су бојени *Mayer*-овим хематоксилином (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 10 минута а затим су испрани дестилованом, а потом и текућом водом 5 минута. Затим су препарати бојени алкохолним еозином (Sigma Aldrich) 2 минута. Након истека времена урађен је поступак дехидратације и просветљивања препарата. За процес дехидратације сада су коришћене растуће концентрације алкохола и то: 5 минута у 70% алкохолу, затим 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу и на крају 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу. Након бојења и поступка дехидратације, добијени препарати су просветљени потапањем 1 минут у мешавини ксилола и апсолутног алкохола у односу 1:1, а потом 2 пута по 1 минут само у ксилолу. На крају је на ткивне исечке нанет канада балзам (Canada balsam, Centrohem, Србија) и прекривени су покровним стаклима. Након 24-часовног сушења препарати су анализирани и израђене су фотомикрографије на светлосном микроскопу (BX51, Olympus, Japan).

### 3.4.3 Бојење колагена *Sirius red* методом

Парафински исечци коштаног ткива на којима је урађен поступак депарафинизације и рехидратације, као што је претходно описано, коришћени су за бојење и квантификацију колагених влакана. Након рехидратације, препарати су бојени *Picro-Sirius red* раствором у трајању од 1 сата. Радни раствор *Picro-Sirius red* за бојење добијен је мешањем 0,5 g *Sirius*

*red* боје (енгл. Direct Red 80, Sigma Aldrich) и 500 ml zasiћеног раствора пикринске киселине (енгл. Picric acid Solution, Sigma Aldrich).

Након бојења препарати су два пута по 5 минута опрани у 0,005% воденом раствору глацијалне сирћетне киселине. Након прања урађен је поступак дехидратације и просветљивања препарата, 5 минута у ксилолу. На крају је на ткивне исечке нанет канада балзам (Canada balsam, Centrohem, Србија) и прекривени су покровним стаклима. Након 24-часовног сушења препарати су анализирани и усликани на светлосном микроскопу (BX51, Olympus, Japan).

#### **3.4.4 Бојење колагена трихромном методом по Masson-у**

Препарати су најпре фиксирани 15 минута у претходно загрејаном на 56°C Буеновом раствору (енгл. Bouins solution, Sigma Aldrich). Након фиксације препарати су опрани у текућој води и бојени свеже припремљеним раствором *Weigert*-овог хематоксилина. Препарати су затим интензивно опрани најпре 10 минута у текућој, а потом и у дестилованој води. Препарати су затим бојени 10 минута киселим фуксином (енгл. Biebrich Scarlet Acid Fuchsin, Sigma Aldrich) и опрани у дестилованој води. Потом су препарати диферентовани у раствору који је добијен мешањем једнаких количина 5%-раствора фосфо-молибденске (енгл. Phosphomolybdic acid, Sigma Aldrich) и фосфо-тунгстичне киселине (енгл. Phosphotungstic acid, Sigma Aldrich) 5 до 10 минута. Затим се препарати, директно без претходног прања, боје 5 минута раствором плавог анилина (енгл. Aniline blue Solution, Sigma Aldrich). Након прања у дестилованој води препарати се диферентују у 1%-ом раствору сирћетне киселине од 2 до 5 минута. Након прања, урађен је поступак дехидратације, у две измене по 5 минута, прво 96% а затим и апсолутним алкохолом, након чега је уследило просветљивање препарата у ксилолу. На крају је на

ткивне исечке нанет канада балзам (Canada balsam, Centrohem, Србија) и прекривени су покровним стаклима.

Крајњи резултат бојења су плаво пребојена колагена влакна, црвено пребојена цитоплазма, док се једра боје црно. Након 24-часовног сушења препарати су анализирани и усликани на светлосном микроскопу (BX51, Olympus, Japan).

За семиквантитативну анализу депозита колагена, израђене су фотомикрографије на увећању  $\times 20$ , које су затим анализирани коришћењем софтвера *ImageJ* (National Institute of Health, Bethesda, MD). Бодовање и хистолошка анализа су обављени двоструко слепом методом од стране два независна посматрача. Резултати су представљени као средњи број ћелија по површини коштаног ткива и као проценат коштаног ткива.

### **3.4.5 Имунохистохемија**

За имунохистохемијску анализу, резони дебљине 5  $\mu\text{m}$  су узети из средине сваког пресека узорка кости. Резони су депарафинизовани, рехидрирани, а након завршеног поступка депарафинизације ткивни исечци су најпре кувани 21 минут у 10mM Na-цитрату, а након хлађења интензивно испрани три пута у PBS-у. За блокирање активности ендogene пероксидазе коришћен је водоник пероксид (3%). Имунохистохемијско бојење је обављено инкубацијом препарата коштаног ткива са примарним мишићим анти-Остеокалцин антителом (5 mg/ml, NBP2-89037, Novus Biologicals, CO, SAD) преко ноћи на собној температури. Имунореактивност је испитана коришћењем ИHC комплекта (ab80436, Abcam, Cambridge, UK). Ткивни исечци су бојени хематоксилином по *Mayer*-у 2 минута, а затим интензивно опрани текућом водом. Обојени исечци су покривени DPX медијумом за покривање и покровном љуспицом. Након сушења у трајању од 48h, интензитет и дистрибуција бојења су анализирани и израђене су фотомикрографије помоћу светлосног

микроскопа (BX51, Olympus, Japan). Резултати су представљени као средња вредност скорa имунореактивности. Интензитет бојења је анализиран и процењен коришћењем скор система: 0 = негативан; 1 = слаб; 2 = умерен; 3 = јак; 4 = веома јак.

#### **3.4.6 Alizarin red хистохемијска техника**

Радни раствор Alizarin red је направљен растварањем 2g Alizarin red (Sigma Aldrich) у 100 ml дестиловане воде. Након депарафинизације и рехидратације ткива, узорци су обојени Alizarin red радним раствором у трајању од 3 минута. Вишак боје је одливен, а узорци су затим дехидрирани ацетоном и ацетоном и ксилолом (однос 1:1) у трајању од 2 минута. Након просветљавања ткива у ксилолу, она су прекривена DPX синтетичким медијумом и покривена покровним стаклом.

#### **3.4.7 Toluidin blue хистохемијска техника**

Шток раствор Toluidin blue је добијен растварањем 1g Toluidin blue (Sigma Aldrich) у 100 ml 70% етанола. Раствор 1% NaCl је добијен растварањем 0,5g NaCl у 50ml дестиловане воде, након чега је рН вредност коригована до 2 коришћењем глацијалне сирћетне киселине. Радни раствор Toluidin blue је добијен мешањем 5 ml штока и 45 ml 1% раствора NaCl. Након депарафинизације и рехидратације, ткива су потопљена у радни раствор у трајању од 3 минута, а затим три пута опрана у дестилованој води у трајању од по 5 минута. Након брзе дехидратације у две измене 95% етанола, ткива су просветљена у две измене ксилола и прекривена DPX медијумом и покровним стаклом.

### **3.5 RT-PCR анализа активности RANKL/OPG**

Узорци костију су изрезани и брзо замрзнути у течном азоту пре хомогенизације. Укупна РНК из узорака кости је екстрахована коришћењем TRIzol реагенса (Invitrogen,

Valtham, Massachusetts, MA, Finland) према упутствима произвођача. За реверзну транскрипцију коришћен је iScript Re-verse Transcription Mastermix (Bio-Rad, SAD). PCR у реалном времену је спроведен коришћењем SsoAdvanced Universal SIBR Green Supermix (Bio-Rad, SAD) и mRNA специфичних прајмера (Табела 3) за OPG, RANKL и  $\beta$ -актин као *housekeeping gene* (Invitrogen, Valtham, Massachusetts, MA, Finska). Квантитативне RT-PCR реакције су урађене у Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, SAD) и након анализе података израчуната је релативна експресија гена према *Livaku* и *Schmittgenu* (2008).

**Табела 3.** RT-PCR прајмери коришћени у студији

Назив		Секвенце (5' to 3')
$\beta$ -actin	F	TTGCTGACAGGATGCAGAAG
	R	GAGCCTCCAATCCAGACAGA
OPG	F	CCAAGGTATCGACCTCTGTGA
	R	GGGCAAGCTTTGCATTAAGA
RANKL	F	ACACGGATTTGCAAGACACA
	R	CTGCATTTTCCTTTTGCACAG
Osteocalcin	F	GAAGAGACTCAGGCGCTACC
	R	GGGTTGAGCTCACACACCTC

### 3.6 Испитивање токсичности материјала

Након жртвовања животиња унутрашњи органи: мозак, срце, плућа, бубрези, слезина и јетра су извађени, макроскопски прегледани и подвргнути патохистолошкој анализи ради испитивања евентуалне системске токсичности испитиваних материјала. Узорци органа су фиксирани у 4% параформалдехиду у раствору на рН 7.4 током 24h. Након 24h узорци су дехидрирани повећавањем концентрација етанола и ксилола и постављени у парафин. Танки пресеци узорака (5  $\mu$ m) су сечени на микротому (Leica, Germany), постављени на стаклене плочице и бојени хематоксилин еозином по стандардној методи (Luna 1968). Сви препарати су прегледани од стране два искусна

патолога на светлосном микроскопу (Leica DM LS2 light microscope). Коначна интерпретација је добијена на основу два независна налаза сваког препарата. Оригиначне фотографије усликане су професионалним фотоапаратом (Canon PowerShot S70).

### **3.7 Статистичка обрада података**

Подаци ће бити анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 20 (IBM SPSS Statistics 20, Chicago, MA). Правилност и хомогеност расподеле добијених вредности испитивана је Лавиновим и Shapiro-Wilk тестом нормалности расподеле. One-way ANOVA и post hoc Bonferroni тестови су коришћени за статистичку анализу података. Резултати истраживања приказани су као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка. Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи  $p < 0,05$ .

# **IV**

# **РЕЗУЛТАТИ**

## 4 РЕЗУЛТАТИ

### 4.1 Евалуација густине кости применом СВСТ

Мерења мандибуле вршена применом СВСТ у регијама од интереса: у пределу дефекта, у непосредној близини дефекта и нормалне околне кости.

Добијени резултати показали су статистички значајно густина новоформираног ткива у формираном дефекту гледано у НУ јединицама у НАР/PLGA (241.56±57.45) и НАР/PEI (254.39±51) групама у поређењу са Bio-Oss групом (196.97±39.35) ( $p < 0.05$ , one way ANOVA, post hoc Tukey test). Није било статистички значајне разлике између група у погледу густине кости у непосредној близини дефекта и нормалне околне кости (Табела 4).

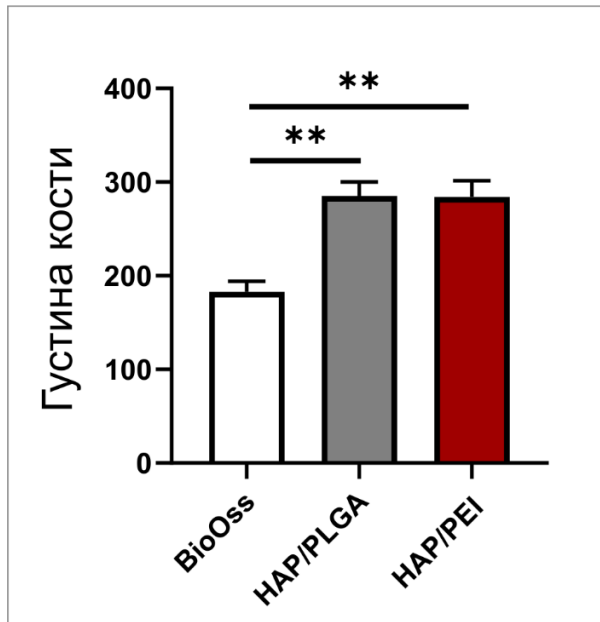
**Табела 4.** Резултати густине кости изражене у Хоунсфилдовим јединицама

Регија	НАР/PLGA	НАР/PEI	Bio-OSS
Дефект	241.56±57.45 <sup>a</sup>	254.39±51 <sup>a</sup>	196.97±39.35
Кост уз дефект	854.78±43.78	791.21±130.10	764.56±120.53
Околна кост	821.67±91.23	781.34±121.11	801.34±170.10

<sup>a</sup> $p < 0.05$  vs BioOSS (one way ANOVA, post hoc Tukey test)

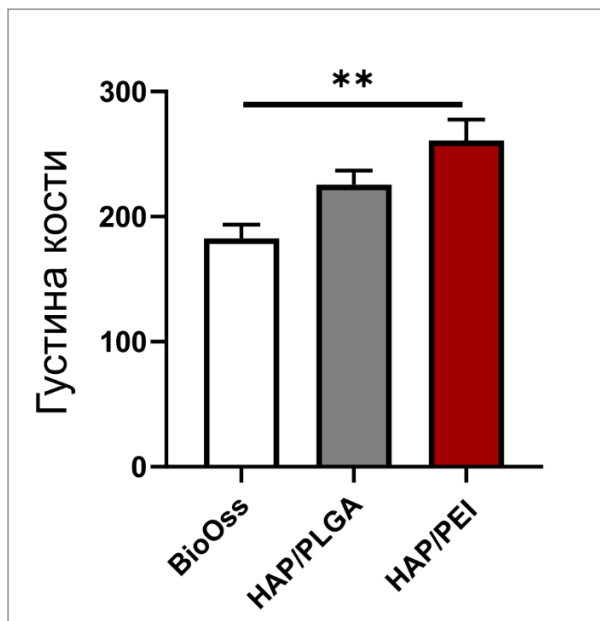
Радиолошка анализа густине костију анализирана на СВСТ-у, показала је да је у пределу очњака густина костију била значајно нижа у Bio-Oss групи у поређењу са НАР/PLGA и НАР/PEI групама (Фигура 4.1,  $F=15,557$ ).



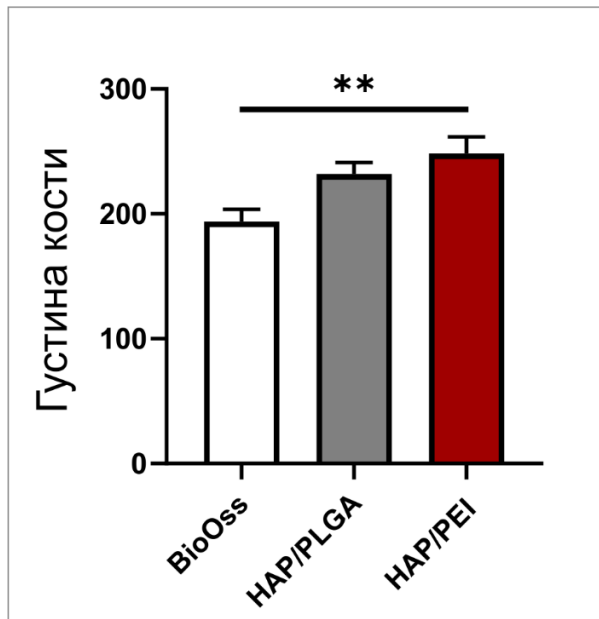


Фигура 4.1. Радиолошка процена густине кости на СВСТ-у регија очњака, Вредности су дате као средње вредности ± стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

У два друга истраживана региона, премоларном и моларном, густина костију је била значајно нижа код животиња третираних Bio-Oss у поређењу са HAP/PEI групом (Фигуре 4.2 и 4.3,  $F=8,726$ ,  $F=6,553$  респективно) док није било разлике у поређењу са HAP/PLGA групом.

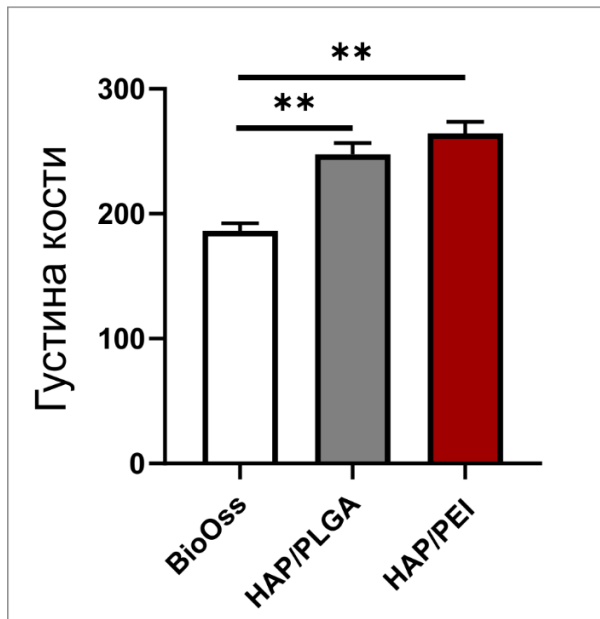


Фигура 4.2. Радиолошка процена густине кости на СВСТ-у регија премолара, Вредности су дате као средње вредности ± стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



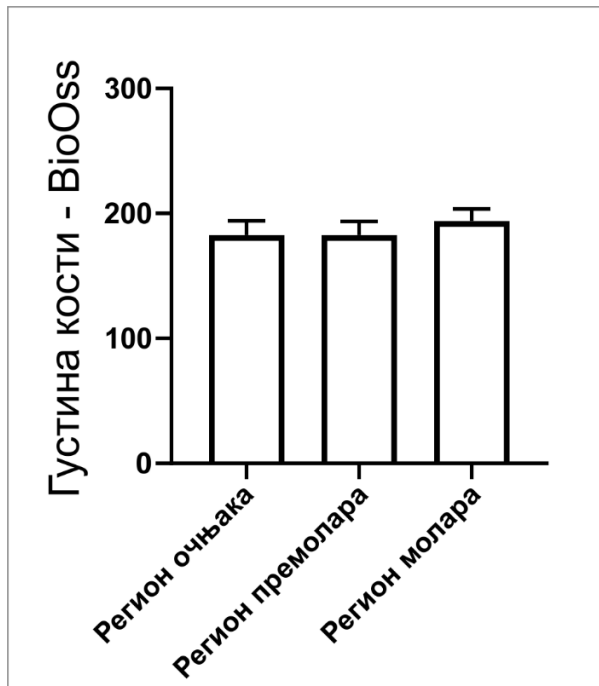
Фигура 4.3. Радиолошка процена густине кости на СВСТ-у регија молара, Вредности су дате као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

Без обзира на локализацију, добијени резултати су показали да је густина костију била значајно нижа у групи Bio-Oss у поређењу са HAP/PLGA и HAP/PEI групама (Фигура 4.4.,  $F=15,545$ ).

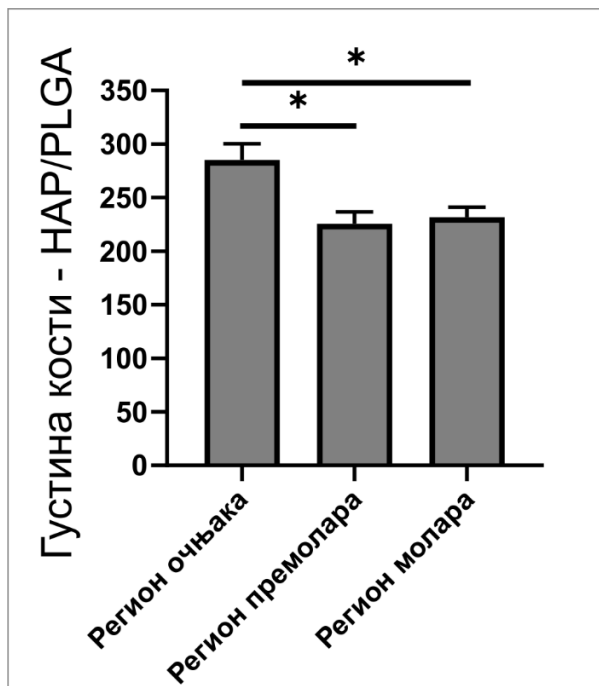


Фигура 4.4. Радиолошка процена густине кости на CBCT-у свим регијама мандибуле од интереса, Вредности су дате као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

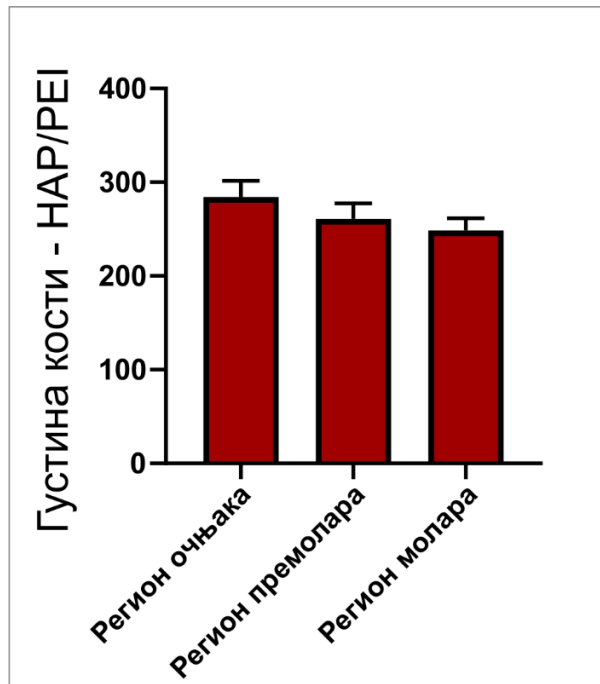
Индивидуална анализа сваког материјала графта показала је да нема разлика у густини костију у групи Bio-Oss између три доњовилична региона (Фигура 4.5,  $F=0,359$ ). Слични резултати забележени су и за HA/PEI групу (Фигура 4.6,  $F=1.294$ ), док је у HA/PLGA групи густина кости била значајно већа у очњачкој регији у поређењу са премоларном и моларном регијом (Фигура 4.7,  $F=7.185$ ).



Фигура 4.5. Радиолошка процена густине кости на СВСТ-у код испитиваног BioOss материјала, Вредности су дате као средње вредности ± стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



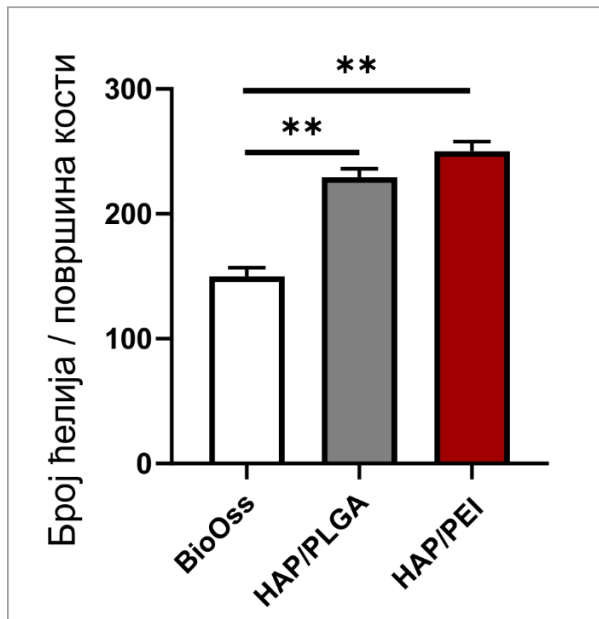
Фигура 4.6. Радиолошка процена густине кости на СВСТ-у код испитиваног HA/PLGA материјала, Вредности су дате као средње вредности ± стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



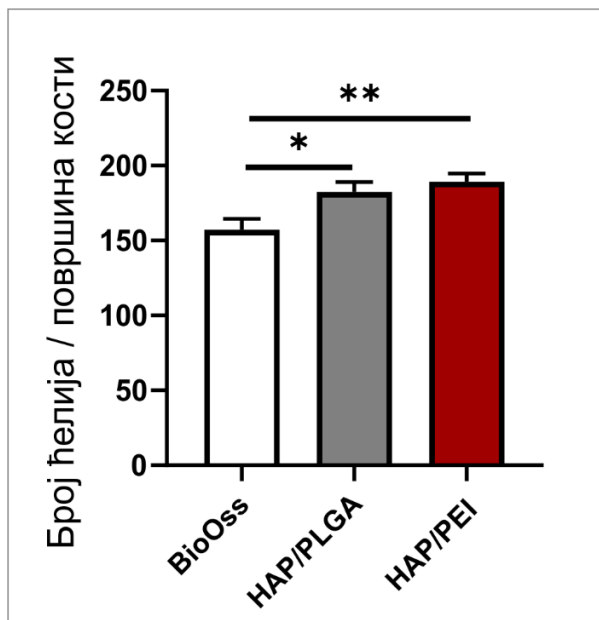
Фигура 4.7. Радиолошка процена густине кости на СВСТ-у код испитиваног HA/P/PEI материјала, Вредности су дате као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

## 4.2 Број ћелија у истраживаним регионима

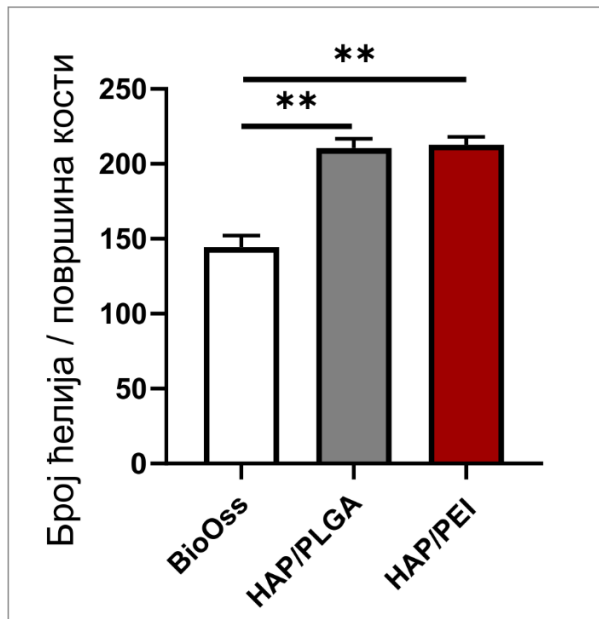
Патохистолошка анализа бојења хематоксилином и еозином коришћена је за идентификацију и процену целуларности испитиваних региона мандибуле. Добијени резултати су показали да је број укупних ћелија значајно мањи у Bio-Oss групи у поређењу са HA/PLGA и HA/PEI групама у све три регије (Слике 4.8.;  $F=56.150$ , 4.9;  $F=6.890$ , 4.10;  $F=35.835$  респективно).



Фигура 4.8. Укупан број ћелија-у регија очњака, Вредности су дате као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

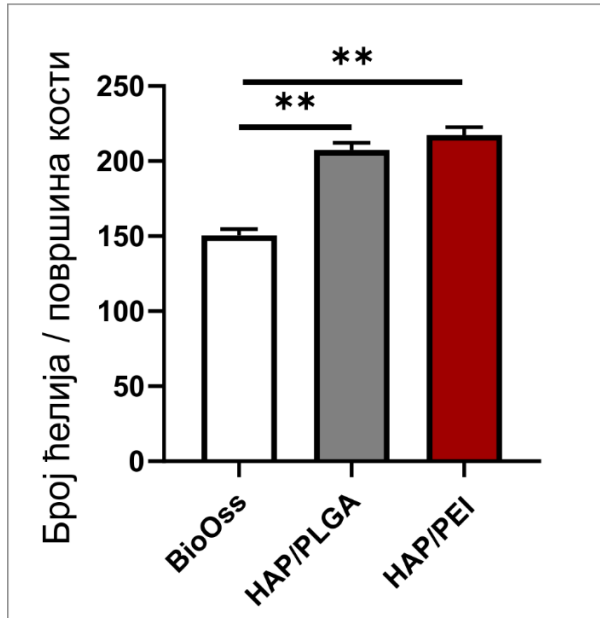


Фигура 4.9. Укупан број ћелија-у регија премолара, Вредности су дате као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



Фигура 4.10. Укупан број ћелија-у регија молара, Вредности су дате као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

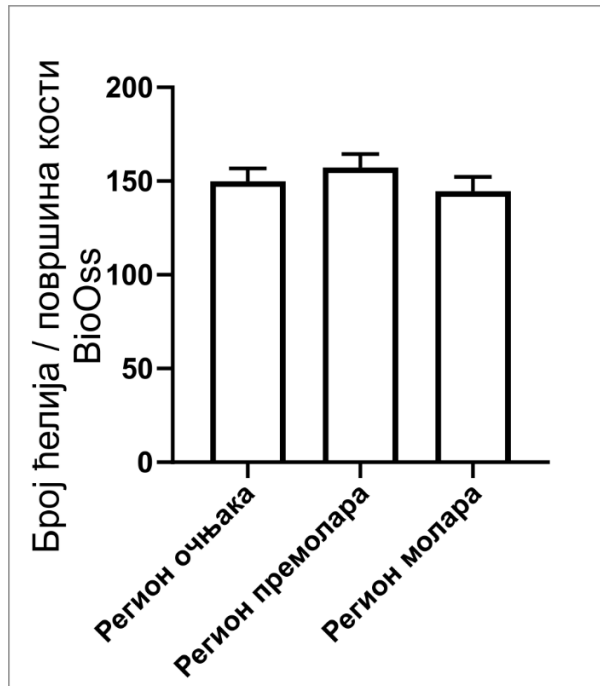
Такође, у целој мандибули, без обзира на регион, број остеобласта је био значајно мањи код животиња третираних Bio-Oss (Фигура 4.11,  $F=59,383$ ). Нису уочене разлике у броју ћелија између HA/PLGA и HA/PEI група.



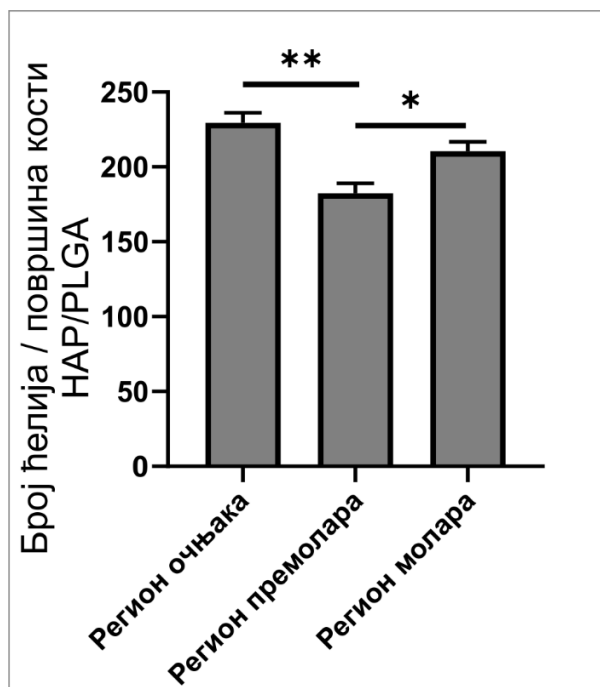
Фигура 4.11. Укупан број ћелија-у свим регијама мандибуле, Вредности су дате као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Анализа коштаног ткива доње вилице третираног Bio-Oss препаратом показала је да нема разлике у целуларности у односу на испитивани регион (Фигура 4.12. 3E,  $F=0,762$ ). С друге стране, у HAP/PLGA групи, број ћелија је био значајно мањи у премоларној области у односу на подручје очњака и молара (Слика Фигура 4,13,  $F=13,212$ ). Слично, у HAP/PEI групи, број остеобласта је био значајно мањи у премоларној области у поређењу са пределом очњака и молара, а такође, значајно већи у подручју очњака у поређењу са моларном регијом (Фигура 4.14,  $F=24,791$ ).

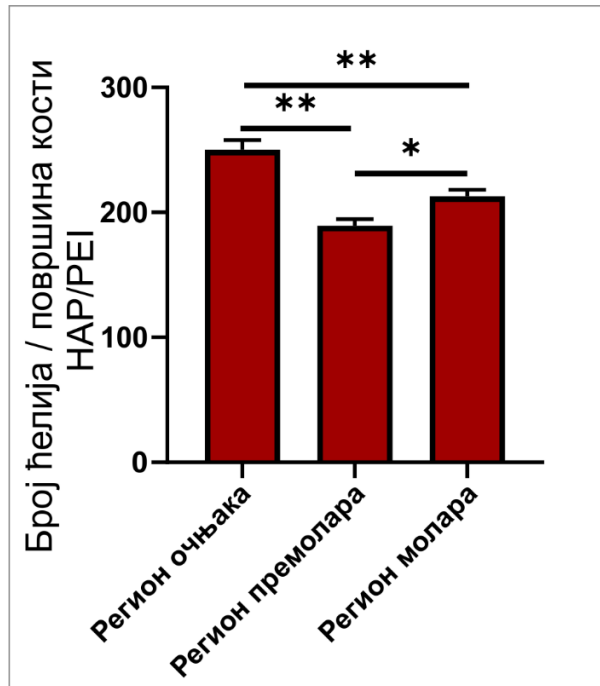




Фигура 4.12. Укупан број ћелија код испитиваног Bio-Oss материјала,, Вредности су дате као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

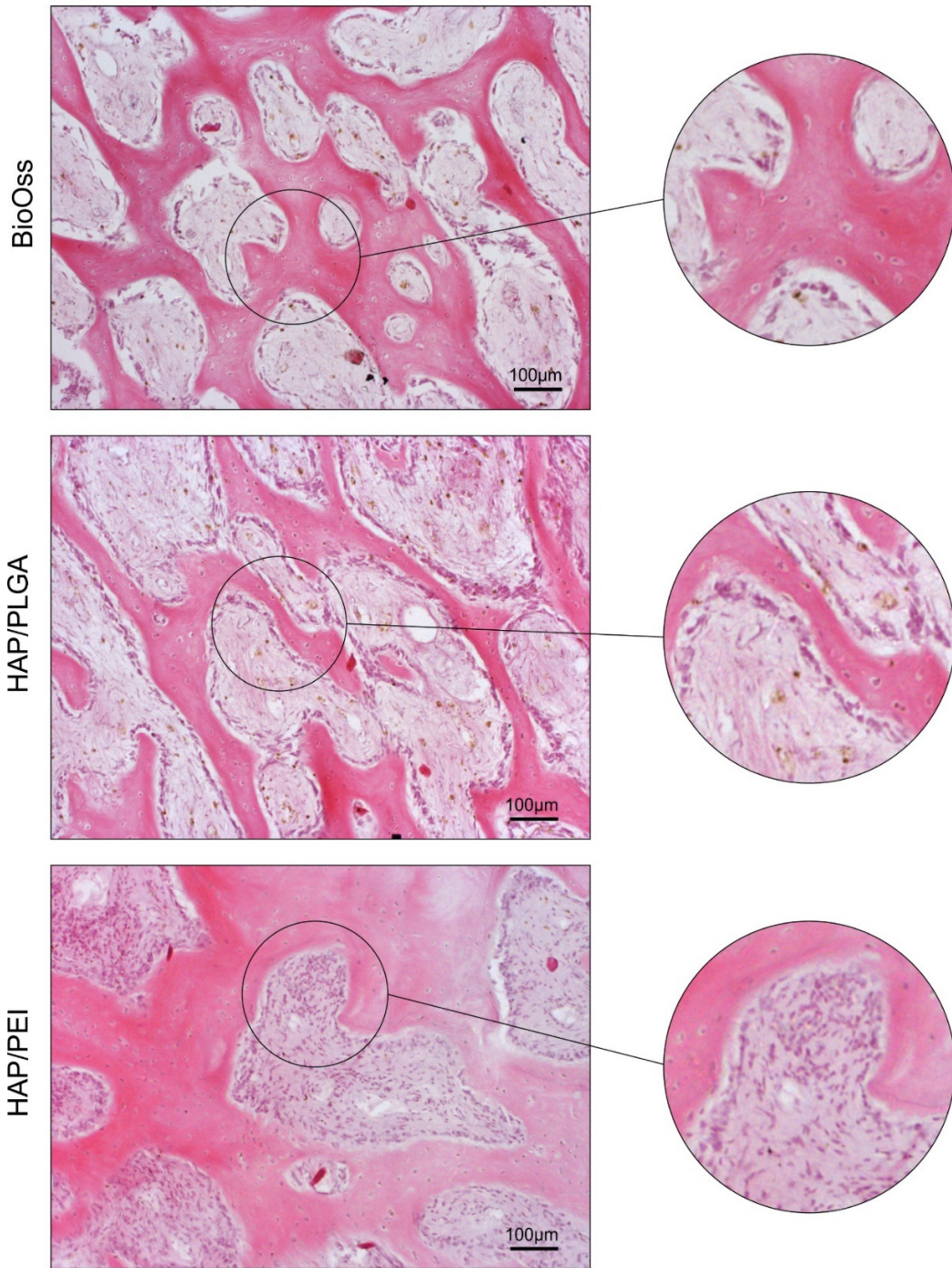


Фигура 4.13. Укупан број ћелија - код испитиваног HAP/PLGA материјала,, Вредности су дате као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

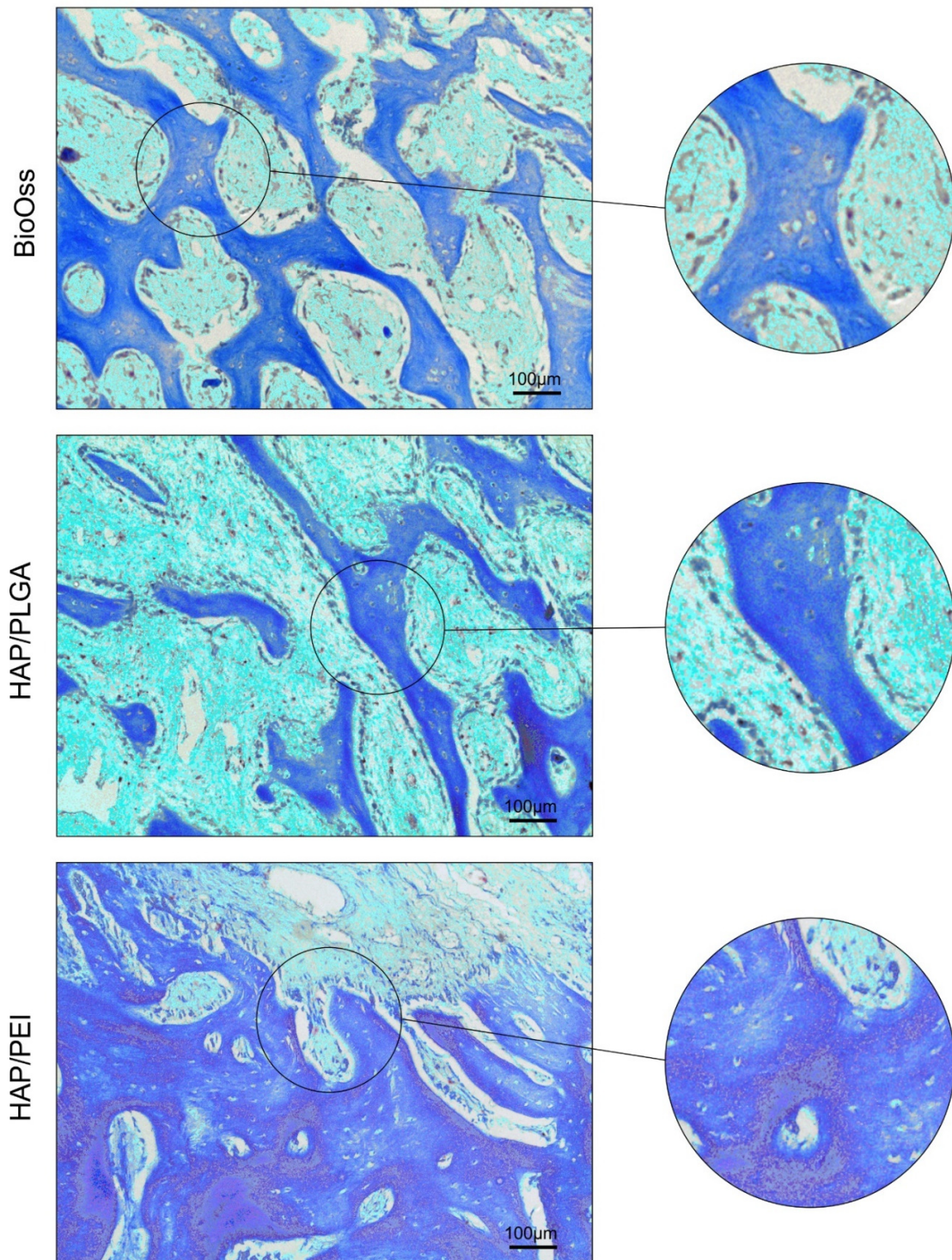


Фигура 4.14. Укупан број ћелија код испитиваног NAR/PEI материјала, Вредности су дате као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Архитектура коштаног ткива, као и присуство активних остеобласта, испитивани су осим стандардним Н&Е бојењем (Фигура 4.15) и коришћењем Toluidin blue хистохемијске технике. Значајно већи број активних остеобласта као и израженије присуство зрелог коштаног ткива показано је у NAR/PEI групи (Фигура 4.16)



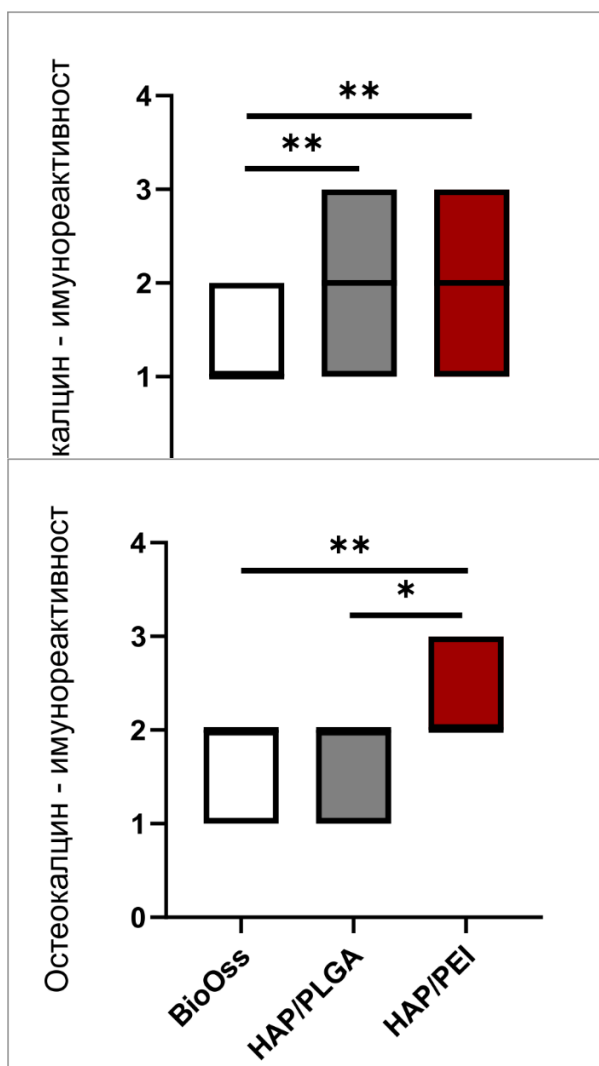
Фигура 4.15. Репрезентативне фотомикрографије хематоксилин еозин бојења са знатно израженијом целуларношћу у *HAP/PLAGA* и *HAP/PEI* групама у поређењу са *Bio-Oss* групом (увечање: панел лево  $\times 20$ , панел десно  $\times 40$ )



Фигура 4.16. Репрезентативне фотомикрографије Toluidin blue бојења код испитиваних материјала (увећање: панел лево x20, панел десно x40)

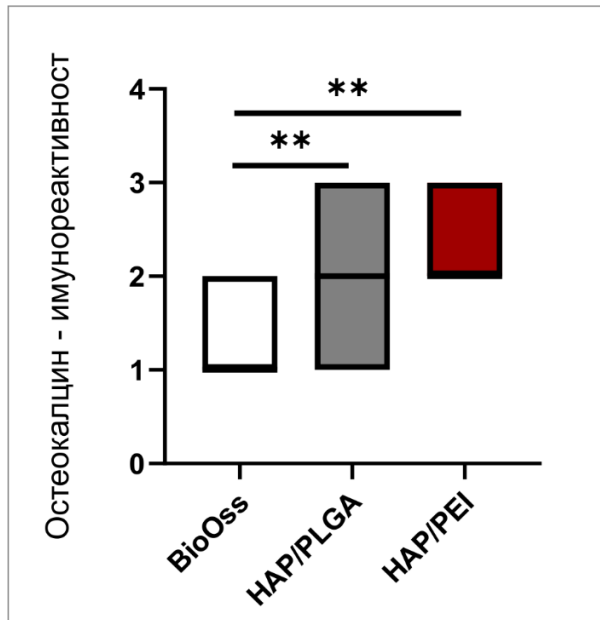
### 4.3 Имунореактивност на остеокалцин

Имунохистохемијска анализа коштаног ткива доње вилице показала је да је имунореактивност на остеокалцин значајно нижа у Bio-Oss групи у поређењу са HAP/PEI у пределу очњака, премолара и молара (Фигура 4.17, 4.18 и 4.19, ; F=11,410, F=13,22, F=21,081 респективно). У регијама очњака и молара, имунореактивност на остеокалцин је такође била значајно нижа у Bio-Oss у поређењу са HAP/PLGA групом (Фигура 4.17 и 4.19), док је у премоларној области, имунореактивност у HAP/PLGA била значајно нижа у поређењу са HAP/PEI групом (Фигура 4.18). Анализа целе мандибуле, без обзира на одређени регион, показала је да је имунореактивност била значајно нижа у Bio-Oss групи у поређењу са HAP/PLGA, као и HAP/PEI групама (Фигура 4.20, F=41,382).

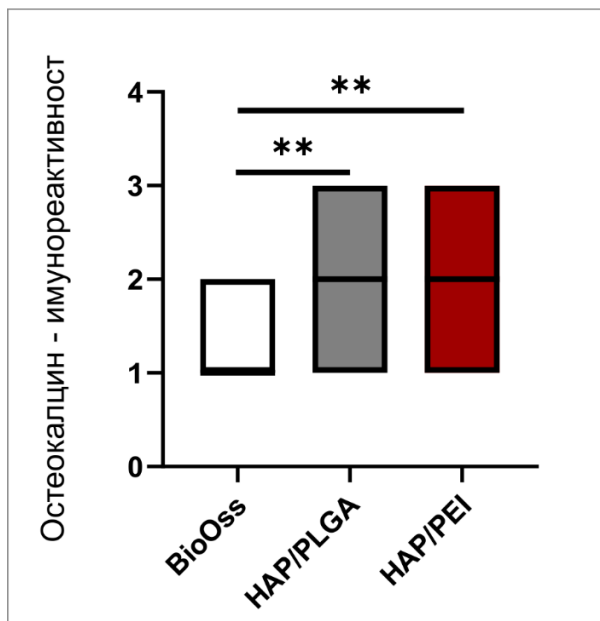


Фигура 4.17. Имунореактивност на остеокалцин у регији очњака, Графици приказују интерквартилни однос. Дебела хоризонтална линија унутар графика представља медијану \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Фигура 4.18. Имунореактивност на остеокалцин у регији премолара, Графици приказују интерквартилни однос. Дебела хоризонтална линија унутар графика представља медијану \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



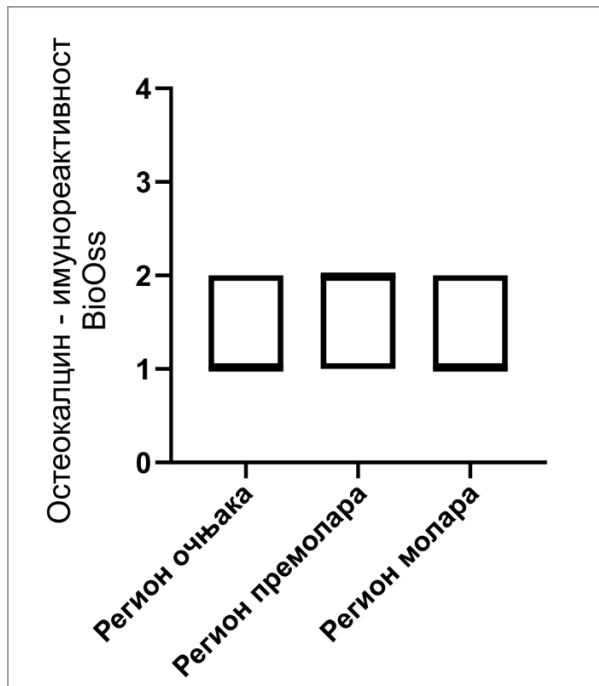
Фигура 4.19. Имунореактивност на остеокалцин у регији молара, Графици приказују интерквартилни однос. Дебела хоризонтална линија унутар графика представља медијану \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



Фигура 4.20. Имунореактивност на остеокалцин у свим испитиваним регијама,

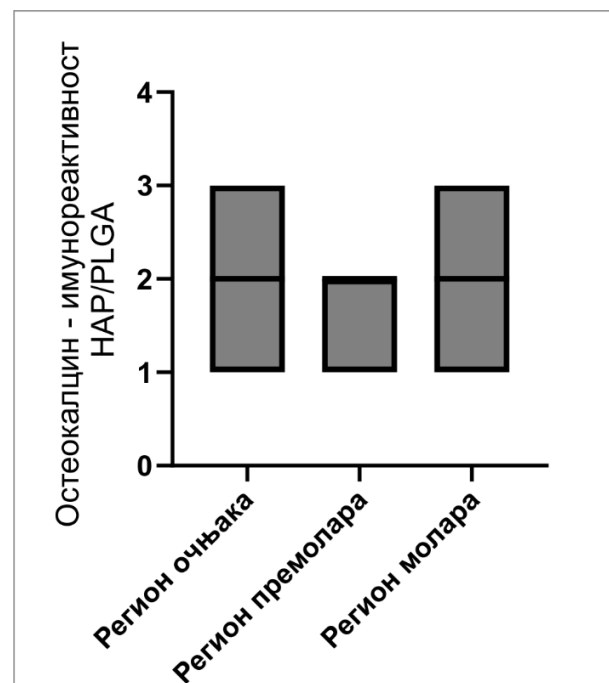
Графици приказују интерквартилни однос. Дебела хоризонтална линија унутар графика представља медијану \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Није било статистички значајних разлика у погледу експресије остеокалцина унутар испитиваних група без обзира на испитивани регион (Фигуре 4.21-4.23)



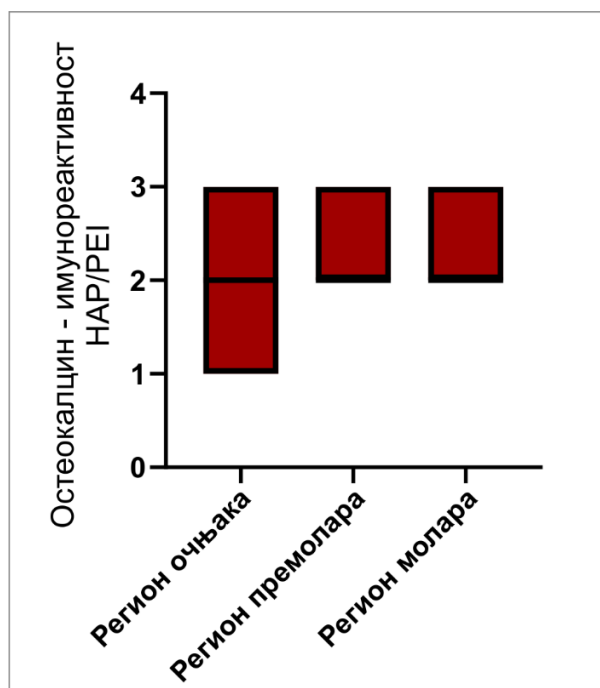
Фигура 4.21. Имунореактивност на остеокалцин код испитиваног BioOss материјала, Графици приказују интерквартилни однос. Дебела хоризонтална линија унутар графика представља медијану \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Фигура 4.22. Имунореактивност на остеокалцин код испитиваног HA/P/LGA материјала, Графици приказују



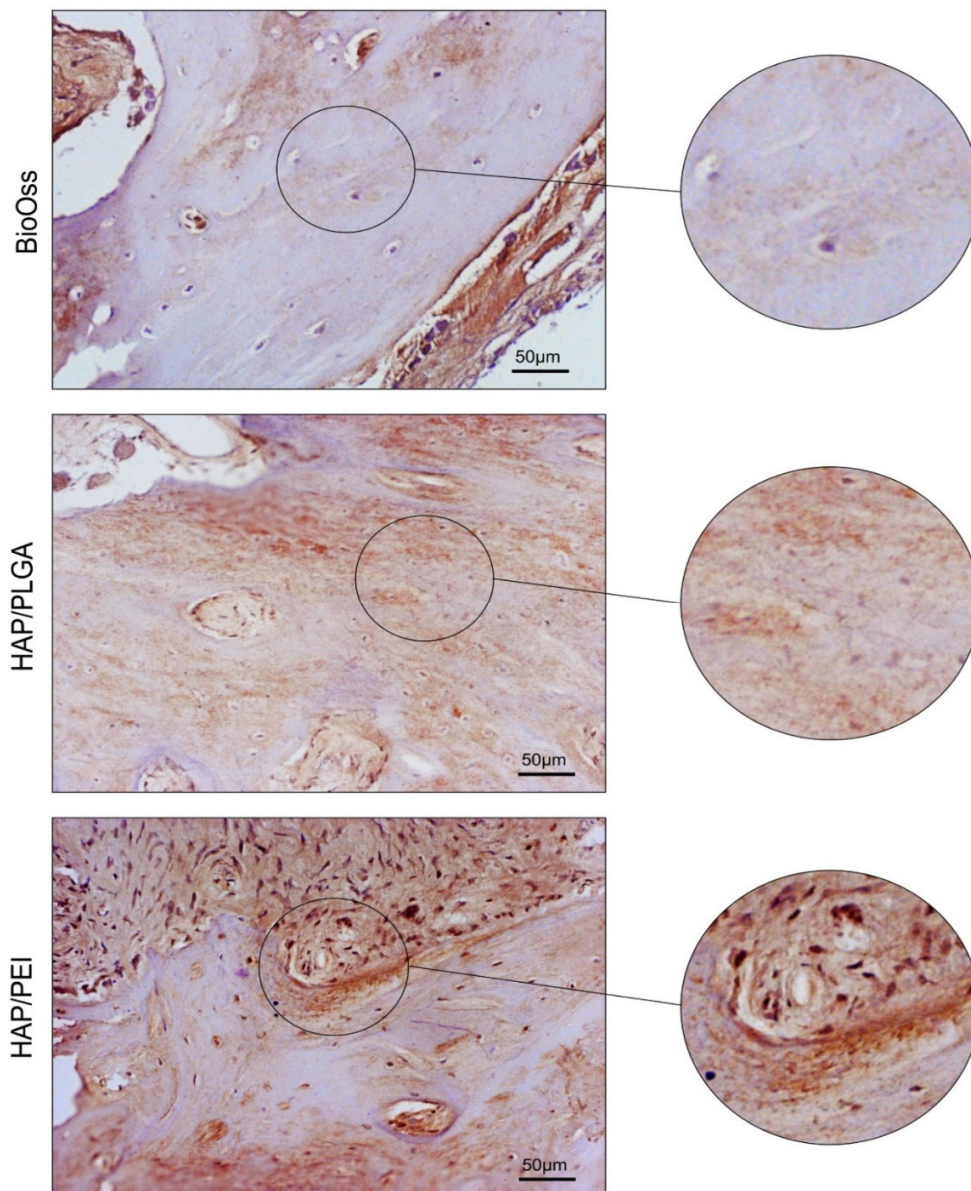


интерквartilни однос. Дебела хоризонтална линија унутар графика представља медијану \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



Фигура 4.23. Имунореактивност на остеокалцин код испитиваног HAP/PEI материјала, Графици приказују интерквartilни однос. Дебела хоризонтална линија унутар графика представља медијану \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

У фигури 4.24. приказане су репрезентативне фотомикрографије имунохистохемијског бојења на остеокалцин код испитиваних материјала на којима се уочава разлика у експресији остеокалцина између испитиваних група.

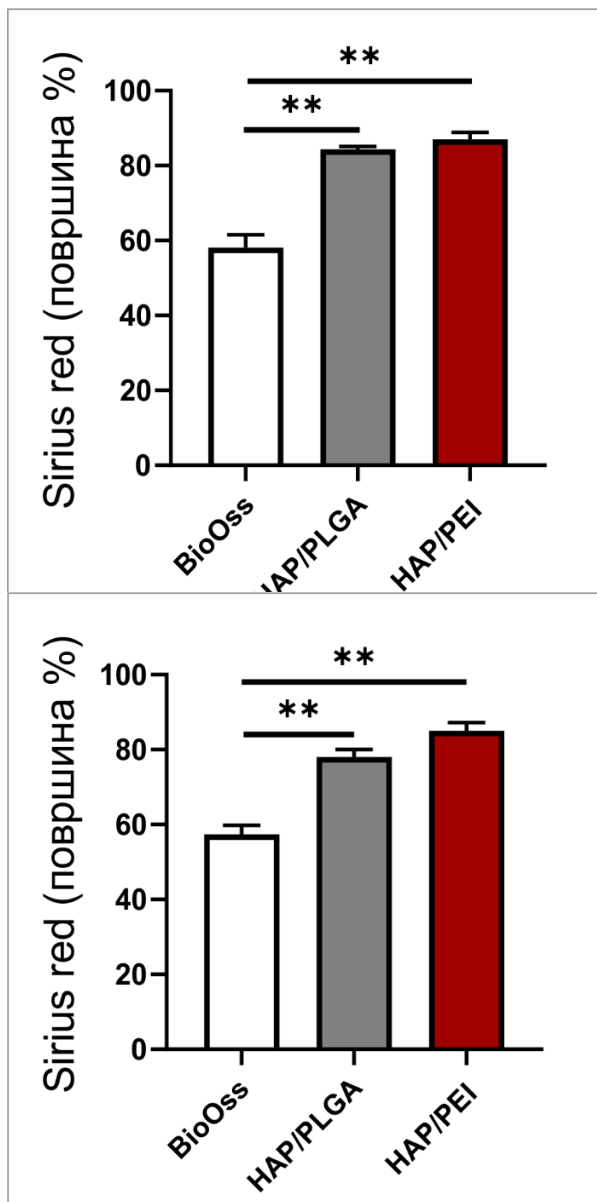


Фигура 4.24. Репрезентативне фотомикрографије имунохистохемијског бојења на остеокалцин код испитиваних материјала (увећање: панел лево  $\times 40$ , панел десно  $\times 60$ )

#### 4.4 Депозиција колагена

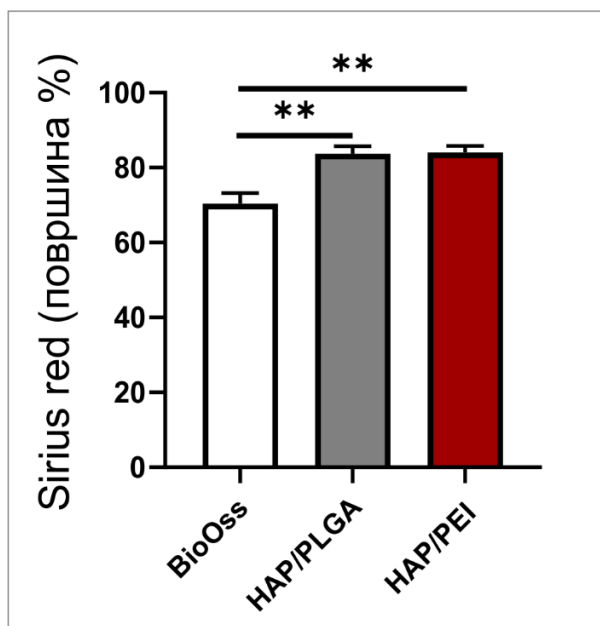
Да бисмо проценили параметре формирања нове кости, користили смо селективну хистохемијску технику *Picrosirius red*. Патохистолошка анализа је показала да је количина

колагена у новоствореној кости била значајно мања у Bio-Oss графту у поређењу са HA/PLGA и HA/PEI у очњацима, премоларним и моларним регионима (Фигура 4.25-4.27,  $F=47,642$ ,  $F=40,952$ ,  $F=11,757$  респективно). Исти тренд је такође примећен у целој мандибули, без обзира на позицију графта (Фигура 4.28,  $F=80,445$ ). Индивидуална анализа коришћених материјала за калемљење показала је да је у групи Bio-Oss депозиција колагена била значајно већа у моларној површини у поређењу са очњацима и премоларом (Фигура 4.29,  $F=6,082$ ). У HA/PLGA групи, количина колагена је била значајно већа када је трансплантат постављен у пределу очњака у поређењу са премоларном (Фигура 4.30,  $F=4,110$ ).

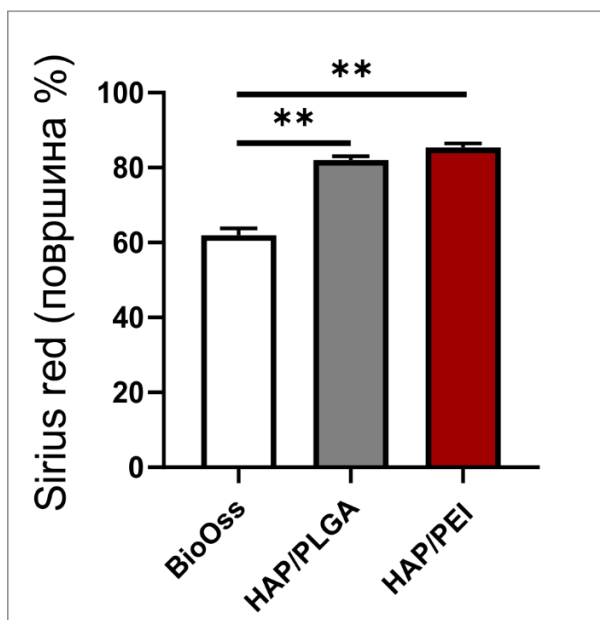


Фигура 4.25 Депозиција колагена у региону очњака. Вредности су изражене као средње вредности процента површине испитиваног региона од интереса  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Фигура 4.26 Депозиција колагена у региону премолара. Вредности су изражене као средње вредности процента површине испитиваног региона од интереса ± стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

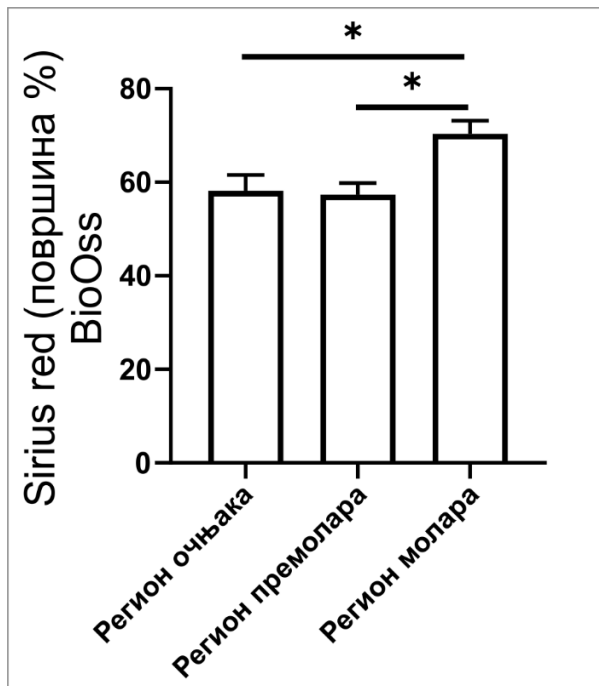


Фигура 4.27 Депозиција колагена у региону молара. Вредности су изражене као средње вредности процента површине испитиваног региона од интереса ± стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

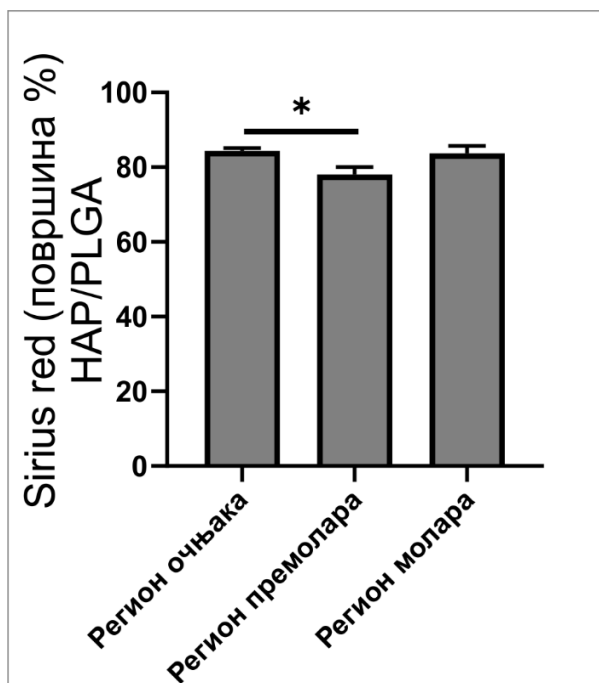


Фигура 4.28 Депозиција колагена у свим испитиваним регионима. Вредности су

изражене као средње вредности процента површине испитиваног региона од интереса  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

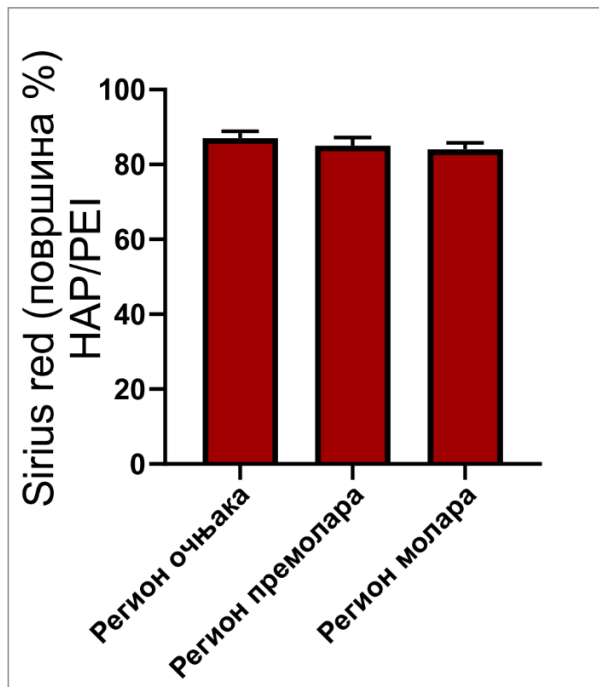


Фигура 4.29 Депозиција колагена у регионима код испитиваног Bio-Oss материјала. Вредности су изражене као средње вредности процента површине испитиваног региона од интереса  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



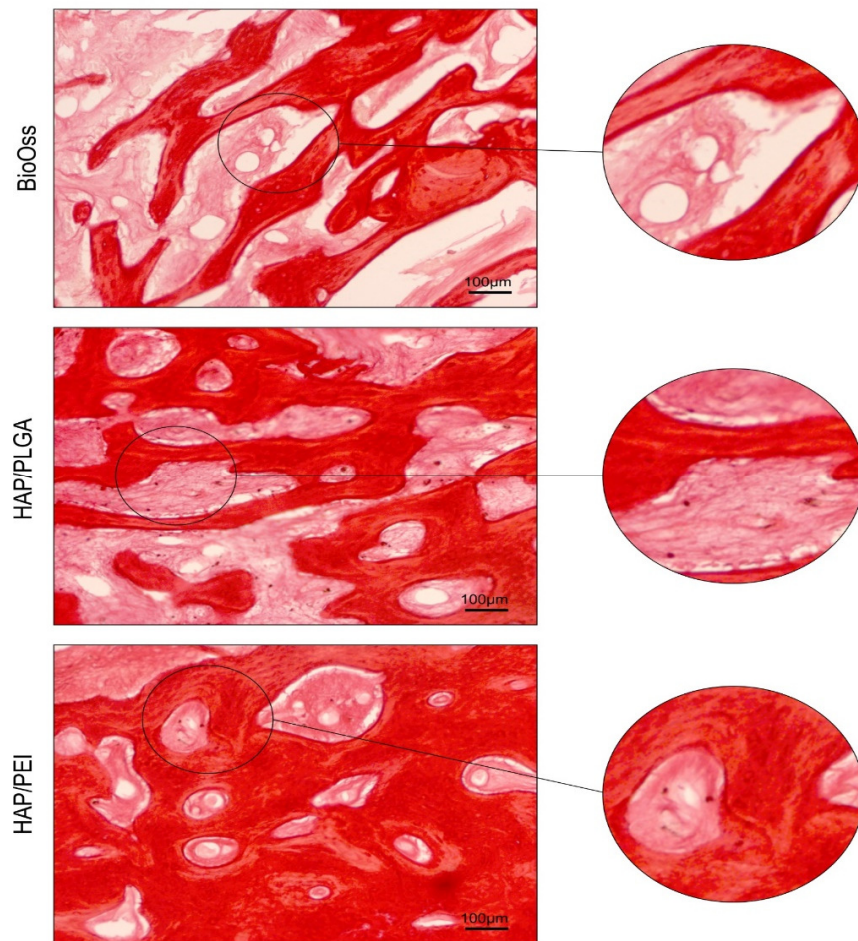
Фигура 4.30 Депозиција колагена у регионима код испитиваног HAP/PLGA материјала. Вредности су изражене као

средње вредности процента површине испитиваног региона од интереса  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

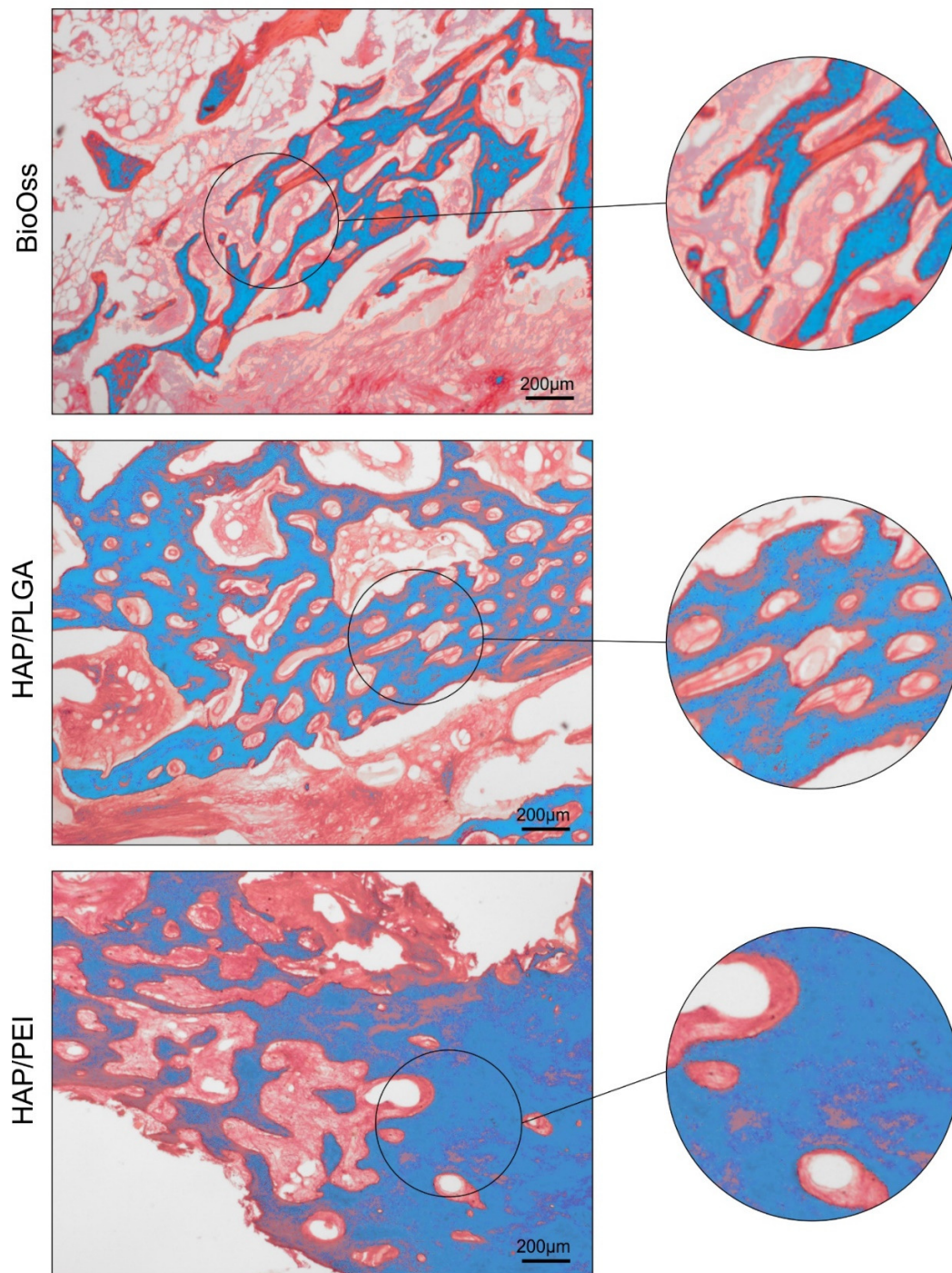


Фигура 4.31 Депозиција колагена у регионима код испитиваног HAP/PEI материјала. Вредности су изражене као средње вредности процента површине испитиваног региона од интереса  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Депоноване калцијума у остеоиду испитивано је имунохистохемијским техникама (Фигуре 4.32-4.34). Депоноване калцијума у коштаном ткиву и ћелијама коштаног ткива испитивано је коришћењем *Alizarin red* хистохемијске технике. Патохистолошка анализа је показала израженије депоноване калцијума у ћелијама ткива третираног HAP/PEI и HAP/PLGA материјалима у поређењу са Bio-Oss материјалом (Фигура 4.34).

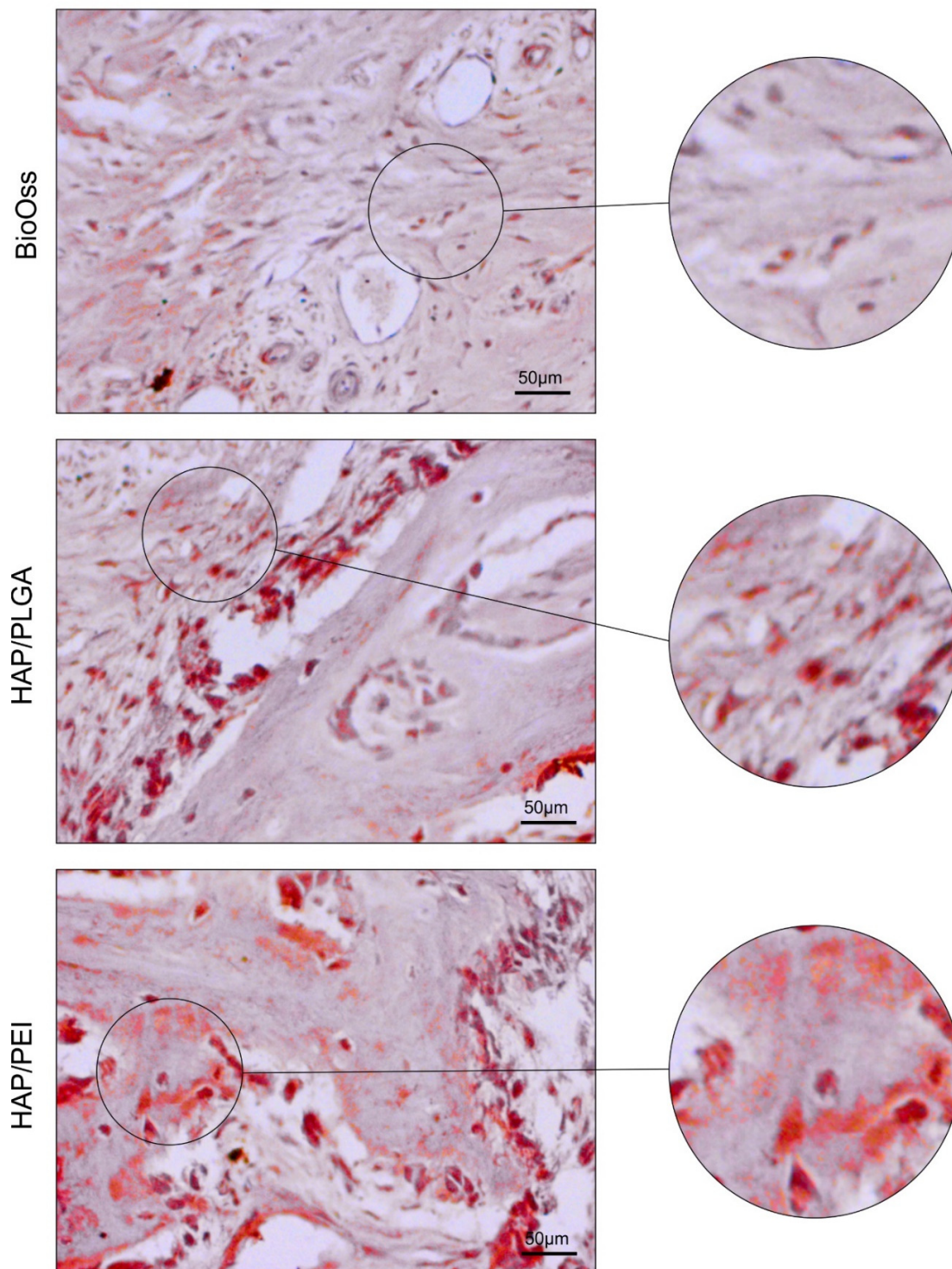


Фигура 4.32. Репрезентативне фотомикрографије *Sirius red* селективне хистохемијске технике *Picrosirius red* показују мању количина колагена у новоствореној кости у *BioOss* графту у поређењу са *HAP/PLGA* и *HAP/PEI* (увећање: панел лево  $\times 20$ , панел десно  $\times 40$ )



Фигура 4.33. Репрезентативне фотомикрографије селективне хистохемијске технике трихром по Masson-у показују мању количина колагена у новоствореној кости у Bio-Oss графту у поређењу са HAP/PLGA и HAP/PEI (увећање: панел лево x10, панел десно x20)



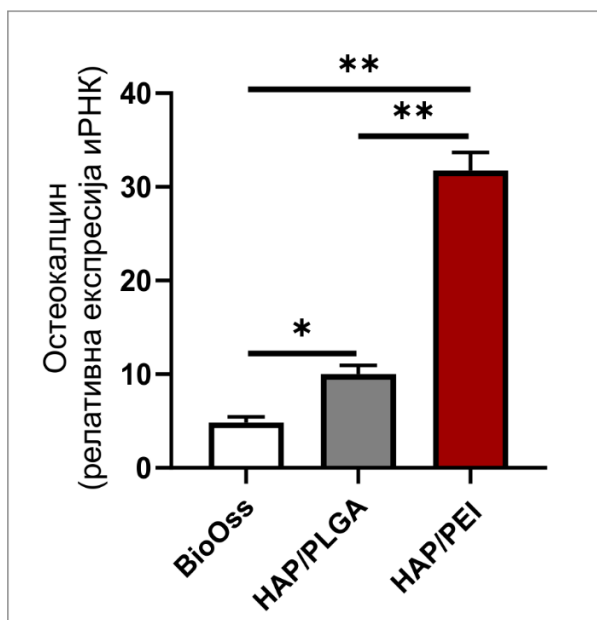


Фигура 4.34. Репрезентативне фотомикрографије Alizarin red хистохемијске технике (увећање: панел лево  $\times 40$ , панел десно  $\times 60$ )

#### 4.5 Експресија гена укључених у ремоделацију кости

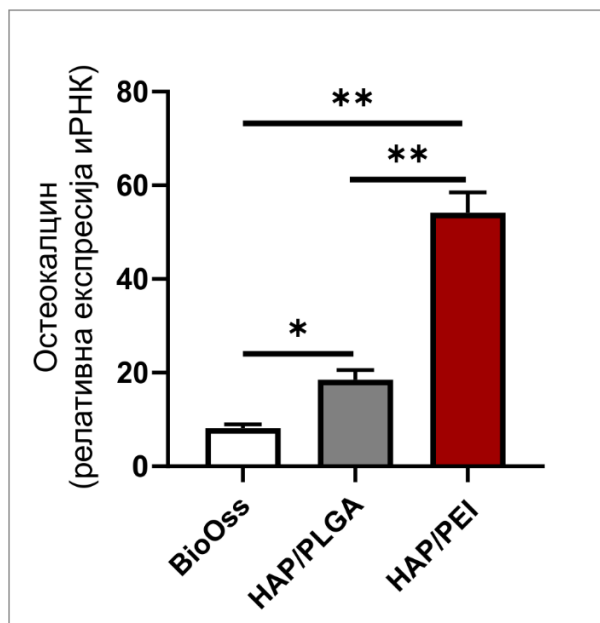
У циљу истраживања експресије гена одговорних за ремоделирање и метаболизам костију: остеокалцин, остеопротегерин (OPG) и рецепторски активатор гена NF-κB лиганда (RANKL), користили смо RT-PCR анализу.

- Релативна експресија гена остеокалцина била је значајно нижа у Bio-Oss групи у поређењу са HAP/PLGA и HAP/PEI групама у сва три испитивана мандибуларна региона: очњака, премолара и молара. Слично, животиње које су третиране HAP/PLGA имале су значајно нижу релативну експресију гена за остеокалцин у поређењу са HAP/PEI у подручју очњака, премолара и молара (Фигуре 4.35-4.37;  $F=123,697$ ,  $F=73,767$ ,  $F=31,104$ ). Исти тренд су уочени у целој мандибули, без обзира на позицију графта (Фигура 4.38;  $F=53,705$ ). Посебна анализа материјала графта је показала да је релативна експресија гена остеокалцина била значајно већа у моларном региону у поређењу са очњацима и премоларом (Фигура 4.39;  $F=93,494$ ). У HAP/PLGA групи, релативна експресија гена остеокалцина била је значајно нижа у пределу очњака у поређењу са премоларном и моларном, док је у премоларној области била значајно нижа у поређењу са моларном (Фигура 4.40;

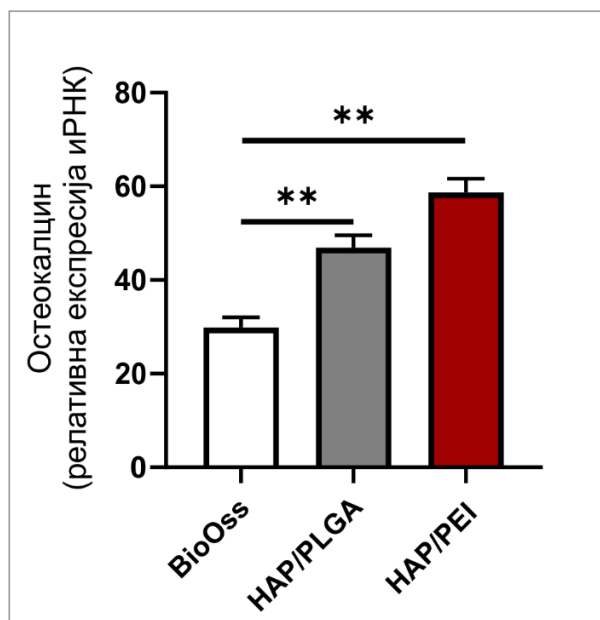


$F=92,120$ ). Анализа HAP/PEI материјала показала је значајно нижу експресију гена у пределу очњака у поређењу са премоларним и моларним регионима (Фигура 4.41;  $F=92,120$ ).

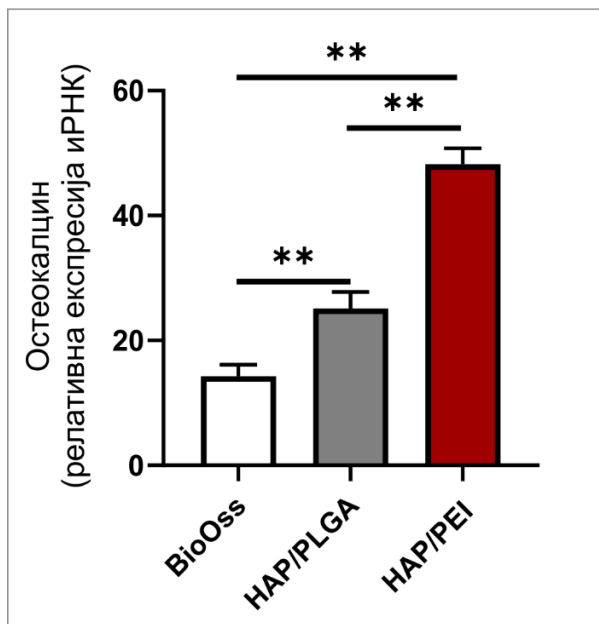
Фигура 4.35. Релативна експресија гена за остеокалцин у регији очњака, Вредности су приказане као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



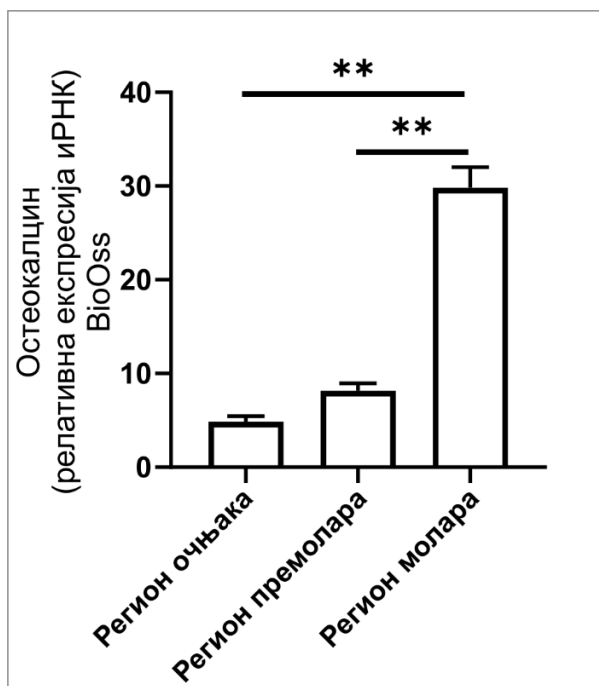
Фигура 4.36. Релативна експресија гена за остеокалцин у регији премолара, Вредности су приказане као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



Фигура 4.37. Релативна експресија гена за остеокалцин у регији молара, Вредности су приказане као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

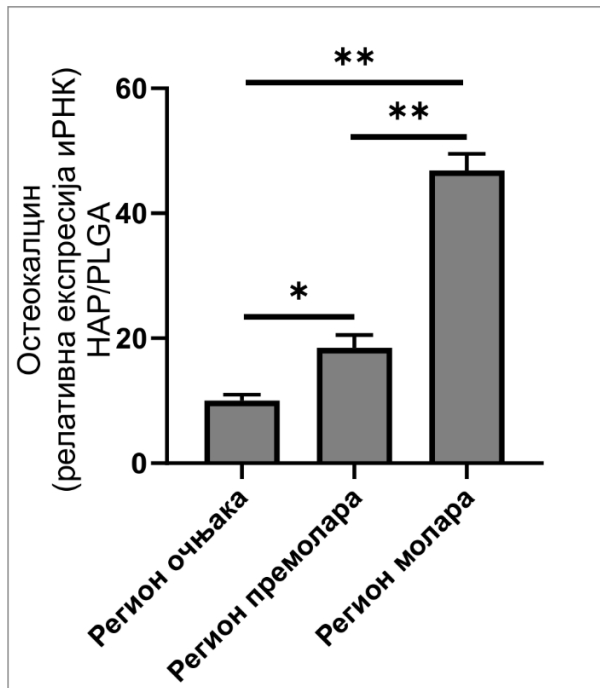


Фигура 4.38. Релативна експресија гена за остеокалцин у свим испитиваним регионима, Вредности су приказане као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

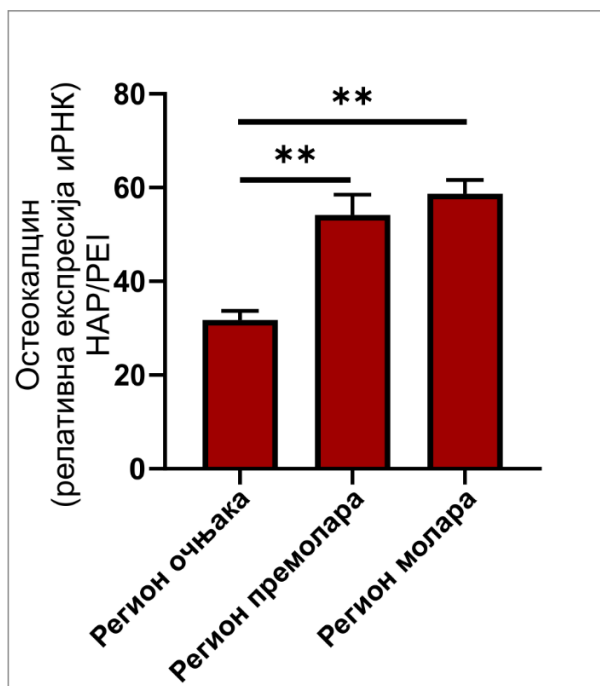


Фигура 4.39. Релативна експресија гена за остеокалцин у регионима код испитиваног Bio-Oss материјала. Вредности су

приказане као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



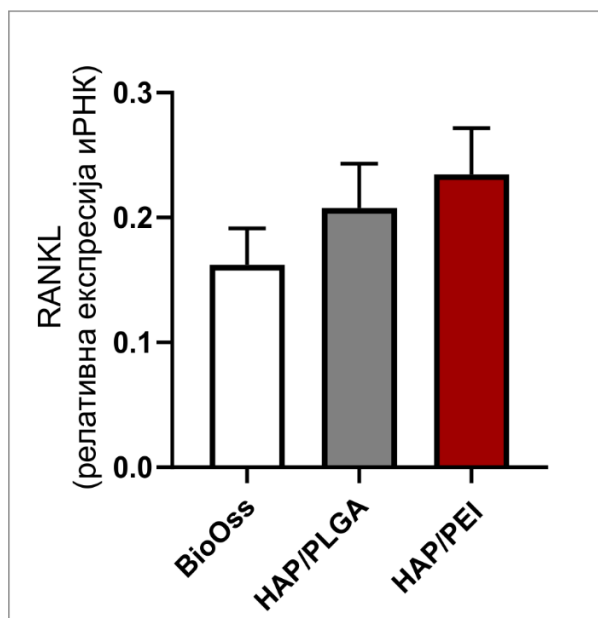
Фигура 4.40. Релативна експресија гена за остеокалцин у регионима код испитиваног HAP/PLGA материјала. Вредности су приказане као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



Фигура 4.41. Релативна експресија гена за остеокалцин у регионима код испитиваног HAP/PEI материјала. Вредности су приказане као средње вредности  $\pm$

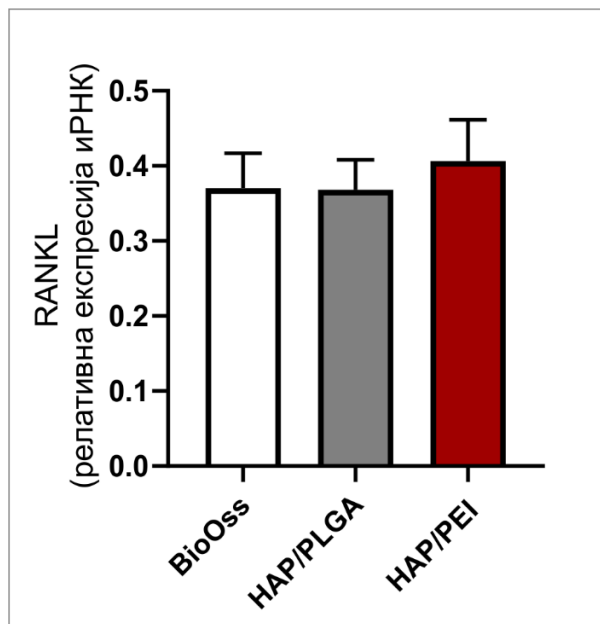
стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

- Анализирана је релативна експресија гена који кодира рецепторски активатор нуклеарног фактора капа-В лиганда (RANKL). Нису уочене значајне разлике у очњацима, премоларним и моларним регионима (Фигуре 4.42-4.44;  $F=1,164$ ,  $F=0,206$ ,  $F=0,922$  респективно). Слично, није било разлике између испитиваних материјала у целој мандибуларној кости (Фигура 4.45;  $F=0,753$ ). Посебна анализа је показала да је у групи Bio-Oss релативна експресија гена RANKL била значајно нижа у пределу очњака у поређењу са премоларним и моларним подручјима (Фигура 4.46,  $F=16,798$ ). Код животиња третираних HA/PLGA, експресија је била значајно нижа у подручју очњака у поређењу са премоларном и моларном регијом (Фигура 4.47,  $F=23,679$ ). Сличан тренд је такође примећен у HA/PEI групи (Фигура 4.48).

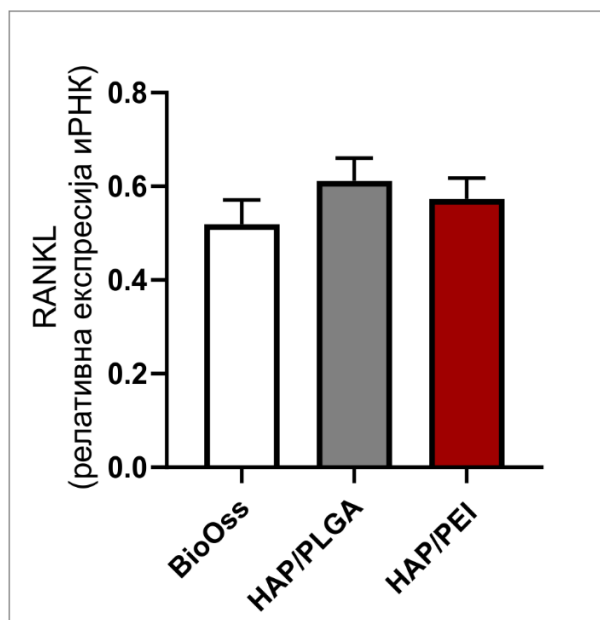


Фигура 4.42. Релативна експресија гена за RANKL у регији очњака, Вредности су приказане као средње вредности  $\pm$

стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

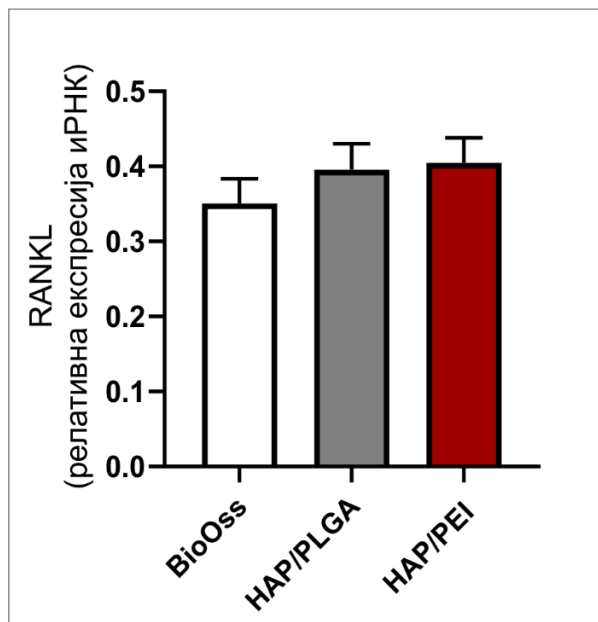


Фигура 4.43. Релативна експресија гена за RANKL у регији премолара, Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

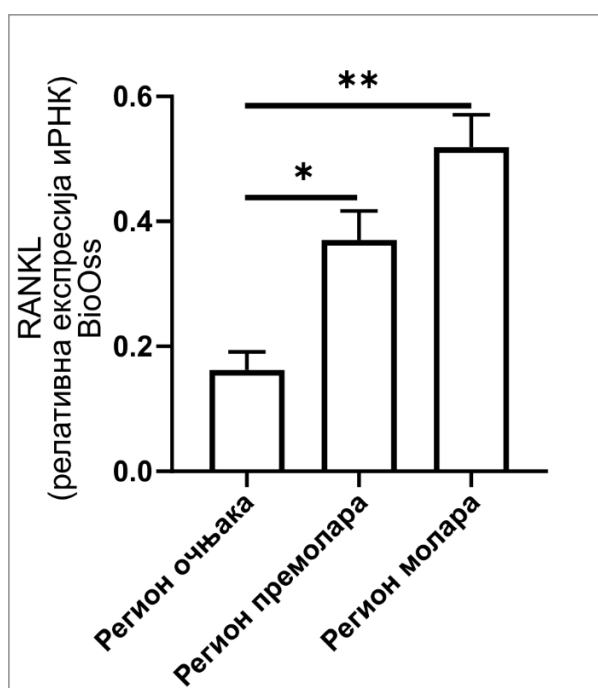


Фигура 4.44. Релативна експресија гена за RANKL у регији молара, Вредности су приказане као средње вредности ±

стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



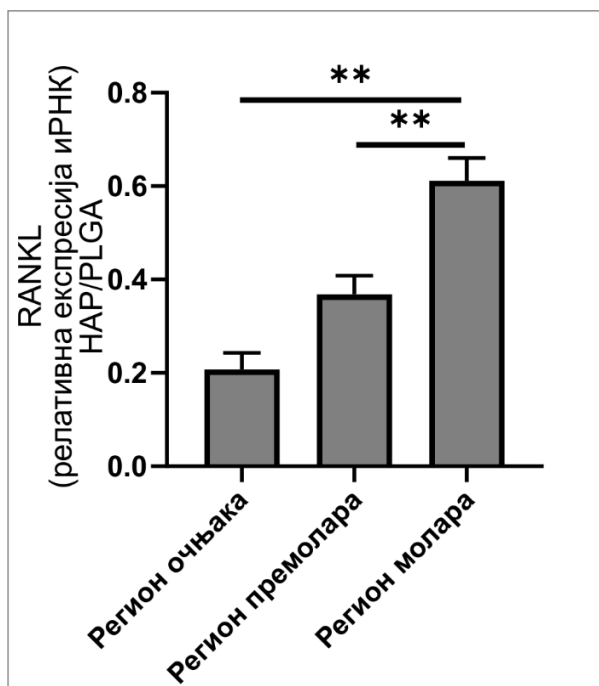
Фигура 4.45. Релативна експресија гена за RANKL у свим испитиваним регионима, Вредности су приказане као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



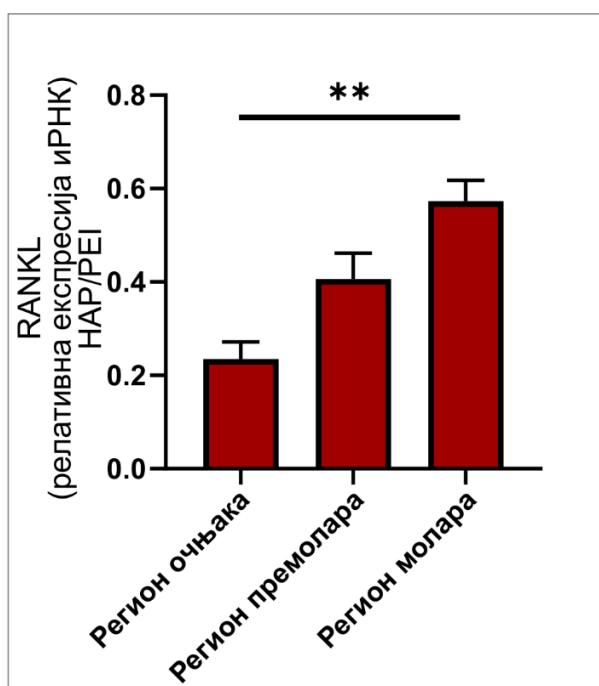
Фигура 4.46. Релативна експресија гена за RANKL у регионима код испитиваног Bio-Oss материјала. Вредности су приказане



као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



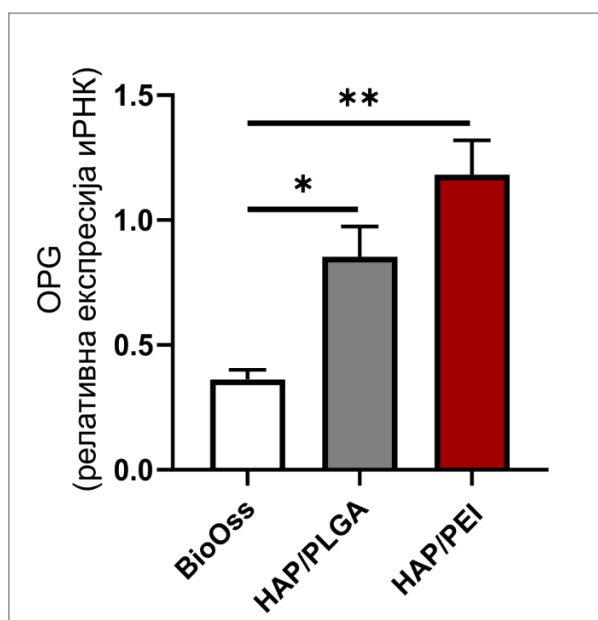
Фигура 4.47. Релативна експресија гена за RANKL у регионима код испитиваног HAP/PLGA материјала. Вредности су приказане као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



Фигура 4.48. Релативна експресија гена за RANKL у регионима код испитиваног HAP/PEI материјала. Вредности су приказане као средње вредности  $\pm$

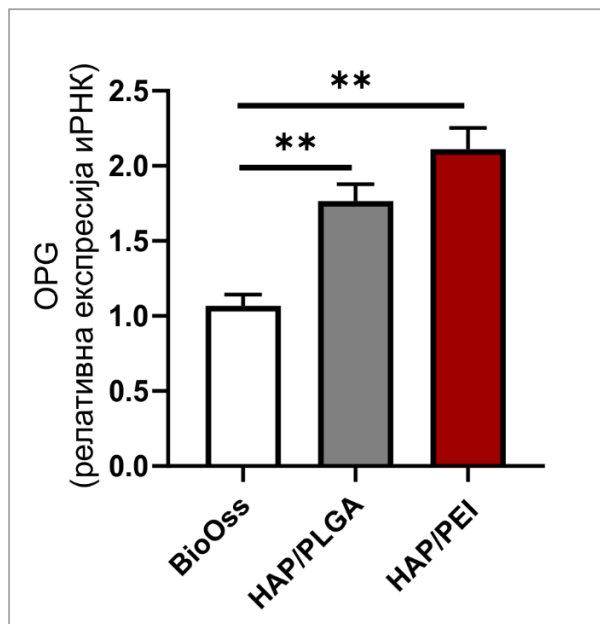
стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

- Анализирана је релативна експресија гена који кодира регулаторни фактор OPG. У сва три истраживана региона, показано је да је релативна експресија OPG гена била значајно нижа у BioOss групама у поређењу са HA/PLGA и HA/PEI (Фигуре 4.49-4.51;  $F=14,538$ ,  $F=22,259$ ,  $F=18,308$  респективно). Овај тренд је такође примећен у целој мандибуларној кости (Фигура 4.52,  $F=24,485$ ). Посебна анализа материјала показала је да је Bio-Oss трансплантат локализован у пределу очњака повезан са значајно нижом релативном експресијом OPG гена у поређењу са премоларним и моларним регионима (Фигура 4.53;  $F=21,542$ ). Слично томе, овај тренд је примећен и код друга два тестирана материјала, HA/PLGA и HA/PEI (Фигуре 4.54 и 4.55;;  $F=27,467$ ,  $F=16,638$  респективно).

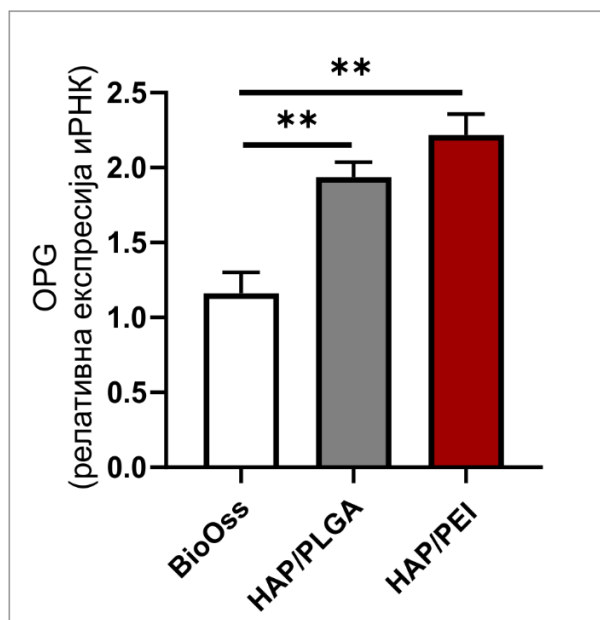


Фигура 4.49. Релативна експресија гена за OPG у регији очњака, Вредности су приказане као средње вредности ±

стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

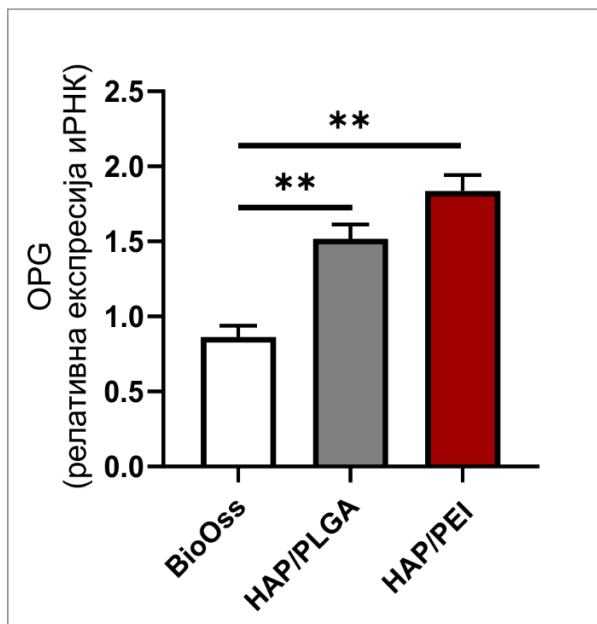


Фигура 4.50. Релативна експресија гена за OPG у регији премолара, Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

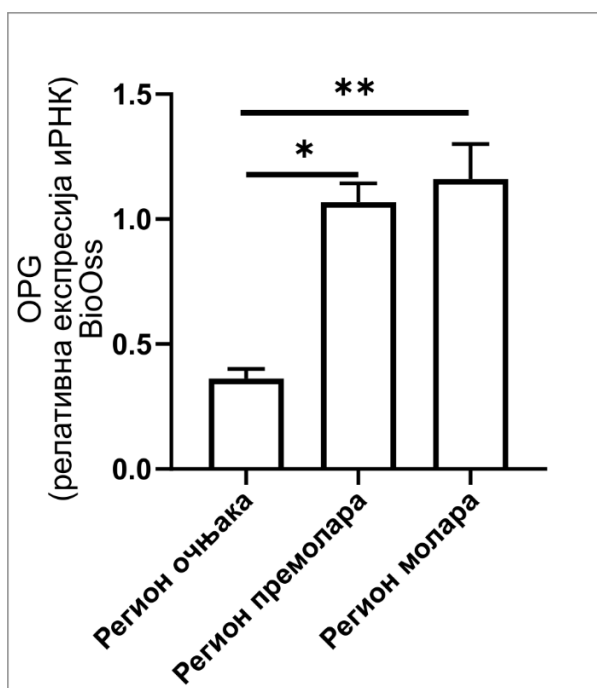


Фигура 4.51. Релативна експресија гена за OPG у регији молара, Вредности су приказане као средње вредности ±

стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

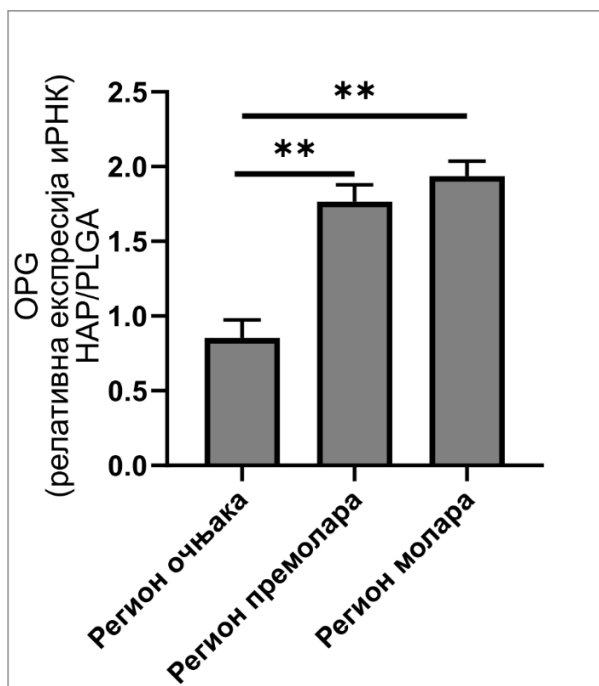


Фигура 4.52. Релативна експресија гена за OPG у свим испитиваним регионима, Вредности су приказане као средње вредности ± стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

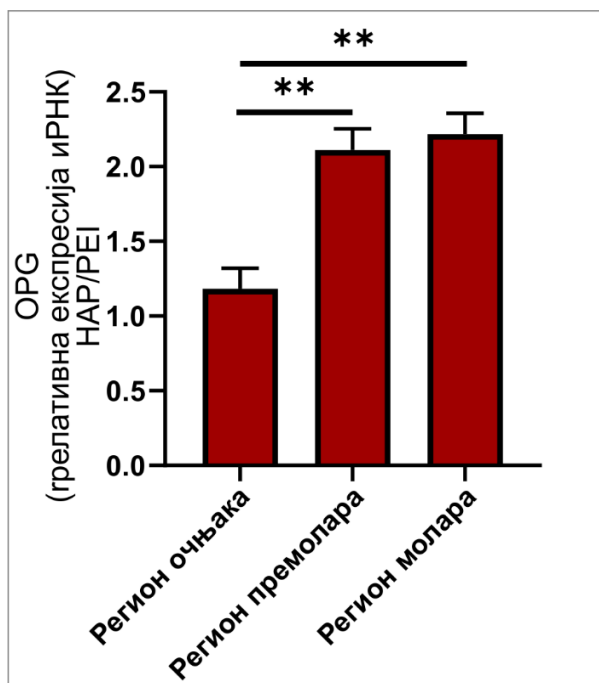


Фигура 4.53. Релативна експресија гена за OPG у регионима код испитиваног Bio-Oss материјала. Вредности су приказане као

средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



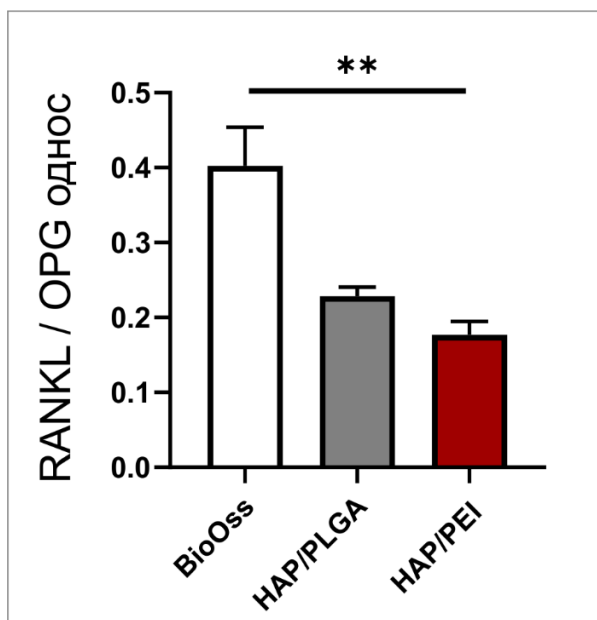
Фигура 4.54. Релативна експресија гена за OPG у регионима код испитиваног HAP/PLGA материјала. Вредности су приказане као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



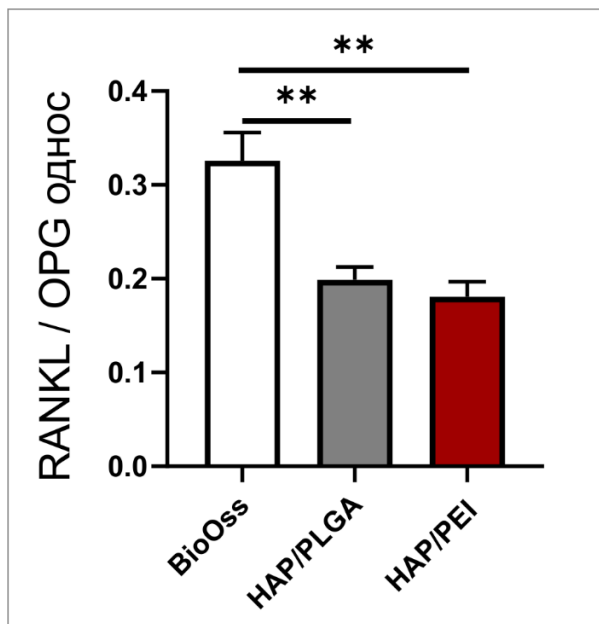
Фигура 4.55. Релативна експресија гена за OPG у регионима код испитиваног HAP/PEI материјала. Вредности су приказане као

средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

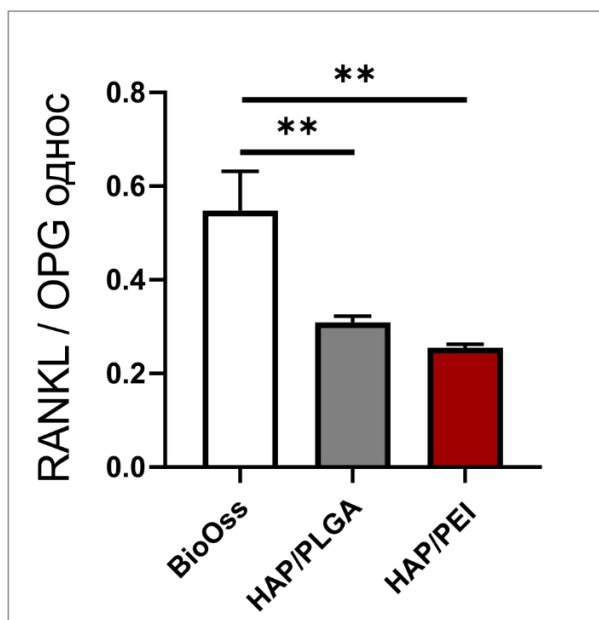
- Након анализе експресије гена, израчунат је однос RANKL/OPG, као важне детерминанте формирања кости. Показано је да је однос RANKL/OPG био значајно нижи у Bio-Oss групи у поређењу са HAP/PLGA, као и HAP/PEI групама у свим истраживаним регионима (Фигуре 4.56-4.58;  $F=13,477$ ,  $F=14,060$ ,  $F=9,830$  респективно). Исти тренд је примећен у целој мандибуларној кости без обзира на позицију графта (Фигура 4.59;  $F=27,163$ ). Анализа појединачних материјала коштаног трансплантата показала је да је у групи Bio-Oss однос RANKL/OPG био значајно нижи у премоларној области у поређењу са очњачком и моларном регијом (Фигура 4.60;  $F=3,551$ ). У групама HAP/PLGA, као и HAP/PEI, однос RANKL/OPG је био значајно већи у моларној регији у поређењу са очњацима и премоларним регионима (Фигура 4.61 и 4.62;  $F=18,940$ ,  $F=9,481$  респективно).



Фигура 4.56. RANKL/OPG однос у региону очњака. Вредности су приказане као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

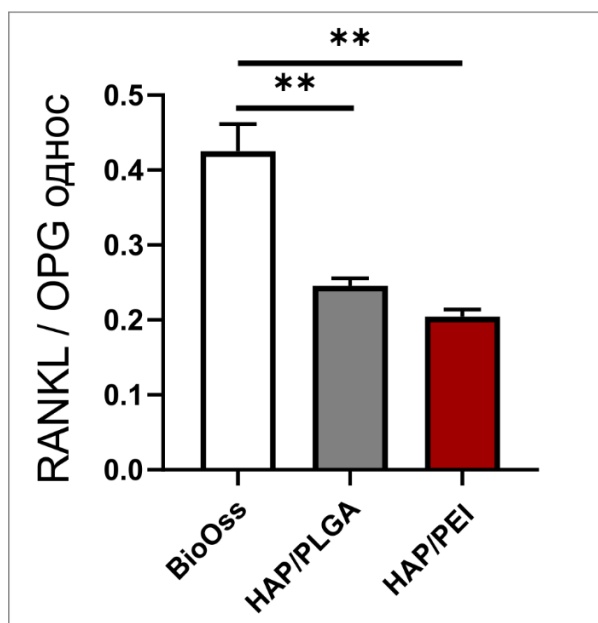


Фигура 4.57. RANKL/OPG однос у региону премолара. Вредности су приказане као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

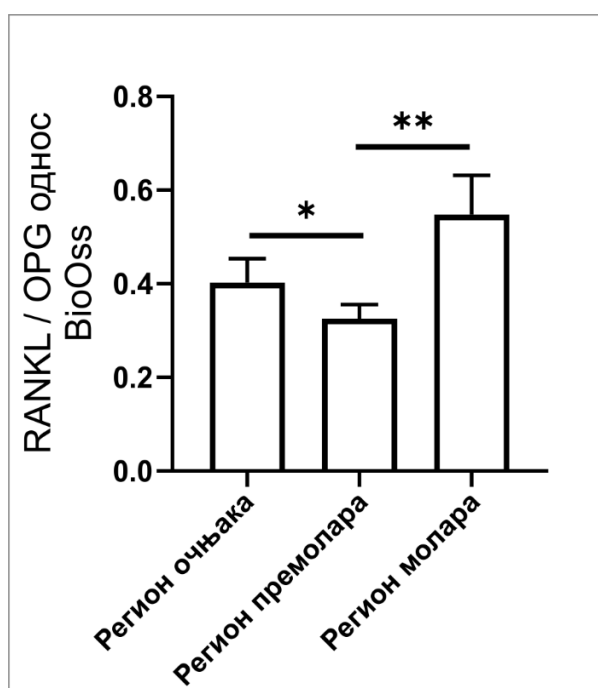


Фигура 4.58. RANKL/OPG однос у региону молара. Вредности су приказане као средње

вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



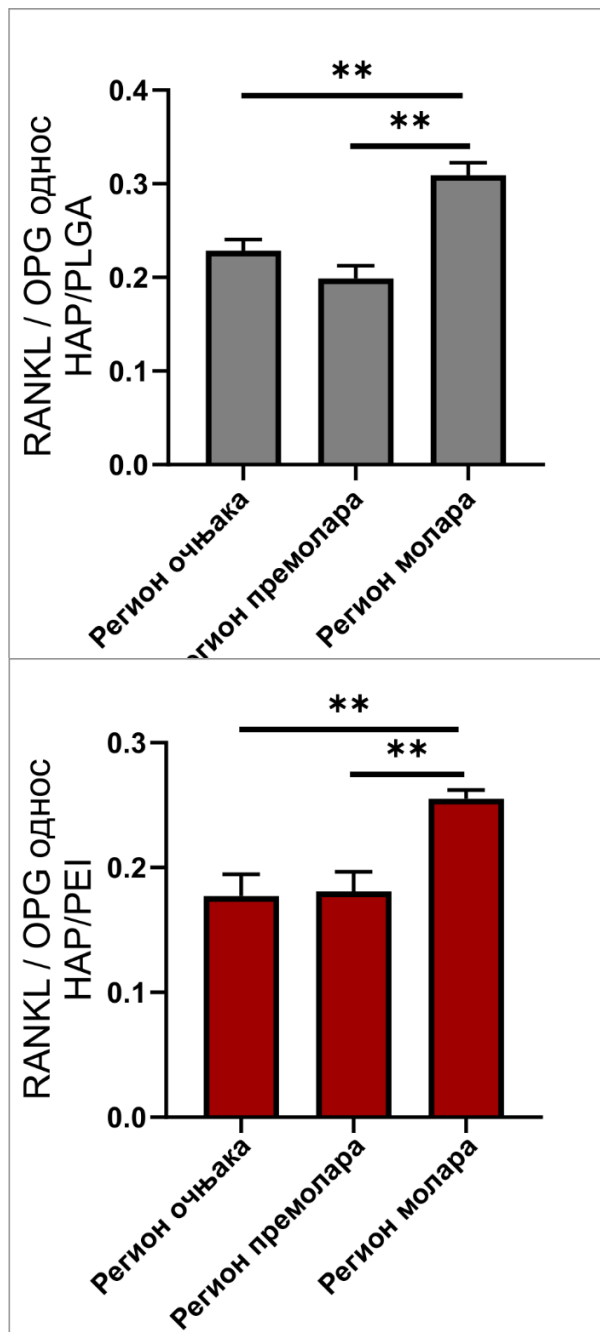
Фигура 4.59. RANKL/OPG однос у свим испитиваним регионима. Вредности су приказане као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



Фигура 4.60. RANKL/OPG однос код испитиваног Bio-Oss материјала.



Вредности су приказане као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



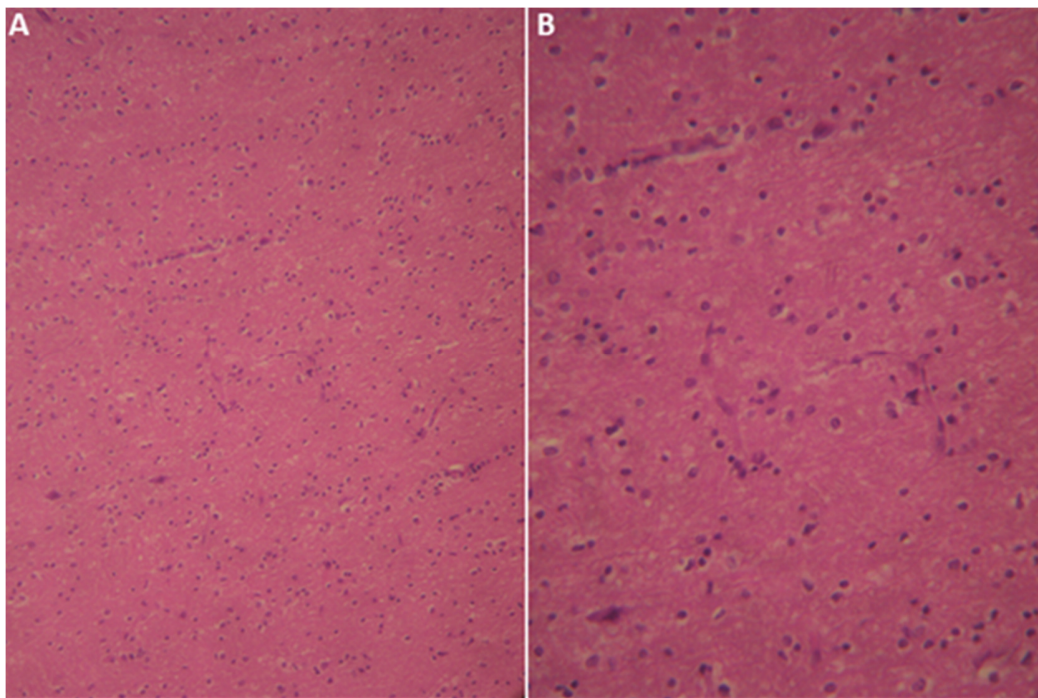
Фигура 4.61. RANKL/OPG однос код испитиваног HAP/PLGA материјала. Вредности су приказане као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Фигура 4.62. RANKL/OPG однос код испитиваног HAP/PEI материјала. Вредности су приказане као средње

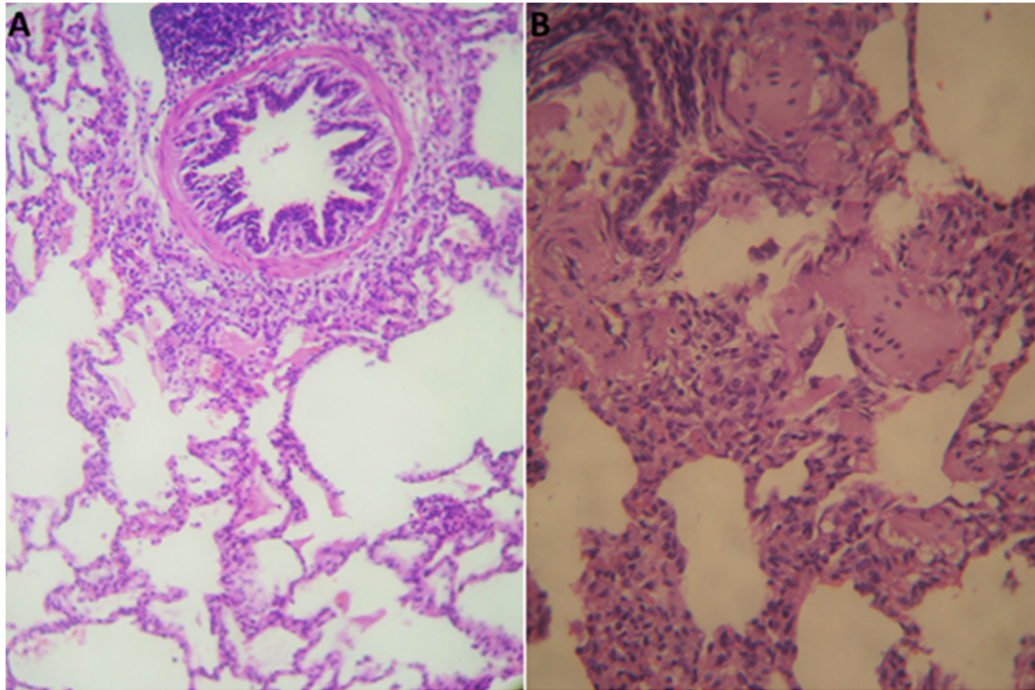
вредности  $\pm$  стандардна девијација (SD), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

#### 4.6 Резултати испитивања системске токсичности препарата

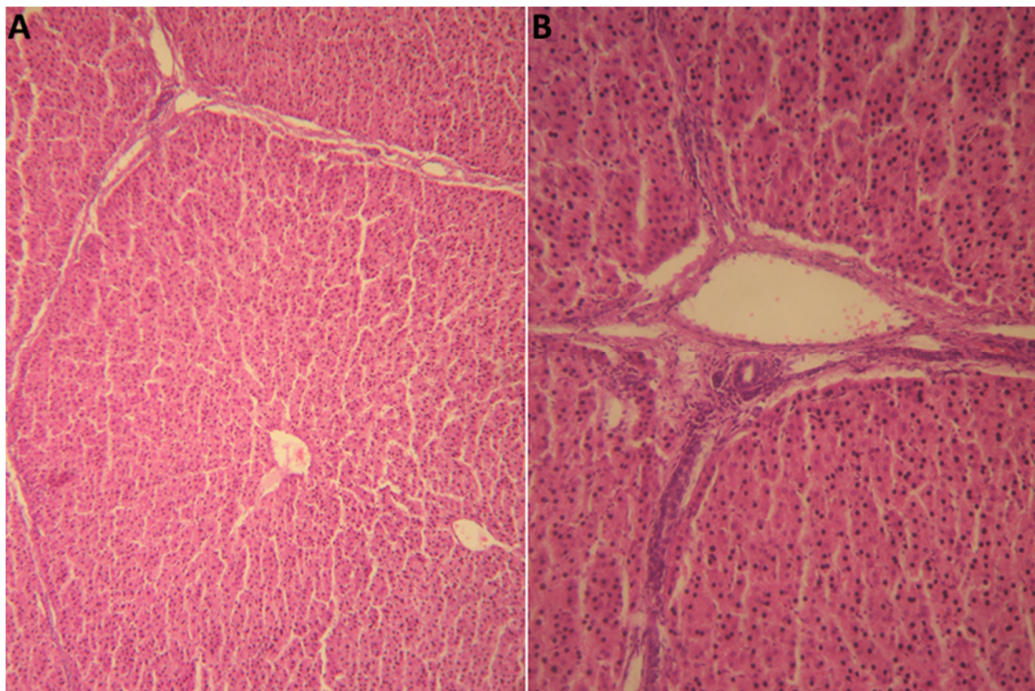
Микроскопским прегледом унутрашњих органа светлосним микроскопом није уочена никаква патолошка промена на испитиваним органима (Фигуре 4.63-4.66)



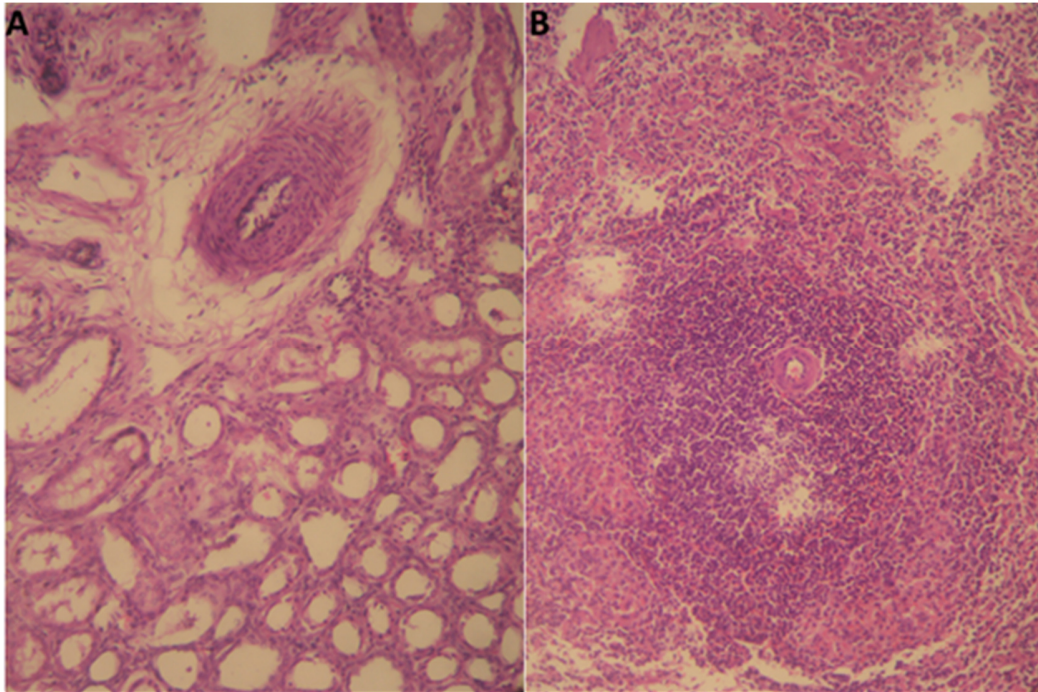
Фигура 4.63. Нормална грађа мозга са глијалним ћелијама; А) увећање  $\times 200$ ; В) увећање  $\times 400$



Фигура 4.64. Нормална грађа плућа са терминалном бронхиолом и алвеолама А) увећање x200; В) увећање x400



Фигура 4.65. Нормална грађа јетре са хексагоналним лобулусима, *v. centralis* у средини и портним просторима на периферији лобулуса А) увећање x200



Фигура 4.66. А) Нормална грађа бубрега са очуваним гломерулима и околним проксилмалним савијеним каналићима (увeћање x200); В) Нормална грађа слезине са очуваном капсулом од које полазе трабекуле. Паренхим чине бела и црвена пулпа (увeћање x200)

# V

# ДИСКУСИЈА

## 5 ДИСКУСИЈА

Циљ докторске дисертације био је да се у *in vivo* условима испита утицај новосинтетисаних композитних скафолда HAP/PLGA и HAP/PEI на регенерацију коштаног дефекта критичне величине мандибуле домаћих свиња као и да се добијени резултати упореде са резултатима најчешће примењиваног алографта (Bio-Oss). Резултати ове дисертације су показали значајно бољу коштану регенерацију применом композитних скафолда што се огледало у квантитету и квалитету новоформиране кости на радиолошком и патохистолошким испитивању (Табела 5). У овом истраживању по први пут у *in vivo* условима је испитиван композитни HAP/PEI скафолд који је показао остеогенетски потенцијал сличан остеогенетском потенцијалу HAP/PLGA скафолда и значајно бољи остеогенетски потенцијал у поређењу са комерцијалним алографтом.

**Табела 5.** Преглед најзначајнијих резултата *in vivo* истраживања коштане регенерације дефекта мандибуле свиња применом HAP/PLGA, HAP/PEI и Bio-Oss скафолда

Параметар	HAP/PLGA	HAP/PEI	BioOss
Густина кости (НУ)	++	++	+
Квалитет кости	Зрело коштаног ткиво правилне структуре	Зрело коштаног ткиво правилне структуре	Ирегуларно коштаног ткиво
Ресорпција скафолда	Потпуна	Потпуна	Непотпуна
Активни остеобласти	+++	+++	+
Депозиција колагена	↑↑	↑↑	↑
Експресија остеокалцина	↑↑	↑↑↑	↑
Имунолошки одговор	-	-	-
RANKL експресија	-	-	-
OPG експресија	↑↑	↑↑	↑
RANKL/OPG	↓↓	↓↓	↓

Реконструкција дефеката костију лица и вилица након операција тумора, деформитета или инфекција представља значајан проблем у оралној и максилофацијалној хирургији услед изузетног естетског и функционалног значаја максилофацијалне регије за пацијенте. У сврху реконструкције дефеката костију лица и вилица примена скафолда базирана на принципима коштаног ткивног инжењеринга представља обећавајућу хируршку методу која се све више примењује у експерименталним и клиничким испитивањима. Експериментално испитивање скафолда за коштану регенерацију у *in vivo* условима захтева поуздан и проверен анимални модел који се базира на сличности и аналогiji физиолошких и патолошких процеса између животиње и човека. Најчешће коришћени анимални модели за краниофацијална истраживања су мале животиње (зец, пацов) јер је њихов генетски код подробно испитан, једноставне и економичне су за чување, одржавање и спровођење истраживања.<sup>73</sup> Ипак коштани метаболизам пацова и зеца се значајно разликује од хуманог те се резултати *in vivo* студија не могу са сигурношћу екстраполирати у клиничку праксу.<sup>74</sup> Такође због њихове величине поједине техничке и хируршке процедуре се не могу у потпуности репродуковати.<sup>73</sup> У овој дисертацији као животињски модел коришћена је мандибула домаће свиње (*Sus scrofa domesticus*) због значајних анатомских, физиолошких и патофизиолошких сличности између ове врсте и човека.<sup>73-75</sup> Иако скелет свиња има већу коштану масу и дебљу трабекуларну кост од људске, коштано ткиво свиња има сличну ламеларну структуру и степен ремоделације и регенерације као људска кост.<sup>76-78</sup> Због ових карактеристика, свиње се користе као поуздан анимални модел у испитивању коштане регенерације краниофацијалне регије, а посебно место има модел виличних костију свиња у испитивању материјала за денталну имплантологију.<sup>79,80</sup> За истраживање спроведено у овој докторској дисертацији

најзначајније је време и механизам коштане регенерације код свиња које је хистопатолошки и временски слично хуманом.<sup>76-78</sup> Коштана регенерација код обе врсте пролази кроз јасно одређене фазе:

- a) формирање хематома на месту трауме (1-5 дана)
- b) формирање фиброзног калуса (5-11 дана)
- c) формирање коштаног калуса (11-28 дана)
- d) ремоделација кости (од треће недеље, траје неколико месеци)<sup>81</sup>

Дужина трајања експеримента одређена је на 16 недеља из неколико разлога:

- Време довољно за коштану зарастање дефекта мандибуле и почетак физиолошке ремоделације и процену квалитета коштаног ткива<sup>81</sup>
- Претходне студије су показале да је потребно време реосорпције PLGA и PEI скафолда око 12-16 недеља<sup>38</sup>
- Инфламаторни одговор на месту коштаног трансплантата је најинтензивнији унутар 16 недеља од имплантације и може онемогућити коштану регенерацију<sup>82</sup>

Добијени резултати радиолошког испитивања кости у овој студији показали су статистички значајно већу минерализованост коштаног ткива унутар дефекта изражено у HU у NAP/PLGA ( $241.56 \pm 57.45$ ) и NAP/PEI ( $254.39 \pm 51$ ) групама у поређењу са Bio-Oss групом ( $196.97 \pm 39.35$ ). СВСТ због својих предности у смислу нижих доза зрачења, једноставније апаратуре, прецизне мултипланарне 3Д реконструкције и смањења артефаката представља методу избора за анализу густине кости у преимплантолошкој фази, дијагностичке процедуре у оралној и максилофацијалној хирургији као и ортодонтској терапији.<sup>83-86</sup>



Квалитет кости подразумева адекватна механичка својства, архитектуру, степен минерализације коштаног матрикса и хемијски састав и структуру коштаних минералних материја, као и својства ремоделирања кости. Misch и Kircos<sup>87</sup> као и Northon и Gamble<sup>88</sup> су предложили класификацију густине кости на основу СТ снимака уз употребу интерактивног софтвера при чему се на основу објективног и квантитативног резултата израженог у HU добијају подаци о квалитету кости на месту будућег лежишта имплантата. Велики број студија показао је позитивну корелацију вредности воксела добијених СВСТ-ом са HU јединицама микро-СТ и СТ, златних стандарда у процени квалитета виличних костију.<sup>89-92</sup> Вредности сиве скале (gray scale) који се добијају СВСТ снимањем и конвертују у HU су у корелацији са стандардно коришћеним HU вредностима микро-СТ и СТ.<sup>93-96</sup> Густина кости у HU је значајан радиолошки параметер квалитета коштаног ткива виличних костију. Показано је да густина кости и дебљина кортикалне кости имају значајан утицај на примарну стабилност имплантата, тако је на местима са нижом радиографском густином кости показан нижи степен осеоинтеграције имплантата.<sup>97-100</sup>

У СВСТ анализи забележена је и статистички значајна разлика у погледу дистрибуције минерализације између испитиваних региона. Највиши степен минерализације забележен је у регији очњака у поређењу са постериорним регионима (премоларни и моларни). Индивидуална анализа показала је да је густина кости била највиша у регији очњака, док је само у НАР/PLGA групи ова разлика била статистички значајна у поређењу са премоларним и моларним регионима. Радиолошка анализа густине костију анализирана на СВСТ-у, показала је да је у пределу очњака густина костију била значајно нижа у Bio-Oss групи у поређењу са НАР/PLGA и НАР/PEI групама. У премоларном и моларном, густина костију је била значајно нижа код животиња третираних Bio-Oss препаратом у поређењу

са НАР/РЕИ групом док није било разлике у поређењу са НАР/PLGA групом. Имајући у виду чињеницу да је густина кости у НУ добијених на основу СВСТ снимања валидан параметар за процену квалитета коштаног ткива може се закључити да примена НАР/PLGA и НАР/РЕИ скафолда резултује значајно бољом коштаном регенерацијом у поређењу са конвенционалним скафолдом. Уочена разлика се може објаснити разликама у дистрибуцији спонгиозне и компактне кости у различитим регионима мандибуле. Однос компактне и спонгиозне кости мења се током раста и развоја доњевиличне кости, зависи и од присуства зуба, мишићне активности, а до његове промене долази и у различитим патолошким стањима.<sup>101</sup> Такође постоје и битне регионалне разлике које зависе од присуства анатомских отвора и канала доње вилице.<sup>102</sup> Кортикална кост која се одликује високим степеном минерализације, већом чврстином и нижом метаболичком активности, махом се налази у постериорним регионима мандибуле, док је у антериорним регионима већи проценат спонгиозне кости.<sup>103-105</sup> Волумен спонгиозне кости се смањује од антериорне ка постериорним регионима мандибуле. Спонгиозна кост је носилац коштаног метаболизма и ремоделације услед веће целуларности, присуства активних остеопрогениторних ћелија и прокрвљености.<sup>104,105</sup> Коштана густина алвеоларне кортикалне кости креће се између 1000 НУ у каниној регији, 1100 НУ у премоларној до 1300 НУ у моларној регији.<sup>106</sup> Са друге стране густина спонгиозне кости има вредности од око 530 НУ у каниној регији, 447 НУ у премоларној до 360 НУ у моларној регији.<sup>106</sup> Сличан однос постоји и за базалне регије мандибуле где се вредности густине кортикалне кости крећу од 1400 НУ у очњачкој регији до 1570 НУ у моларној регији, док су вредности густине спонгиозне кости у очњачкој, премоларној и моларној регији 440 НУ, 260 НУ и 230 НУ респективно.<sup>106</sup> Имајући у виду чињеницу да се спонгиозна кост

одликује већом метаболичком активношћу и остеогенетским потенцијалом, већа коштана густина забележена у дефектима очњачке регије може се објаснити већим уделом спонгиозне кости у овој регији у поређењу са премоларном и моларном регијом.

У процени квалитета новоформираног коштаног ткива имунохистохемијским методама, резултати ове докторске дисертације су показали значајно боље параметре након примене  $\text{HAP/PLGA}$  и  $\text{HAP/PEI}$  скафолда у поређењу са  $\text{Bio-Oss}$ -ом у погледу већег броја активних остеобласта, већој депозицији колагена и већој имунореактивности на остеокалцин. Унутар периода трајања експеримента од 16 недеља у  $\text{HAP/PLGA}$  и  $\text{HAP/PEI}$  групама дефекти су били испуњени зрелом кости са знацима физиолошке ремоделације, док су дефекти испуњени  $\text{Bio-Oss}$ -ом били испуњени коштаном ткивом неправилне структуре уз евидентне резидуалне партикуле скафолда.

Регенерација кости применом скафолда укључује један од следећих основних биолошких механизма коштане регенерације: остеогенезу, остеоиндукцију, остеокондукцију и остеоинтеграцију.<sup>15</sup> Остеогенеза подразумева изградњу новог коштаног ткива од стране претходно недиферентованих мезенхималних матичних ћелија самог графта које су дејством локалних активационих фактора диферентоване у остеопрогениторне ћелије и могућа је применом аутографта.<sup>107</sup> Остеоиндукција подразумева стимулацију и активацију мезенхималних ћелија домаћина да се диференцирају у остеобласте факторима диференцијације унутар примењеног графта.<sup>108</sup> Ефикасност примењених скафолда у КТИ у највећој мери подразумева њихову остеокондуктивност. Остеоиндукција подразумева урастање ћелија у скафолд, неоангиогенезу и формирање система Хаверсових канала који замењује скафолд у процесу ремоделације.<sup>109</sup> Остеоинтеграција подразумева потпуно срастање графта са дефектом што представља крајњи резултат претходна три процеса.

Треба истаћи да је остеокондуктивност HAP/PLGA скафолда подробно испитана и показана у *in vivo* студијама.<sup>32,38,60-62</sup> Резултати ове докторске студије показали су да су остеогенеза и природна ремоделација кости присутни код свих испитиваних материјала уз одсуство инфламаторне реакције. Ови резултати показују да све материјале карактерише одлична биокомпатибилност што је у складу са претходним студијама.<sup>110-112</sup> У Bio-Oss групи хистолошким анализом уочено је незрело ирегуларно коштано ткиво прожето остеобластима и капиларним крвним судовима. Са друге стране, у HAP/PLGA а посебно у HAP/PEI групи новостворено коштано ткиво се хистолошки одликује правилном ламеларном структуром уз знакове физиолошке ремоделације кости. Што се тиче ћелијског састава у новоформираном коштаном ткиву, Bio-Oss групу карактерише присуство ирегуларно распоређених остеобласта и фибробласта уз ретке мултиједарне ћелије док се у HAP/PLGA и HAP/PEI групама запажају активни остеобласти као и остеоцити у лакунама коштаног ткива. Такође, хистолошким прегледом се у Bio-Oss групи наилази на остатке нересорбованог алографта у знатно већој мери у поређењу са HAP/PLGA и HAP/PEI групама, респективно. Добијени резултати указују да HAP/PLGA и HAP/PEI имају потенцијал брзе и потпуне трансформације у коштано ткиво као и израженији остеокондуктивни потенцијал у поређењу са Bio-Oss алографтом. Резултати добијени за HAP/PLGA скафолд су слични резултатима претходних студија. Јокановић и сар.<sup>38</sup> су показали да примена HAP/PLGA скафолда за реконструкцију дефекта калварије зеца резултује формирањем зреле ламеларне кости након 9 и 12 недеља уз одсуство инфламаторне реакције и потпуну ресорпцију скафолда након 12 недеља. Слични резултати су приказани у студији на калварији пацова.<sup>60</sup> Познато је да степен ресорпције скафолда треба да прати природне механизме остеогенезе и ремоделације. HAP се

одликује великом порозношћу и растворљивошћу у ткивима што може да угрози реконструкцију дефеката кости критичне величине.<sup>56,113</sup> У компаративним студијама НАР и НАР/PLGA скафолда показана је спорија деградација НАР/PLGA скафолда што је резултовало формирањем зреле ламеларне кости уз одсуство инфламаторне реакције у НАР/PLGA групи.<sup>60,114,115</sup> Битно је истаћи да ресорпција НАР скафолда почиње око 3-4 недеље након имплантације што може бити недовољно време за остеоиндукцију ћелија која се одиграва око 4 недеље од имплантације.<sup>60</sup> Композитна структура НАР/PLGA скафолда осим успорене деградације скафолда повећава укупну порозност и унутрашњи распоред пора.<sup>32,38,56</sup> Имајући у виду чињеницу да су мултинуклеарне имуне ћелије присутне у регији дефекта и 4 месеца након имплантације, брзина деградације скафолда треба да буде усклађена са процесима коштане ремоделације али и довољно брза да не изазове имунолошку реакцију.<sup>82</sup> Са друге стране Bio-Oss се одликује спором и одложеном деградацијом дужом од 12 месеци.<sup>116,117</sup> Хистолошке студије су показале да упркос томе што се Bio-Oss одликује високом биокомпатибилношћу, његове резидуалне партикуле остају у виду инкапсулираних острваца унутар остеоида.<sup>116,117</sup>

Како је ово прва студија у којој је у *in vivo* условима истраживан НАР/PEI скафолд, добијени резултати показују готово потпуну ресорпцију скафолда унутар 16 недеља од имплантације. Резултати претходних студија показују да скафолди на бази PEI поседују високу биокомпатибилност и не узрокују имунолошку реакцију.<sup>118-120</sup> На пример скафолд у виду гела на бази PEI/карбоксиметилцелулозе показује обећавајућа остеоиндуктивна својства и ниску имуногеност у *in vitro* и *in vivo* условима.<sup>119</sup> Занимљиво је истраживање Куо и Ку<sup>69</sup> које се тиче примене скафолда PEI/полиетилен оксид/хитин/хитосан у регенерацији ткива хрскавице. Резултати овог истраживања показали су значајно

побољшање остеокондуктивних својстава, повећање порозности скафолда, биокомпатибилности и успешну хондрогенезу модификовањем ПЕО/хитин/хитосан скафолда применом PEI. Такође занимљива су истраживања Хуанг и сарадника<sup>120,121</sup> која су се бавила генском терапијом коштаног дефеката применом PLGA порозног скафолда са PEI као носиоцем ДНК плазида са кодом за BMP-4. Резултати ових истраживања показали су високу биокомпатибилност скафолда као и значајан остеокондуктивни и остеоиндуктивни ефекат што је као резултат имало квалитативно и квантитативно повећање остеогенезе. Дакле, имајући у виду радиолошке и хистолошке налазе може се закључити да степен деградације HAP/PEI и HAP/PLGA скафолда прати природне процесе остеогенезе и ремоделације, што је у складу са налазима претходних истраживања.<sup>122</sup>

Велики број истраживања на композитним 3Д скафолдима показао је одличне ефекте скафолда у промоцији остеогенезе и реконструкцији дефеката кости критичне величине услед остеокондуктивности, високе биокомпатибилности и нетоксичности. Познато је да синтеровани 3Д HAP скафолди имитирају архитектуру природног коштаног матрикса и хемијски састав природног апатита. Доказано је такође да модификација површине HAP скафолда полимерима попут PLGA и PEI побољшава површинске и механичке карактеристике скафолда али не утиче на биокомпатибилност и архитектуру HAP скафолда.<sup>32,38</sup> Макро-, микро- и наноструктура HAP/PLGA и HAP/PEI скафолда је високо порозна са високим индексом повезаности пора (број повезаних пора на  $\text{mm}^3$ ) и повољне величине за миграцију остеопрогениторних ћелија (највећи број пора промера  $>115\text{nm}$ ) што утиче на већу пролиферацију ћелија и њихову миграцију унутар скафолда и самим тим формирање квалитетнијег коштаног ткива. Величина и распоред пора унутар скафолда имају велики утицај на ангиогенезу. Скафолд треба да поседује такву

унутрашњу структуру која омогућава урастање крвних судова унутар коштаног заменика што је праћено насељавањем остеопрогениторних и имуних ћелија које доводе до постепене ресорпције скафолда и његове замене коштаном ткивом.<sup>123</sup> Величина пора унутар НАР скафолда има унутрашњу порозност сличну порозности природне трабекуларне кости (200-400 $\mu$ m) што представља оптималну величину пора за насељавање и фиксирање ћелија као и ангиогенезу.<sup>38</sup> Са друге стране Bio-Oss показује велике варијације у величини макропора и нижи индекс повезаности пора.<sup>38</sup> Величина макропора мања од 200  $\mu$ m и већа од 400  $\mu$ m је неповољна за насељавање ћелија и ангиогенезу.<sup>124</sup> Боље карактеристике НАР/PLGA и НАР/PEI скафолда у репарацији коштаних дефеката у поређењу са Bio-Oss-ом се у великој мери могу објаснити и разликама у порозности оба материјала. Макро- и микропорозност НАР графта омогућава оптималне услове за два основна момента у репарацији коштаних дефеката - неоангиогенезу и остеогенезу јер величина макропора омогућава урастање крвних судова у графт и омогућава простор са миграцију остеобласта. Нанопорозност НАР и висок индекс повезаности пора омогућава оптимално квашење унутрашњости скафолда, дифузију хранљивих материја, протеина и фактора раста. Порозност скафолда такође утиче на процес иницијације остеогенезе на месту апликовања коштаног графта јер је на порознијем графту израженија адсорпција протеина. Ранија истраживања су показала да је овај моменат кључан у везивању округлог остеобласта за површину графта што утиче на промену облика ћелије и њену активацију и дешава се унутар 90 минута од апликације графта.<sup>22</sup> На основу наведеног, супериорније карактеристике НАР/PLGA и НАР/PEI графтова у поређењу са Bio-Oss-ом које се огледају у значајно већој порозности, већем броју микропора одговарајуће величине за остеокондукцију и ангиогенезу, већим индексом повезаности пора и већим бројем и

величином нанопора може се закључити да је значајно бољи квалитет кости након примене композитних скафолда резултат 3Д порозне архитектонике ових скафолда.

Показано је такође да степен ресорпције HAP/PLGA графта прати степен остеогенезе те да је скафолд потпуно ресорбован унутар 12 недеља и не изазива локалну инфламаторну реакцију услед ослобађања метаболита.<sup>38,60,61</sup> Претходна истраживања су показала да се стандардно коришћени алогграфтови попут Bio-Oss-а не ресорбују у потпуности након 12-24 недеља по имплантацији.<sup>125,126</sup> Имајући у виду чињеницу да је активност имуног система интензивна и 16 недеља након имплантације<sup>82</sup> потпуна ресорпција графта унутар овог периода је од велике важности како би се избегла нежељена имунолошка реакција на примењени материјал.<sup>55</sup> Vizenjima и сар.<sup>60</sup> су показали готово потпуну реконструкцију дефекта критичне величине пацова унутар 6 недеља након примене HAP/PLGA скафолда уз хистолошке знаке остеоиндуктивности и потпуно одсуство инфламаторне реакције. Идеално степен ресорпције скафолда треба да прати степем ремоделације кости, тј. скафолд би требало да се постепено ресорбује активношћу остеокласта и замењује коштаном ткивом. Постепена ресорпција HAP/PLGA скафолда почиње око 4 недеље и спорија је од деградације HAP што незрелом коштаном ткиву пружа довољну потпору током ремоделације.<sup>60</sup> Познато је да продукти хидролизе PLGA могу узроковати инфламаторни ефекат услед њиховог ацидитета.<sup>58</sup> Бојар и сар.<sup>127</sup> су показали да изражена инфламаторна реакције може довести до успорене остеогенезе након примене HAP/PLGA скафолда. PEI је разгранати полимер са позитивним електронским набојем који се углавном користи као стабилизатор различитих неорганских нанопартикула.<sup>128,129</sup> Због својих особина PEI је најчешће коришћен у генској терапији. Цитотоксичност PEI је зависна од концентрације продуката разградње те је његова модификација неопходна ради



постизања биокомпатибилности.<sup>129,130</sup> У новијем истраживању нанопартикуле НАР и PEI су успешно коришћене као носилац антитуморског лека доксициклина до ћелија канцера уз задовољавајућу биокомпатибилност.<sup>118</sup> У садашњем истраживању није забележена инфламаторна реакција након микроскопске евалуације сва три примењена материјала што говори у прилог адекватног степена њихове ресорпције.

Коштани дефект критичне величине је дефинисан као најмањи интраосеални дефект који неће спонтано зарастати за живота експерименталне животиње.<sup>131</sup> Користећи модел дефекта кости критичне величине, Gutierrez-Quintero и сар.<sup>132</sup> и Probst и сар.<sup>133</sup> су показали ефикасну реконструкцију дефеката мандибуле зеца и свиње респективно, применом НАР/PLGA скафолда. Велики изазов у реконструктивној хирургији је реконструкција дефеката са потпуним прекидом континуитета кости. Новија истраживања показала су велики потенцијал примене скафолда на бази НАР/PLGA. Мицић и сар.<sup>61</sup> показали су готово потпуну реконструкцију великог дефекта улне зеца након 12 недеља применом нано-НАР/PLGA скафолда. У овој студији након 12 недеља показана је зрела минерализована ламеларна кост са Хаверсовим каналићима и крвним судовима као и зрела коштана срж на месту скафолда. Слични резултати су добијени у студијама са великим дефектом радијуса зеца применом НАР/PLGA скафолда.<sup>134,135</sup>

Хистолошка анализа квантитативне и квалитативне депозиције колагена показала је значајно више вредности у НАР/PLGA и НАР/PEI групама у поређењу са Bio-Oss-ом.<sup>136-138</sup> Хистолошки изглед депонованог колагена у овим групама указује на правилно распоређена минерализована колагена влакна и успешну остеогенезу.<sup>138,139</sup> Колаген тип I чини највећи део органске компоненте ЕЦМ коштаног ткива и представља основу за таложење кристала хидроксиапатита унутар његове фибриларне структуре. Колаген је

услед високе биокompatбилности испитиван у склопу различитих скафолда у регенерацији коштаног ткива где је установљено да има низ повољних улога: стабилизација коагулума, хемотакса фибробласта периодонталног лигамента, диференцијација остеопрогениторних ћелија, инхибиција остеокластогенезе.<sup>140,141</sup> Установљено је да колаген осим ефекта на остеогенезу има и значајан утицај на неоангиогенезу.<sup>142</sup> Ангиогенеза претходи остеогенези у репарацији коштаног дефекта и представља неопходан фактор за успешну регенерацију коштаног дефекта испуњеног скафолдом. Поред тога што прорастање крвних судова омогућава оптималну средину за диференцијацију мезенхималних остеопрогениторних ћелија, ендотелне ћелије продукују факторе раста попут васкуларног ендотелног фактора раста (VEGF) који директно утичу на диференцијацију и функцију остеобласта, повећавају микропропустљивост капилара, стимулишу пролиферацију ендотелних ћелија унутар скафолда и индукују експресију протеолитичких ензима.<sup>143,144</sup> Процес неоангиогенезе и остеогенезе су неодвојиво спојени у виду позитивне повратне спреге. Осим присуства крвних судова неопходна је и њихова довољна разгранатост унутар скафолда и самог коштаног ткива. Установљено је да је за функцију и преживљавање остеобласта неопходно присуство капиларне мреже на удаљености до 200  $\mu\text{m}$  како не би дошло до њиховог одумирања и апоптозе.<sup>145-147</sup> Такође, број и распоред макропора унутар НАР/PLGA и НАР/PEI скафолда олакшава ангиогенезу услед бољег остеокондуктивног ефекта. Нанопорозност ових скафолда олакшава дифузију хранљивих материја и фактора раста и олакшава ангиогенезу и остеогенезу.

Један од најзначајнијих резултата ове докторске дисертације била је значајно већа имунореактивност на остеокалцин у НАР/PEI групи у поређењу са НАР/PLGA и Bio-Oss групом. Овај резултат је потврђен анализом генске експресије остеокалцин гена у

мандибулама које су такође показале значајно већу експресију гена за остеокалцин у НАР/РЕИ групи. Интересантан је налаз да је експресија остеокалцина зависна од локализације с обзиром да је значајно већа у регији молара него у регији очњака и премолара у свим испитиваним групама. Остеокалцин је најзаступљенији неколагени протеин у коштаном матриксу кога продукују остеобласти. Остеокалцин је један од најважнијих маркера ангиогенезе и остеогенезе.<sup>148-150</sup> Карбоксилацијом значајно расте његов афинитет за везивање  $\text{Ca}^{2+}$  јона те је његова функција у процесу минерализације подробно испитивана.<sup>151</sup> Такође, претходна истраживања су показала да остеокалцин има улогу хормона у регулацији метаболизма глукозе, синтезе тестостерона, регулацији мишићне масе и масног ткива, регулацији možданог развоја, парасимпатичког тонуса.<sup>152-155</sup> Ипак, на основу истраживања на новијим линијама генетски модификованих мишева закључено је да је хормонална улога остеокалцина мало вероватна.<sup>151,156-158</sup> Велики број клиничких студија показао је позитивну корелацију између повећане физичке активности и нивоа некарбоксиланог остеокалцина у серуму што је у вези са регулацијом метаболизма глукозе и смањеним ризиком од кардиоваскуларних болести.<sup>159-163</sup> Остеокалцин је молекул делимично одговоран за регулацију минерализације органског матрикса и његова експресија може да служи као маркер правилног формирања минерализованог матрикса.<sup>164,165</sup> Дакле, својство композитног скафолда да индукује продукцију веће количине остеокалцина може бити индикатор убрзаног формирања минерализованог коштаног матрикса правилне тродиомензионалне структуре.<sup>166</sup> Ипак, главна улога остеокалцина у остеогенези лежи у регулацији квалитета новоформиране кости и јачине коштаног ткива јер омогућава правилно ређање кристала биолошког апатита паралелно са правцем пружања колагених влакана.<sup>151,157-159</sup> Карбоксилни

остеокалцин са високом афинитетом за везивање јона  $\text{Ca}^{2+}$  се налази у интерфибрилним и интрафибрилним регионима колагених влакана и везује молекуле биолошког апатита у уздужној осовини, док је распоред кристала апатита неправилан у случају његове дисфункције.<sup>158,159</sup> Правилан распоред кристала апатита је значајан фактор у одређивању јачине кости и Јунговог модела еластичности.<sup>157-159</sup> Колики је значај распореда кристала апатита према колагеним влакнима говори и чињеница да је овај распоред правилан и код коштаных обољења попут *osteogenesis imperfecta*, остеопетрозе, метастатског меланома као и коштане регенерације дугих костију.<sup>160,161</sup> Код *knock-out* остеокалцин мишева у поређењу са *wild-type* мишевима, нема разлике у коштаном маси, квалитету коштаног ткива, функције остеобласта и остеокласта, хистолошкој грађи трабекуларне и кортикалне кости, али постоје значајне разлике у распореду кристала апатита и значајно смањен Јунгов модул еластичности кости код *knock-out* мишева што потврђује функцију остеокалцина.<sup>157-159</sup> Такође, у случају недостатка витамина К поремећена је карбоксилација глутаминских киселина остеокалцина те је кост подложнија фрактурама.<sup>159</sup> Познато је да скафолди на бази хидроксиапатита индукују процес остеогенезе активацијом остеобласта и повећаном продукцијом остеокалцина.<sup>162,163</sup> Улога остеокалцина потврђена наведеним истраживањима потврђује хистолошке налазе ове докторске дисертације и уочене разлике у коштаном архитектоници превасходно у НАР/РЕИ групи.

Тема истраживања ове докторске дисертације била је експресија RANKL и OPG молекула са главном улогом у нормалном развоју костију и физиолошкој ремоделацији коштаног ткива.<sup>164</sup> RANKL/OPG систем регулише функције коштаных ћелија тако што контролише остеокластогенезу и коштани ремоделинг. У процесу енхондралне

осификације дугих костију остеокластна ресорпција је неопходна за обезбеђивање простора за пролиферацију хематопоеетских ћелија и диференцијацију остеобласта. Мишеви са дефицијенцијом гена за RANKL, RANK И NF-κB развијају остеопетрозу јер не долази до диференцијације остеокласта што доводи до задебљалих хипертрофичних зона хрскавице унутар зона раста костију.<sup>164</sup> Након завршетка раста, коштано ткиво током целог живота пролази кроз фазе ресорпције и остеогенезе, тј. кроз процес ремоделације у зависности од физиолошких стимулуса. RANKL/RANK/OPG сигнални систем је један од основних регулаторних механизма хомеостазе остеобластне и остеокластне функције.<sup>165,166</sup> Прекомерна RANKL експресија је основни патофизиолошки механизам настанка многих дегенеративних болести костију попут реуматоидног артритиса и псоријатичног артритиса.<sup>167</sup> У процесу остеокластогенезе RANKL протеин се ослобађа са мембране остеоцита, остеобласта, активисаних Т лимфоцита, синовијалних ћелија и везује за мембрански рецептор RANK преостеокласта, активира сигнални пут преко NF-κB за активацију NFATc1 и процес диференцијације остеокласта.<sup>168</sup> Овај процес активира и процес аутоамплификације сигнала деловањем проинфламаторних цитокина (TNF, IL-1) што може довести до патолошке ресорпције костију.<sup>168</sup> OPG је антагонист RANKL и његова експресија је обрнуто пропорционална експресији RANKL, тако да повишен RANKL/OPG однос иде у прилог остеокластогенезе.<sup>169,170-172</sup> Остеопротективна улога OPG код људи показана је хомозиготним парцијалним делецијама OPG гена пацијената са јувенилном Паџетовљевом болешћу, аутоимуном рецесивном болешћу праћеном појачаном ремоделацијом, остеопенијом и патолошким фрактурама.<sup>169</sup> Резултати овог истраживања нису показали статистички значајну разлику у експресији RANKL гена у испитиваним групама. Занимљив је резултат да је постојала статистички значајна разлика

унутар испитиваних група у погледу локализације дефекта. Наиме, већа експресија RANKL гена је забележена у моларним регијама у поређењу са регијама очњака и премолара за све испитиване материјале. Уочене разлике могле би се приписати регионалним специфичностима коштаног ткива и могле би бити теме других студија.

Релативна експресија OPG гена је била статистички значајно већа у HAP/PLGA и HAP/PEI групама у поређењу са Bio-Oss групом. RANKL/OPG однос у овом истраживању коришћен је да би се интерпретирао процес коштане ремоделације. RANKL/OPG однос је био статистички значајно већи у Bio-Oss групи него у HAP/PLGA и HAP/PEI групама. Овај резултат указује на предоминантну RANKL активност у Bio-Oss групи и израженију коштану ресорпцију. Са друге стране, нижи RANKL/OPG однос у HAP/PLGA и HAP/PEI групама указује на остеоцитну хомеостазу и регулисану коштану ремоделацију.<sup>172,173,174</sup>

# VI

# ЗАКЉУЧАК

## 6 ЗАКЉУЧАК

Испитивани коштани заменици НАР/PLGA, НАР/PEI и Bio-Oss индукују остеогенезу и репарацију коштаног дефекта у *in vivo* моделу дефекта критичне величине мандибуле свиња. Међутим, постоје значајне разлике у погледу квалитета коштаног ткива међу испитиваним материјалима. Примена композитних скафолда НАР/PLGA и НАР/PEI резултује значајно бољом репарацијом коштаног дефекта што је показано следећим резултатима:

1. Већа густина и минерализованост кости процењена СВСТ анализом новоформиране кости унутар коштаног дефекта након примене НАР/PLGA и НАР/PEI скафолда.
2. Хистолошким разликама новоформиране кости између испитиваних група - примена НАР/PLGA и НАР/PEI резултује формирањем нормалног коштаног ткива, правилне хистолошке структуре.
3. Већи број активних остеобласта који депонују коштани матрикс унутар коштаног дефекта након примене НАР/PLGA и НАР/PEI скафолда.
4. Већа депозиција колагена у остеоиду, правилне фибриларне структуре унутар коштаног дефекта након примене НАР/PLGA и НАР/PEI скафолда.
5. Већа експресија остеокалцина, главног неколагеног протеина кости одговорног за правилан распоред кристала апатита унутар коштаног дефекта након примене НАР/PLGA и НАР/PEI скафолда.
6. Нижи RANKL/OPG однос који иде у прилог физиолошке ремоделације унутар коштаног дефекта након примене НАР/PLGA и НАР/PEI скафолда.



# VII

# СКРАЋЕНИЦЕ

## 7 СКРАЋЕНИЦЕ

**ВМР** - Коштани морфогенетски протеин

**СВСТ** - Компјутеризована томографија конусног зрака

**DFDBA** - Деминерализирани суво смрзнути коштани трансплантат

**ЕСМ** - Екстрацелуларни матрикс

**FDDBA** - Минерализирани суво смрзнути коштани трансплантат

**НАР** - Хидроксиапатит

**КТИ** - Коштано - ткивно инжењерство

**PCL** - Поли-ε-капролактон

**PEI** - Полиетилен - имин

**PGA** - Полигликолична киселина

**PLA** - Полилактична киселина

**PLGA** - Поли (лактид- ко - гликолид)

**OPG** - Остеопротегерин

**RANK** - Рецепторски активатор за нуклеарни фактор κВ

**RANKL** - Рецепторски активатор за нуклеарни фактор κВ лиганд

**TGF β** - Трансформишући фактор раста β

# VIII

# ЛИТЕРАТУРА

## 8 ЛИТЕРАТУРА

1. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. Clin J Am Soc Nephrol. 2008;3(3):131-9.
2. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. Ann N Y Acad Sci. 2006;1092(1):385-96.
3. Prolo DJ. Biology of bone fusion. Clin Neurosurg. 1990;36:135-46.
4. Urist MR, Dawson E. Intertransverse process fusion with the aid of chemosterilized autolyzed antigen-extracted allogenic (AAA) bone. Clin Orthop Relat Res. 1981;154:97-113.
5. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists. 2006;235(1):176-90.
6. Trombelli L, Farina R, Marzola A, et al. Modeling and remodeling of human extraction sockets. J Clin Periodontol. 2008;35:630-9.
7. Chapekar MS. Tissue engineering: challenges and opportunities. J Biomed Mater Res 2000;53:617-20.
8. Jokanović V, Čolović S, Antonijević Dj, et al. Various methods of 3D and Bio-printing. Serb Dent J. 2017;64(1).
9. Kolk A, Handschel J, Drescher W, et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials: from space holders to innovative biomaterials. J Craniomaxillofac Surg. 2012;40:706-18.

10. Liu DM, Yang Q, Troczynski T, et al. Structural evolution of sol-gel-derived hydroxyapatite. *Biomaterials*. 2002;23:1679-87.
11. Kao ST, Scott DD. A review of bone substitutes. *Oral Maxillofacial Surg Clin N Am*. 2007;19:513-21.
12. Aghaloo TL, Moy PK. Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for implant placement? *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2007;22 Suppl:49-70.
13. Jung RE, Fenner N, Hämmerle CH, et al. Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12-14 years. *Clin Oral Implants Res*. 2013;24(10):1065-73.
14. Zizzari VL, Zara S, Tetè G, et al. Biologic and clinical aspects of integration of different bone substitutes in oral surgery: a literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016;122(4):392-402.
15. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005;36(3):s20-7.
16. Roseti L, Parisi V, Petretta M, et al. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;78:1246-62.
17. Campana V, Milano G, Pagano E, et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25(10):2445-61.
18. Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE. Scaffold design for bone regeneration. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014;14(1):15-56.
19. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*. 2001;10 Suppl 2:S96-101.

20. Xia L, Lin K, Jiang X, et al. Effect of nano-structured bioceramic surface on osteogenic differentiation of adipose derived stem cells. *Biomaterials*. 2014;35(30):8514-27.
21. Leong KW, Brott BC, Langer R. Bioerodible polyanhydrides as drug carrier matrices. I. Characterization, degradation, and release characteristics. *J Biomed Mater Res*. 1985;19:941-55.
22. Rizzi SC, Heath DJ, Coombes AG, et al. Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: surface analysis and initial attachment of human osteoblasts. *J Biomed Mater Res*. 2001;55(4):475-86.
23. Cheng K, Hirose M, Wang X, et al. Correlation between cell attachment areas after 2h of culture and osteogenic differentiation activity of rat mesenchymal stem cells on hydroxyapatite substrates with various surface properties. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;430(1):156-60.
24. Cestari TM, de Oliveira RC, Sanada JT, et al. Biocompatibility evaluation of a new bioresorbable pin for membrane fixation. *Braz Dent J*. 2010;21:482-90.
25. Ma PX. Scaffolds for tissue fabrication. *Mater Today*. 2004;7:30-40.
26. Ma PX. Tissue Engineering. In: Kroschwitz JI, editor. *Encyclopedia of polymer science and technology*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.; 2005:261-91.
27. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40(5):363-408.
28. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A. Current concerns regarding healing of bone defects. *Hard Tissue*. 2013;2(2):13-25.

29. Velasco MA, Narváez-Tovar CA, Garzón-Alvarado DA. Design, Materials, and Mechanobiology of Biodegradable Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomed Res Int.* 2015;2015:729076.
30. Leukers B, Gulkan HL, Irsen SH, et al. Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing. *J Mater Sci Mater Med.* 2005;16:1121-24.
31. Liu J, Kerns DG. Mechanisms of guided bone regeneration: a review. *Open Dent J.* 2014;8(Suppl 1-M3):56-65.
32. Jokanovic V, B. Jokanovic, D. Markovic, et al. Kinetics and sintering mechanisms of hydro-thermally obtained hydroxyapatite. *Materials Chemistry and Physics.* 2008;111(1):80-5.
33. Mitra J, Tripathi G, Sharma A, et al. Scaffolds for bone tissue engineering: role of surface patterning on osteoblast response. *RSC Advances.* 2013;3:11073-94.
34. Stevens MM, George JH. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science.* 2005;310(5751):1135-8.
35. Dimar JR, Glassman SD. The art of bone grafting. *Curr Opin Orthopaed.* 2007;18:226-33.
36. Iqbal M, Xu X, Li L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *J Mater Sci* 2009;44:5713-24.
37. Durucan C, Brown PW. Calcium-deficient hydroxyapatite-PLGA composites: mechanical and microstructural investigation. *J Biomed Mater Res* 2000;51:726-34.
38. Jokanović V, Čolović B, Marković D, et al. Extraordinary biological properties of a new calcium hydroxyapatite/poly(lactide-co-glycolide)-based scaffold confirmed by in vivo investigation. *Biomed Tech (Berl).* 2017;62(3):295-306.

39. Kang Y, Scully A, Young DA, et al. Enhanced mechanical performance and biological evaluation of a PLGA coated  $\beta$ -TCP composite scaffold for load-bearing applications. *Eur Polym J* 2011;47:1569-77.
40. Li J, Liao G, Long Z, et al. Study of PLGA microspheres loaded with pOsx/PEI nanoparticles for repairing bone defects in vivo and in vitro. *Adv Clin Exp Med*. 2020;29(4):431-40.
41. Liu J, Ye X, Wang H, M. et al. The influence of pH and temperature on the morphology of hydroxyapatite synthesized by hydrothermal method. *Ceramics International*. 2003;29:629-33.
42. Rodríguez-Lugo, J. Sanchez Hernández, M.J. Arellano-Jimenez, et al. Characterization of Hydroxyapatite by Electron Microscopy. *Micros. Microanal*. 2005;11:516-23.
43. Mann S: *Biomaterialization-Principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*. Oxford, University Press, 2001.
44. Ungureanu DN, Angelescu N, Bacinschi N, et al. Thermal stability of chemically precipitated hydroxyapatite nanopowders. *Int J Biol and Biomed*. 2011;52-64.
45. Pan H, Darvell BW. *Crystal Growth and Design*. 2010;10:845-50.
46. Albayrak O, El-Atwani O, Altintas S. Hydroxyapatite coating on titanium substrate by electrophoretic deposition method: Effects of titanium dioxide inner layer on adhesion strength and hydroxyapatite decomposition. *Surf Coat Technol*. 2008;202:2482-7.
47. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, et al. Biodegradable and Bioactive Porous Polymer/Inorganic Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials*. 2006;27:3413-31.



48. Bodhak S, Bose S, Bandyopadhyay A. Electrically polarized HAp-coated Ti: *In vitro* bone cell–material interactions. *Acta Biomaterialia*. 2010;6:641-51.
49. Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater*. 1995;29:389-401.
50. Webster TJ, Ergun CD, Siegel RW, et al. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials*. 2001;22:1327-33.
51. Shuai C, Nie Y, Gao C, et al. Structure and properties of nano-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering with a selective laser sintering system. *Nanotechnology. Electron J Biotechnol*. 2012;15:1-13.
52. Agrawal CM, Ray RB. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomed Mater*. 2001;55(2):141-50.
53. Ngiam M, Liao S, Patil AJ, et al. The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. *Bone*. 2009;45(1):4-16.
54. Arora T, Katti D. Surface hydrophilicity of PLGA fibers governs *in vitro* mineralization and osteogenic differentiation. *Mater Sci Eng C*. 2014;45:320-32.
55. Tovar N, Jimbo R, Gangolli R, et al. Evaluation of bone response to various anorganic bovine bone xenografts: an experimental calvaria defect study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014;43:251-60.
56. Ruffieux K, Kohli M, Benner KU. Principles/Material Science/Handling. In: Ruffieux, K. & Kohli, M., eds. *Bone Augmentation*, 1st edition, 36. Schlieren: DS Dental. 2010.

57. Park D, Haam S, Jang K, et al. Immobilization of starch-converting enzymes on surface-modified carriers using single and co-immobilized systems: properties and application to starch hydrolysis. *Process Biochem.* 2005;40:53-61.
58. Uhrich KE, Cannizzaro SM, Langer RS, et al. Polymeric systems for controlled drug release. *Chem Rev.* 1999;9:3181-98.
59. Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, et al. An overview of poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int J Mol Sci.* 2014;15(3):3640-59.
60. Bizenjima T, Takeuchi T, Seshima F, et al. Effect of poly (lactide-co-glycolide) (PLGA)-coated beta-tricalcium phosphate on the healing of rat calvarial bone defects: a comparative study with pure-phase beta-tricalcium phosphate. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(11):1360-7.
61. Micic M, Antonijevic D, Milutinovic-Smiljanic S, et al. Developing a novel resorptive hydroxyapatite-based bone substitute for over-critical size defect reconstruction: physicochemical and biological characterization and proof of concept in segmental rabbit's ulna reconstruction. *Biomed Eng.* 2020;65:4.
62. Yoshida T, Miyaji H, Otani K, et al. Bone augmentation using a highly porous PLGA/b-TCP scaffold containing fibroblast growth factor-2. *J Periodontal Res.* 2015;50:265-73.
63. Stevanovic M, Biocanin V, Nedic M, et al. Efficacy of nanocrystalline bone substitute BCP/PLGA for periodontal intrabony defects filling. *Vojnosanit Pregl.* 2015;72(8):689-95.
64. Verardi S, Lombardi T, Stacchi C. Clinical and radiographic evaluation of nanohydroxyapatite powder in combination with polylactic acid/polyglycolic acid

- copolymer as bone replacement graft in the surgical treatment of intrabony periodontal defects: A retrospective case series study. *Materials*. 2020;13:269.
65. Andersson MM, Hatti-Kaul R. Protein stabilising effect of polyethyleneimine. *J Biotechnol*. 1999;72:21-3.
66. Amara M, Kerdjoudj H. Modification of the cation exchange resin properties by impregnation in polyethyleneimine solutions: application to the separation of metallic ions. *Talanta*. 2003;60:991-1001.
67. Gao B, Wang X, Shen Y. Studies on characters of immobilizing penicillin G acylase on a novel composite support PEI/SiO<sub>2</sub>. *Biochem Eng J*. 2006;28:140-7.
68. Kircheis R, Kichler A, Wallner G, et al. Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther*. 1997;4:409-18.
69. Kuo YC, Ku IN. Application of Polyethyleneimine-Modified Scaffolds to the Regeneration of Cartilaginous Tissue. *Biotechnol Prog*. 2009;25:1459-67.
70. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, et al. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology*. 1998;139(2):663-70.
71. Linares A, Mardas M, Dard MM. Effect of immediate or delayed loading following immediate placement of implants with a modified surface. *Clin Oral Imp Res*. 2011;22(1):38-46.
72. Zambon R, Mardas N, Horvath A, et al. The effect of loading in regenerated bone in dehiscence defects following a combined approach of bone grafting and GBR. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(5):591-601.

73. Liebschner MA. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials*. 2004;25(9):1697-714.
74. 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(1):34-41.
75. Swindle MM, Smith AC, Goodrich JA. Chronic cannulation and fistulization procedures in swine: a review and recommendations. *J Invest Surg*. 1998;11(1):7-20.
76. Ma JL, Pan JL, Tan BS, et al. Determination of critical size defect of minipig mandible. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009;3(8):615-22.
77. Martiniakova M, Grosskopf B, Omelka R, et al. Differences among species in compact bone tissue microstructure of mammalian skeleton: use of a discriminant function analysis for species identification. *J Forensic Sci*. 2006;51(6):1235-9.
78. Martinez-Gonzalez JM, Cano-Sanchez J, Campo-Trapero J, et al. Evaluation of minipigs as an animal model for alveolar distraction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;99(1):11-6.
79. Buser D, Hoffmann B, Bernard JP, et al. 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(3):137-50.
80. Buser D, Broggini N, Wieland M, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res*. 2004;83(7):529-33.
81. Ghiasi MS, Chen J, Vaziri A, et al. Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. *Bone Rep*. 2017;6:87-100

82. Gil-Albarova J, Vila M, Badiola-Vargas J, et al. In vivo osteointegration of threedimensional crosslinked gelatin-coated hydroxyapatite foams. *Acta Biomater* 2012;8:3777-83.
83. Loncarevic S, Brajkovic D, Vukomanovic-Djurdjevic B, et al. Bilateral numb chin syndrome as a symptom of breast cancer metastasis in the mandible: a case report and discussion on the usefulness of cone-beam computed tomography to assess bone involvement in oral cancer. *Oral Radiol*. 2015;32(2):136-42.
84. Linz C, Muller-Richter UDA, Buck AK, et al. Performance of cone beam computed tomography in comparison to conventional imaging techniques for the detection of bone invasion in oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015;44:8-15.
85. Hakim SG, Wieker H, Trenkle T, et al. Imaging of mandible invasion by oral squamous cell carcinoma using computed tomography, cone-beam computed tomography and bone scintigraphy with SPECT. *Clin Oral Invest*. 2014;18:961-7.
86. Cardoso LB, Lopes IA, Ikuta CRS, et al. Study Between Panoramic Radiography and Cone Beam-Computed Tomography in the Diagnosis of Ameloblastoma, Odontogenic Keratocyst, and Dentigerous Cyst. *J Craniofac Surg*. 2020;31(6):1747-52.
87. Misch CE. Divisions of available bone in implant dentistry. *Int J Oral Implantol*. 1990;7(1):9-17.
88. Norton MR, Gamble C. Bone classification: an objective scale of bone density using the computerized tomography scan. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12(1):79-84.
89. Aranyarachkul P, Caruso J, Gantes B, et al. Bone density assessments of dental implant sites: 2. Quantitative cone-beam computerized tomography. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20:416-42.

90. Lagravère MO, Carey J, Ben-Zvi M, et al. Effect of object location on the density measurement and Hounsfield conversion in a NewTom 3G cone beam Computed tomography unit. *Dentomaxillofac Radiol.* 2008;37:305-8.
91. Lagravère MO, Fang Y, Carey J, et al. Density conversion factor determined using a cone-beam computed tomography unit NewTom QE-DVT 9000. *Dentomaxillofac Radiol.* 2006;35:407-9.
92. Mah P, Reeves TE, McDavid WD. Deriving Hounsfield units using grey levels in cone beam computed tomography. *Dentomaxillofac Radiol.* 2010;39:323-35.
93. Monje A, Monje F, González-García R, et al. Comparison between microcomputed tomography and cone-beam computed tomography radiologic bone to assess atrophic posterior maxilla density and microarchitecture. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(6):723-8.
94. Parsa A, Ibrahim N, Hassan B, et al. Bone quality evaluation at dental implant site using multislice CT, micro-CT, and cone beam CT. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(1):e1–e7.
95. Van Dessel J, Nicolielo LF, Huang Y, et al. Accuracy and reliability of different cone beam computed tomography (CBCT) devices for structural analysis of alveolar bone in comparison with multislice CT and micro-CT. *Eur J Oral Implantol.* 2017;10(1):95-105.
96. Wang J, Ishimoto T, Nakano T. Unloading-Induced Degradation of the Anisotropic 13 Arrangement of Collagen/Apatite in Rat Femurs. *Calcif Tissue Int.* 2017;100:87-94.
97. Cobo-Vázquez C, Reininger D, Molinero-Mourelle P, et al. Effect of the lack of primary stability in the survival of dental implants. *J Clin Exp Dent.* 2018;10(1):e14–e19.

98. Merheb J, Vercruyssen M, Coucke W, et al. Relationship of implant stability and bone density derived from computerized tomography images. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2018;20(1):50-7.
99. Marquezan M, Osório A, Sant'Anna E, et al. Does bone mineral density influence the primary stability of dental implants? A systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(7):767-74.
100. Goiato MC, dos Santos DM, Santiago JF Jr, et al. Longevity of dental implants in type IV bone: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014;43(9):1108-16.
101. Hutchinson EF, Farella M, Hoffman J, et al. Variations in bone density across the body of the immature human mandible. *J Anat.* 2017;230(5):679-88.
102. Iwanaga J, Shiromoto K, Kato T, et al. Anatomy of the mandibular canal and surrounding structures. Part II: Cancellous pattern of the mandible. *Ann Anat.* 2020;232:151583.
103. Di Stefano DA, Arosio P, Pagnutti S, et al. Distribution of Trabecular Bone Density in the Maxilla and Mandible. *Implant Dent.* 2019;28(4):340-8.
104. Lindh C, A Petersson, B Klinge, et al. Trabecular bone volume and bone mineral density in the mandible. *Dentomaxillofac Radiol.* 1997;26:2:101-6.
105. Lindh C, Petersson A, Rohlin M. Assessment of the trabecular pattern prior to endosseous implant treatment. Diagnostic outcome of periapical radiography in the mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996;82.
106. Park HS, Lee YJ, Jeong SH, et al. Density of the alveolar and basal bones of the maxilla and mandible. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;133:30-7.

107. Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. 2002.
108. Constantino PD, Freidman CD. Synthetic bone graft substitutes. *Otolaryngol Clin North Am*. 1994;27:1037-73.
109. Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg*. 1996;35:413-7.
110. Ignjatović N, Uskoković V, Ajduković Z, et al. Multifunctional hydroxyapatite and poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles for the local delivery of cholecalciferol. *Mater Sci Eng C*. 2013;33(2):943-50.
111. Zhao R, Yang X, Chen C, et al. The anti-tumor effect of p53 gene-loaded hydroxyapatite nanoparticles in vitro and in vivo. *J Nanopart Res*. 2014;16(4).
112. Whang K, Healy KE, Elenz DR, et al. Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture. *Tissue Engineering* 199;5(1):35-51.
113. Friedrich D. Die Behandlung von grossen parodontalen defekten mit einem b-TCP composite. *Dent Implantol*. 2009;13:258-66.
114. Kunert-Keil C, Schol F, Gedrange T, et al. Comparative study of biphasic calcium phosphate with beta-tricalcium phosphate in rat cranial defects – A molecular-biological and histological study. *Ann Anat*. 2015;199:7.
115. Schmidlin PR, Nicholls F, Kruse A, et al. Evaluation of moldable, in situ hardening calcium phosphate bone graft substitutes. *Clin Oral Implants Res*. 2011;24:149-57.



116. Maiorana C, Sommariva L, Brivio P, et al. Maxillary sinus augmentation with anorganic bovine bone (Bio-Oss) and autologous platelet-rich plasma: preliminary clinical and histologic evaluations. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2003;23(3):227-35.
117. Piattelli M, Favero GA, Scarano A, et al. 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;14:835-40.
118. Kong L, Mu Z, Zhang L, et al. Polyethyleneimine-stabilized hydroxyapatite nanoparticles modified with hyaluronic acid for targeted drug delivery. *RSC Adv*. 2016.
119. Kim KS, Kang YM, Lee JY, et al. Injectable CMC/PEI gel as an in vivo scaffold for demineralized bone matrix. *Biomed Mater Eng*. 2009;19(6):381-90.
120. Huang YC, Simmons C, Kaigler D. et al. Bone regeneration in a rat cranial defect with delivery of PEI-condensed plasmid DNA encoding for bone morphogenetic protein-4 (BMP-4). *Gene Ther*. 2005;12:418-26.
121. Huang YC, Connell M, Park Y, et al. Fabrication and in vitro testing of polymeric delivery system for condensed DNA. *J Biomed Mater Res A*. 2003;67(4):1384-92.
122. Pan Zhen, Ding Jiandong. Poly (lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Interface Focus*. 2014;2:366-77.
123. Mour M, Das D, Winkler T, et al. Advances in Porous Biomaterials for Dental and Orthopaedic Applications. *Materials*. 2010;3:2947-74.
124. Bonfield W. Designing porous scaffolds for tissue engineering. *Philos Trans A:Math Phys Eng Sci*. 2006;364:227-32.
125. Meng D, Dong L, Wen Y, et al. Effects of adding resorbable chitosan microspheres to calcium phosphate cements for bone regeneration. *Mater Sci Eng C*. 2015;47:266-72.

126. Miño-Fariña N, Muñoz-Guzón F, López-Peña M, et al. Quantitative analysis of the resorption and osteoconduction of a macroporous calcium phosphate bone cement for the repair of a critical size defect in the femoral condyle. *Vet J.* 2009;179:264-72.
127. Bojar W, Kucharska M, Ciach T, et al. Bone regeneration potential of the new chitosan-based alloplastic biomaterial. *J Biomater Appl.* 2014;28:1060-8.
128. Venkatasubbu GD, Ramasamy S, Avadhani GS, et al. Surface modification and paclitaxel drug delivery of folic acid modified polyethylene glycol functionalized hydroxyapatite nanoparticles. *Powder Technol.* 2013;235:437-42.
129. Wen SH, Zheng FY, Shen MW, et al. Synthesis of polyethyleneimine-stabilized gold nanoparticles for colorimetric sensing of heparin. *Colloids Surf A.* 2013;419:80-6.
130. Jiang T, Zhang Z, Zhang Y, et al. Dual-functional liposomes based on pH-responsive cell-penetrating peptide and hyaluronic acid for tumor-targeted anticancer drug delivery. *Biomaterials.* 2012;33(36):9246-58.
131. Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschleger ME, et al. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials.* 2009;30(12):2149-63.
132. Gutiérrez-Quintero JG, Durán Riveros JY, Martínez Valbuena CA, et al. Critical-sized mandibular defect reconstruction using human dental pulp stem cells in a xenograft model-clinical, radiological, and histological evaluation. *Oral Maxillofac Surg.* 2020;24(4):485-93.
133. Probst FA, Fliefel R, Burian E, et al. Bone regeneration of minipig mandibular defect by adipose derived mesenchymal stem cells seeded tri-calcium phosphate- poly (D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds. *Sci Rep.* 2020;10:2062.

134. Zhang B, Zhang PB, Wang ZL, et al. Tissue-engineered composite scaffold of poly (lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite nanoparticles seeded with autologous mesenchymal stem cells for bone regeneration. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2017;18:963-76.
135. Zhang P, Hong Z, Yu T, et al. In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly (lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly (L-lactide). *Biomaterials*. 2009;30:58-70.
136. Solakoglu O, Gotz W, Heydecke G, et al. Histological and immunohistochemical comparison of two different allogeneic bone grafting materials for alveolar ridge reconstruction: A prospective randomized trial in humans. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019;21(5):1002-16.
137. Song YD, Jun SH, Kwon JJ. Correlation between bone quality evaluated by cone-beam computerized tomography and implant primary stability. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24:59-64.
138. Adel-Khattab D, Afifi NS, Abu el Sadat SM, et al. Bone regeneration and graft material resorption in extraction sockets grafted with bioactive silica-calcium phosphate composite versus non-grafted sockets: clinical, radiographic, and histological findings. *J Periodontal Implant Sci*. 2020;50(6):418-34.
139. Patel A, Greenwell H, Hill M, et al. Ridge Augmentation Comparing an Allograft Plus Autogenous Bone Chips to an Osteoinductive Demineralized Bone Matrix, *Implant Dentistry* 2019;28(6):613-620
140. Kanemoto Y, Miyaji H, Nishida E, et al. Periodontal tissue engineering using an apatite/collagen scaffold obtained by a plasma- and precursor-assisted biomimetic process. *J Periodont Res*. 2022;57:205-18.

141. Weiyang Z, Lingjia Y, Haiyan Z, et al. Mineralized collagen scaffold bone graft accelerate the osteogenic process of HASCs in proper concentration. *Regen Ther.* 2021;8:161-7.
142. Markowicz M, Koellensperger E, Neuss S, et al. Enhancing the Vascularization of Three-Dimensional Scaffolds: New Strategies in Tissue Regeneration and Tissue Engineering. *Topics in Tissue Engineering.* 2005;2:1-15.
143. Zhu T, Jiang M, Zhang M, et al. Biofunctionalized composite scaffold to potentiate osteoconduction, angiogenesis, and favorable metabolic microenvironment for osteonecrosis therapy. *Bioact Mater.* 2022;9:446-60.
144. Santos MI, Reis RL. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromol Biosci.* 2010;10(1):12-27.
145. Kannan RY, Salacinski H, Sales K, et al. The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: a review. *Biomaterials.* 2005;26(14):1857-75.
146. Rouwkema J, Rivron N, van Blitterswijk CA. Vascularisation in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2008;26(8):434-41.
147. 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:443-9.
148. Niu Y, Wang L, Yu N, et al. An "all-in-one" scaffold targeting macrophages to direct endogenous bone repair in situ. *Acta Biomater.* 2020;111:153-69.
149. Otani T, Mizokami A, Kawakubo-Yasukochi T, et al. The roles of osteocalcin in lipid metabolism in adipose tissue and liver. *Adv Biol Regul.* 2020;78:100752.

150. Wang MO, Vorwald CE, Dreher ML, et al. Evaluating 3D-printed biomaterials as scaffolds for vascularized bone tissue engineering. *Adv Mater.* 2015;27(1):138-44.
151. Komori T. What is the function of osteocalcin? *J Oral Biosci.* 2020;62(3):223-7.
152. Berger JM, Singh P, Khrimian L, et al. Mediation of the Acute Stress Response by the Skeleton. *Cell Metab.* 2019;30:890-902.
153. Mera P, Laue K, Ferron M, et al. Osteocalcin Signaling in Myofibers Is Necessary and Sufficient for Optimum Adaptation to Exercise. *Cell Metab.* 2016;23:1078-92.
154. Oury F, Sumara G, Sumara O, et al. Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell.* 2011;144:796-809.
155. Oury F, Khrimian L, Denny CA, et al. Maternal and offspring pools of osteocalcin influence brain development and functions. *Cell.* 2013;155:228-41.
156. Diegel CR, Hann S, Ayturk UM, et al. An osteocalcin-deficient mouse strain without endocrine abnormalities. *PLoS Genet.* 2020;16:e1008361.
157. Komori T. Functions of Osteocalcin in Bone, Pancreas, Testis, and Muscle. *Int J Mol Sci.* 2020;21:7513.
158. Moriishi T, Ozasa R, Ishimoto T, et al. Osteocalcin is necessary for the alignment of apatite crystallites, but not glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass. *PLoS Genet.* 2020;16(5):e1008586.
159. Moriishi T, Komori T. Lack of reproducibility in osteocalcin-deficient mice. *PLoS Genet.* 2020;16:e1008939.
160. De Bruin ML, Westberg-Rasmussen S, Lykkeboe S, et al. Glucose Tolerance Tests and Osteocalcin Responses in Healthy People. *Front Endocrinol.* 2018;9:356.

161. Giudici KVP, Fisberg RM, Marchioni DML, et al. Crosstalk Between Bone and Fat Tissue: Associations Between Vitamin D, Osteocalcin, Adipokines, and Markers of Glucose Metabolism Among Adolescents. *J Am Coll Nutr.* 2017;36:273-80.
162. Ishimoto T, Sato B, Lee JW, et al. Co-deteriorations of anisotropic extracellular matrix arrangement and intrinsic mechanical property in c-src deficient osteopetrotic mouse femur. *Bone.* 2017;103:216-23.
163. Ishimoto T, Nakano T, Umakoshi Y, et al. Degree of biological apatite c-axis orientation rather than bone mineral density controls mechanical function in bone regenerated using recombinant bone morphogenetic protein-2. *J Bone Miner Res.* 2013;28:1170-9.
164. Vasconcelos RC, Ferreira C, de Araújo EM, et al. Zirconia/hydroxyapatite (80/20) scaffold repair in critical size calvarial defect increased FGF-2, osteocalcin and OPG immunostaining and IL-10 levels. *Am J Transl Res.* 2020;12(6):2439-50.
165. Yogo K, Ishida-Kitagawa N, Takeya T. Negative autoregulation of RANKL and c-Src signaling in osteoclasts. *J Bone Miner Metab.* 2007;25(4):205-10.
166. Zhu H, Yang F, Tang B, et al. Mesenchymal stem cells attenuated PLGA-induced inflammatory responses by inhibiting host DC maturation and function. *Biomaterials.* 2015;53:688-98.
167. Dworetzky SI, Fey EG, Penman S, et al. Progressive changes in the protein composition of the nuclear matrix during rat osteoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:4605.
168. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473(2):139–146.

169. Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, et al. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med.* 2002;347:175-84.
170. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand and Osteoprotegerin Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease. *Endocr Rev.* 2008;29(2):1155-92.
171. Tetè S, Vinci R, Zizzari VL, et al. Maxillary sinus augmentation procedures through equine-derived biomaterial or calvaria autologous bone: immunohistochemical evaluation of OPG/RANKL in humans. *Eur J Histochem.* 2013; 57:e10.
172. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, et al. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15:457-75.
173. Oliveira MC, Pieters BCH, Guimarães PB, et al. Bovine Milk Extracellular Vesicles Are Osteoprotective by Increasing Osteocyte Numbers and Targeting RANKL/OPG System in Experimental Models of Bone Loss. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* 2020.
174. Tabaković S, Krasić D. Komparativna analiza tretmana blow-out fraktura poda orbite intraoralnim koštanim graftovima. Magistarska teza. Oktobar 2007.