

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Barbara Franović

**UTJECAJ DENTALNOG BIOFILMA
POLITETRAFLUORETILENSKIH MEMBRANA VELIKE
GUSTOĆE NA ISHOD KOŠTANE REGENERACIJE
TIJEKOM POSTUPKA OČUVANJA ALVEOLE**

Doktorski rad

Rijeka, 2026.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Barbara Franović

**UTJECAJ DENTALNOG BIOFILMA
POLITETRAFLUORETILENSKIH MEMBRANAVELIKE
GUSTOĆE NA ISHOD KOŠTANE REGENERACIJE
TIJEKOM POSTUPKA OČUVANJA ALVEOLE**

Doktorski rad

Mentor: prof. dr. sc. Olga Cvijanović Peloza, dr.med.

Rijeka, 2026.

UNIVERSITY OF RIJEKA

FACULTY OF MEDICINE

Barbara Franović

**THE INFLUENCE OF DENTAL BIOFILM ON HIGH-
DENSITY POLYTETRAFLUOROETHYLENE MEMBRANES
ON THE OUTCOME OF BONE REGENERATION DURING
ALVEOLAR SOCKET PRESERVATION**

Docthoral thesis

Mentor: Olga Cvijanović Peloza, Full professor, MD, PhD

Rijeka, 2026.

Mentor rada: prof. dr. sc. Olga Cvijanović Peloza, dr. med.

Doktorski rad obranjen je dana _____ u/na _____,
_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____

Rad ima _____ listova

UDK: _____

PREDGOVOR

Istraživanje ovog doktorskog rada provedeno je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, na Zavodu za anatomiju te na Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju od 2021. do 2025. godine u sklopu projekta „Usporedba reparacijskog odgovora koštanog tkiva upotrebom dentina, ksenogenog biomaterijala i autologne kosti“ (IP-2020-02-7875) koji je financirala Hrvatska zaklada za znanost. Također, dio ovog istraživanja proveden je u suradnji s Klinikom za dentalnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Rijeka, Poliklinikom „Dr. Blašković“ u Rijeci te Poliklinikom RIDENT u Rijeci.

Ovim putem htjela bih zahvaliti svojoj mentorici prof. dr. sc. Olgi Cvijanović Pelози, dr. med. na stručnoj podršci, trudu i strpljenju koje mi je pružila tijekom ovog istraživanja. Velika hvala i svim suradnicama i kolegama iz svih ustanova koji su bili uključeni u ovo istraživanje.

Veliku zahvalnost dugujem svojoj obitelji i prijateljima koji su me podržavali i motivirali tijekom cijelog procesa istraživanja. Hvala im na bezuvjetnoj podršci, snazi i razumijevanju koje su mi pružili u najzahtjevnijim trenucima.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj ovog randomiziranog kliničkog istraživanja bio je analizirati broj i vrstu bakterija u dentalnom biofilmu membrana Cytoplast™ i Permamem® te ispitati povezanost bakterijskih vrsta s količinom novostvorene kosti i rezidualnog biomaterijala. **Materijal i metode:** U istraživanje bilo je uključeno 48 sudionika, s 48 mjesta ekstrakcije podijeljenih u dvije skupine. U svih sudionika, obje skupine provedena je procedura očuvanja alveole ugradnjom kompozitnih koštanih transplantata (50% autogena kost, 50% goveđi ksenograft) koji su prekriveni membranama. Membrane su uklonjene nakon četiri tjedna te su analizirane metodom SEM, RT-qPCR-om, CFU/ml za aerobne, obvezne anaerobne te bakterije iz roda *Streptococcus*. Dodatno je učinjeno NGS kako bi se analiziralo mikrobnu raznolikost i sastav biofilma. Dimenzije alveolarnog grebena praćene su analizom CBCT-a prije i nakon zahvata, a novostvorena kost i rezidualni biomaterijal analizirani su histomorfometrijom. **Rezultati:** Četverotjedno razdoblje cijeljenja proteklo je bez komplikacija u obje skupine. Analizom biofilma utvrđeno je da na membranama Cytoplast nastaje gušći izvanstanični matriks, mada kvantifikacijom bakterijskih vrsta nije dobivena statistički značajna razlika između ispitivanih skupina. CFU/ml je pokazano da postoji statistički znatno veći broj bakterija u sve četiri praćene kategorije na membrani Cytoplast. Uočeno je da postoji smanjena raznolikost i povećana količina patobionta (*Selenomonas*, *Segatalla*, *Fusobacterium*, *Parvimonas*) na Cytoplastu, dok su membrane Permamem bile više kolonizirane bakterijama povezanim sa zdravljem (*Streptococcus*, *Kingella*, *Corynebacterium*). Metodama histomorfometrije i CBCT-a nisu pronađene statistički značajne razlike između dvije skupine membrana. **Zaključak:** Vrste membrane koje se koriste za sprečavanje infekcije i kompromitacije cijeljenja alveolarne kosti utječu na sastav biofilma i mikrobnu raznolikost. Rezultati provedenog istraživanja mogu sugerirati smjernice o njihovoj upotrebi s obzirom na rizik od infekcije u ležištu zubnog implantata. Ovo istraživanje pokazalo je da membrane Cytoplast stvaraju specifičnu vrstu biofilma, zbog čega se smanjuje broj bakterijskih vrsta povezanih sa zdravljem i olakšavaju uvjeti rasta za promjenu disbioze.

Ključne riječi: biofilm; ekstrakcija zuba; PTFE; regeneracija kosti

SUMMARY

Objective: The aim of this randomized clinical trial was to analyze the number and type of bacteria in the dental biofilm on Cytoplast™ and Permamem® membrane and to examine the association of bacterial species with the amount of newly formed bone and residual biomaterial.

Material and methods: 48 participants were included in the study, with 48 extraction sites divided into two groups. In all patients, both groups, the alveolar preservation procedure was performed by implanting composite bone grafts (50% autogenous bone, 50% bovine xenograft) covered with membrane. The membranes were removed after four weeks and were analyzed by SEM method, RT-qPCR, and CFU/ml for aerobic, obligate anaerobes and bacteria from the genus *Streptococcus*. In addition, NGS was performed to analyze the microbial diversity and biofilm composition. The dimensions of the alveolar ridge were monitored by CBCT analysis before and after the procedure, and the newly formed bone and residual biomaterial were analyzed by histomorphometry. **Results:** The four-week healing period went without complications in both groups. Biofilm analysis revealed that a denser extracellular matrix is formed on Cytoplast membranes, although the quantification of bacterial species did not reveal a statistically significant difference between the examined groups. Additionally, it was shown that there is a statistically significantly higher number of bacteria in all four monitored categories on Cytoplast membrane. It was observed that there is a reduced diversity and increased amount of pathobiont (*Selenomonas*, *Segatalla*, *Fusobacterium*, *Parvimonas*) on Cytoplast membranes, while Permamem membranes were more colonized by bacteria associated with oral health (*Streptococcus*, *Kingella*, *Corynebacterium*). Histomorphometry and CBCT methods find no statistically significant differences between the Permamem® group and the Cytoplast™ group. **Conclusion:** The type of membrane used to prevent infection and compromise alveolar bone healing affects biofilm composition and microbial diversity. The results of this research suggest guidelines on their use with regard to the risk of infection in the dental implant bed. This research has shown that Cytoplast membranes form a specific type of biofilm, which leads to the reduction of health-related bacterial species and facilitates the conditions for changing dysbiosis.

Keywords: biofilm; bone regeneration; PTFE; tooth extraction

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. Koštano tkivo	1
1.2. Vrste koštanog tkiva	1
1.3. Stanice koštanog tkiva	2
1.3.1. Osteociti	3
1.3.2. Osteoblasti	4
1.3.3. Rubne stanice	6
1.3.4. Osteoklasti	6
1.4. Međustanična tvar koštanog tkiva	8
1.4.1. Anorganski (mineralni) sadržaj koštanog matriksa	8
1.4.2. Organski sadržaj koštanog matriksa	9
1.5. Fiziološki procesi stvaranja i održavanja koštanog tkiva	11
1.6. Augmentacija alveolarnog grebena	13
1.7. Vođena regeneracija kosti	14
1.8. Koštani nadomjesni materijali	16
1.8.1. Autologna kost (autografti)	16
1.8.2. Ksenografti	17
1.8.3. Alografti	18
1.8.4. Sintetski materijal – aloplasti	19
1.9. Biološki mehanizam cijeljenja	20
1.10. Barijerne membrane	22
1.10.1. Resorptivne membrane	22
1.10.2. Kolagene membrane	23
1.10.3. Sintetske polimerne membrane	23
1.10.4. Neresorptivne barijerne membrane	24
1.11. Oralni mikrobiom	26
1.12. Dentalni biofilm	29
1.12.1. Stvaranje biofilma	29

1.13. Bakterijske interakcije tijekom stvaranja biofilma	31
1.14. Periimplantantne bolesti.....	32
1.15. Mikrobiom periimplantitisa.....	32
1.16. Mikrobiom parodontitisa	33
1.17. Parodontni patogeni	33
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	36
3. MATERIJAL I METODE RADA.....	37
3.1. Ispitanici istraživanja	37
3.2. Etički aspekti istraživanja.....	38
3.3. Veličine uzorka	38
3.4. Standardni kirurški protokol očuvanja alveole.....	39
3.5. METODE ISTRAŽIVANJA.....	42
3.5.1. Kompjuterizirana tomografija s konusnim snopom (engl. cone beam computed tomography, CBCT).....	42
3.5.2. Određivanje ukupnog broja bakterija	42
3.5.3. Ekstrakcija nukleinskih kiselina DNK	43
3.5.4. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. real-time quantitative, RT-qPCR)	45
3.5.5 Histološka bojenja	48
3.5.6. Koštana histomorfometrija	48
3.5.7. Skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. scanning electron microscopy, SEM).....	49
3.5.8. Sekvencioniranje nove generacije (engl. next-generation sequencing technology, NGS)..	50
3.6. Statistička obrada podataka	51
4. REZULTATI	52
4.1. Koštana histomorfometrija	52
4.2. Kompjuterizirana tomografija s konusnim snopom (engl. Cone beam computed tomography, CBCT)	53
4.3. Histološko bojenje hematoksilin-eozinom	53
4.4. Kvantitativna reakcija lančanom polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR), broj bakterija (CFU/ml) i sekvencioniranje sljedeće generacije (NGS)	55

4.4.1. Kvantitativna reakcija lančanom polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR)	55
4.5. Broj bakterija (CFU/ml).....	57
4.6. Sekvencioniranje sljedeće generacije (engl. next-generation sequencing technology, NGS) ...	62
4.7. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	84
5. RASPRAVA	87
6. ZAKLJUČCI.....	95
7. LITERATURA.....	96
ILUSTRACIJE	116
Popis slika	116
Popis tablica	118
Popis pokrata.....	119
ŽIVOTOPIS.....	121

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Koštano tkivo

Koštano tkivo mineralizirano je vezivno tkivo čija je glavna zadaća mehanička potpora tijela, a uz to sudjeluje u održavanju metaboličke ravnoteže minerala, skladište je činitelja rasta te specifičan mikrokoliš koji omogućuje proces stvaranja krvnih stanica, odnosno hematopoezu [1]. Ovo je tkivo, zbog svoje iznimno velike čvrstoće i elastičnosti, otporno na različite mehaničke sile [2].

Struktura koštanog tkiva izrazito je učinkovita s obzirom na to da postiže optimalnu funkcionalnost uz minimalnu količinu materijala, što je u skladu s Rouxovim zakonom o ekonomičnosti građe. Koštano tkivo sastoji se od stanica i izrazito velike količine međustanične tvari koja čini 90% njegova ukupnog volumena i jedino je tkivo čija je međustanična tvar mineralizirana [3].

1.2. Vrste koštanog tkiva

Tijekom rasta i razvoja te zrelog doba života jedinke, a s obzirom na raspored i specifični sastav međustanične tvari, koštano tkivo može se podijeliti na: nezrelo i zrelo koštano tkivo. Nezrelo koštano tkivo ili isprepleteno koštano tkivo karakteriziraju nepravilna kolagena vlakna različitih debljina i smjerova te veća gustoća stanica. Nezrelo koštano tkivo gradi skelet nezrelih organizama dok još nije postignuta koštana zrelost, a ostaje i nakon rasta i razvoja skeleta u zubnom cementu, šavovima lubanje, koštanom labirintu i područjima insercija tetiva na kost u odraslih organizama. Zrelo koštano tkivo ili lamelarno koštano tkivo pokazuje pravilan raspored međustanične tvari i stanica. Osteociti su smješteni u šupljinama koje su međusobno povezane kanalićima. Unutar kanalića nalaze se citoplazmatski izdanci osteocita.

Zrelo koštano tkivo može se podijeliti na: kompaktno koštano tkivo i spongiozno koštano tkivo. S obzirom na to da se kompaktna koštana tvar nalazi na površini kosti, naziva se još i kortikalna kost. Jedinstvena je zbog svoje čvrste i solidne strukture bez šupljina ispunjenih koštanom srži. Kompaktna koštana tvar u trupu dugih kosti organizirana je u četiri sustava lamela. Rubne lamele čine osnovni sustav lamela i nalaze se neposredno na površini kosti. Između unutrašnjih i vanjskih rubnih lamela nalaze se Haversove lamele. One okružuju Haversove kanale kroz koje prolaze krvne žile. Haversove kanale međusobno povezuju Volkmannovi kanali koji također sadrže krvne žile i živčana vlakna. Osteon predstavlja osnovnu morfološku jedinicu kompaktne koštane tvari. Sastoji se od Haversova kanala u središtu kojeg su koncentrično raspoređene lamele koštane tvari. Na svakom kvadratnom milimetru poprečnog presjeka kompaktne koštane tvari nalazi se od 3 do 15 Haversovih kanala, ovisno o specifičnim biomehaničkim zahtjevima tog područja. Također, unutar sustava lamela nalaze se i najmanje intersticijske lamele [4]. Spongiozno koštano tkivo karakteristično je po svojoj poroznoj građi. Sastoji se od koštanih gredica različitih dimenzija koje su položene u smjeru djelovanja sila tlaka i vlakna na kost. Takav raspored omogućuje otpornost na mehanička opterećenja.

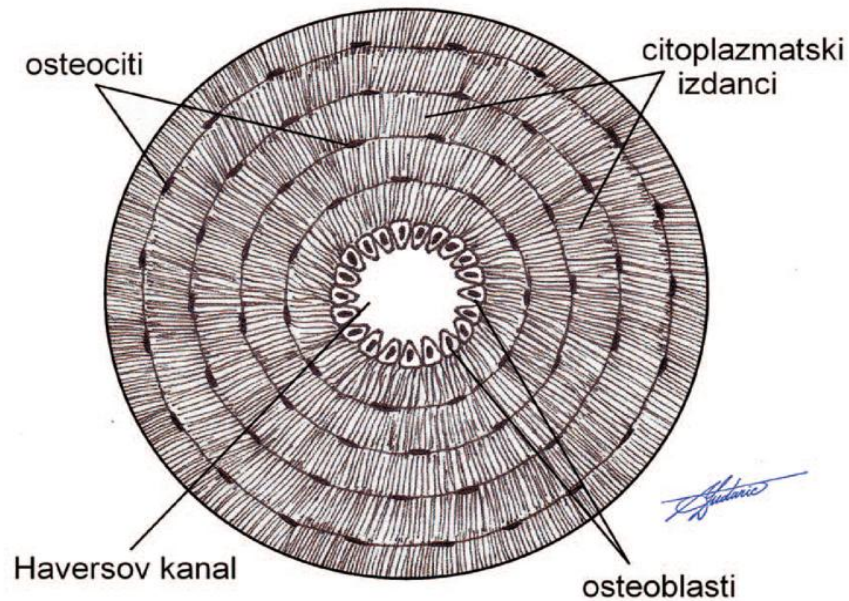
1.3. Stanice koštanog tkiva

Koštano tkivo sastoji se od četiriju vrsta stanica koje čine približno 10% ukupnog volumena kosti: osteociti, osteoblasti, rubne (engl. *lining*) stanice te osteoklasti [5]. Osteoblasti, osteociti i rubne stanice potječu iz mezenhimalnih matičnih stanica, a osteoklasti nastaju iz hematopoetskih stanica monocitno-makrofagne linije [6].

1.3.1. Osteociti

Osteociti se svrstavaju u najbrojnije stanice koštanog tkiva i čine 95% svih stanica koštanog tkiva te su do deset puta brojnije od osteoblasta. Stanice su zvjezdolikog oblika, veličine 5-20 μm te sadrže pedesetak dendritičkih izdanaka citoplazme [7,8]. Ubrajaju se u višenamjenske stanice koje reguliraju koštanu i mineralnu homeostazu i aktivnost osteoblasta i osteoklasta te se smatraju mehanosenzornim stanicama čija je zadaća prilagoditi koštani sustav na mehaničko opterećenje. Nastaju ukopavanjem osteoblasta u koštani matriks koji su odložili u svoju međustaničnu tvar, tj. okolinu. Time mijenjaju svoje morfološke karakteristike (smanji se broj staničnih organela) i aktivnosti. Osteociti su terminalno diferencirane stanice koje se mogu i dediferencirati, što je važno pri cijeljenju fraktura, odnosno regeneracije kosti [9]. Godišnje se izgubi oko 4-10% osteocita fiziološkom pregradnjom kosti [10]. Citoplazma osteocita boji se bazofilno, a jezgra je slabo uočljiva kao i mitotička aktivnost. Iz trupa osteocita izlazi pedesetak izdanaka citoplazme koji se pružaju radijalno u svim pravcima [11]. Trup osteocita smješten je u koštanoj šupljini međustanične tvari, dok se pedesetak citoplazmatskih izdanaka pojedinog osteocita radijalno nastavlja u različitim pravcima. Osteociti se povezuju i s osteogenim stanicama periosta i endosta, osteoblastima te osteoklastima koštane gredice. Time su stanice koštanog tkiva dobro povezane te takva umreženost asocira na međusobnu umreženost neurona [12,13]. Osteociti, smješteni unutar koštanog matriksa, povezani su s površinom kosti putem mreže citoplazmatskih izdanaka koji prolaze kroz koštane kanaliće. Ti kanalići omogućuju komunikaciju između osteocita i drugih stanica te izmjenu hranjivih tvari. Struktura lakuna i kanalića u kojima se nalaze citoplazmatski izdanci osteocita ključna je za njihovu mehanoreceptivnu funkciju [5]. Osteociti detektiraju mikrooštećenja u koštanom tkivu, što pokreće proces apoptoze oštećenih stanica. Taj proces signalizira potrebu za regeneraciju tkiva, pri čemu osteociti reguliraju aktivnost osteoklasta i osteoblasta [13]. Njihova sposobnost prilagodbe na mehaničke promjene omogućuje remodeliranje kosti, čime se osigurava optimalna struktura i funkcija koštanog sustava [14]. Osteociti su metabolički aktivne stanice koštanog tkiva koje imaju sposobnost produkcije i secerniranja određenih za koštano tkivo specifičnih molekula međustanične tvari te enzima koji sudjeluju u mineralizaciji koštanog matriksa. Specifično izražavanje membranske molekule E11/gp38 imaju mlađi osteociti koji sudjeluju u formiranju citoplazmatskih izdanaka, a stariji osteociti manifestiraju Sost/sclerostin [15]. Osteociti izražavaju receptor za karboksilni kraj paratireoidnog hormona (engl.

parathyroid hormone; PTH) čija je uloga važna u unutarstaničnom prijenosu signala te u proapoptotičkoj aktivnosti [8,16].

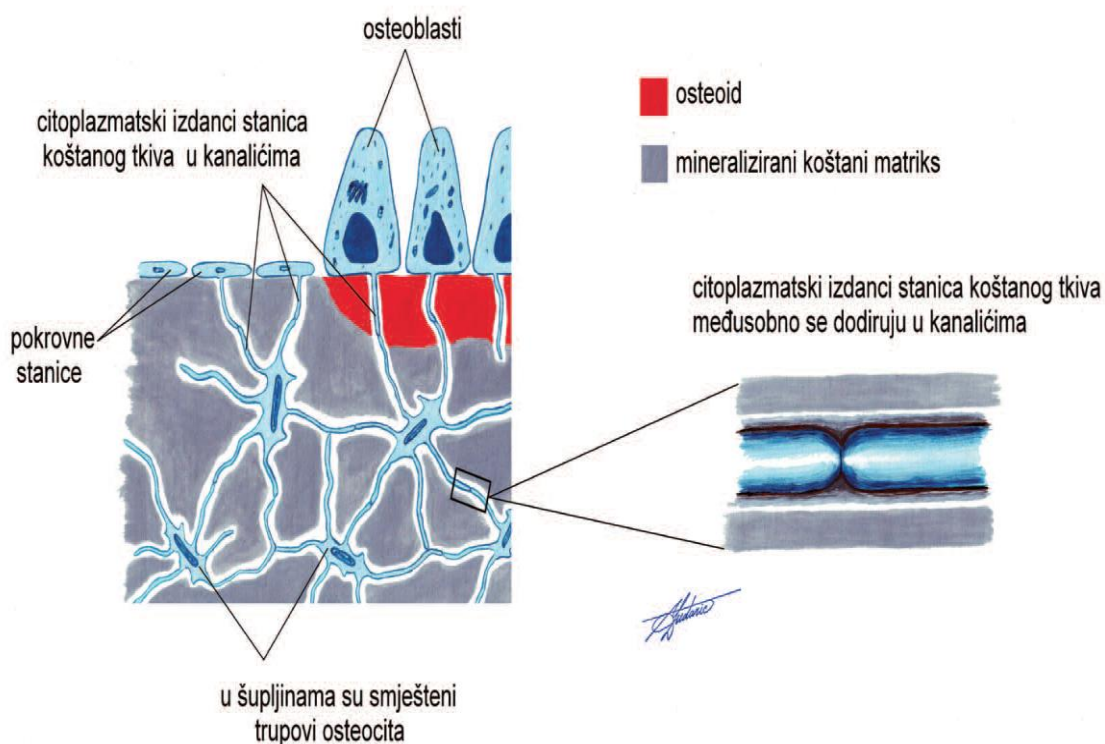


Slika 1. Shematski presjek kroz Haversov osteon građen od 5 koštanih lamela

1.3.2. Osteoblasti

Osteoblasti su velike koštane stanice 20-30 μm , kuboidnog oblika, koje čine 4-6% svih koštanih stanica čija je zadaća proizvoditi, odlagati i mineralizirati koštani matriks. Osteoblasti su smješteni u jednom nizu na površini koštanih gredica pri čemu njihovi citoplazmatski izdanci migriraju u novostvoreni osteoid te mogu dodirivati citoplazmatske izdanke osteocita unutar koštanog kanalića [17]. Citoplazma je ispunjena hrapavim endoplazmatskim retikulom s izraženim Golgijevim aparatom te im je jezgra jajolikog oblika [18]. Strukturni protein koji je

zaslužan za elastičnost i čvrstoću koštanog tkiva je kolagen tipa I. On je važan i za sintezu koštane tvari. Osteoblasti su stanice koje nastaju iz pluripotentnih mezenhimalnih stanica i prisutni su u odraslih organizama u strukturama poput periosta, endosta, perihondrija, krvi i sinovijalne membrane. Te stanice intenzivno komuniciraju s drugim stanicama koštanog tkiva. Terminalno diferencirane stanice koštanog tkiva predstavljaju osteociti, koji diferenciraju iz osteoblasta [19]. Specifični markeri zrelih osteoblasta su osteokalcin, koštani sijaloproteini, receptori za PTH, inzulinu sličan činitelj rasta, integrini i drugi. Osteoblasti, s drugim stanicama koštanog tkiva, tvore osnovnu morfološku i funkcionalnu jedinicu poznatu kao osnovna višestanična jedinica (engl. *basic multicellular unit*, BMU), koja ima ključnu ulogu u održavanju homeostaze koštanog tkiva [20,21].



Slika 2. Međusobna povezanost stanica u koštanom tkivu citoplazmatskim izdancima

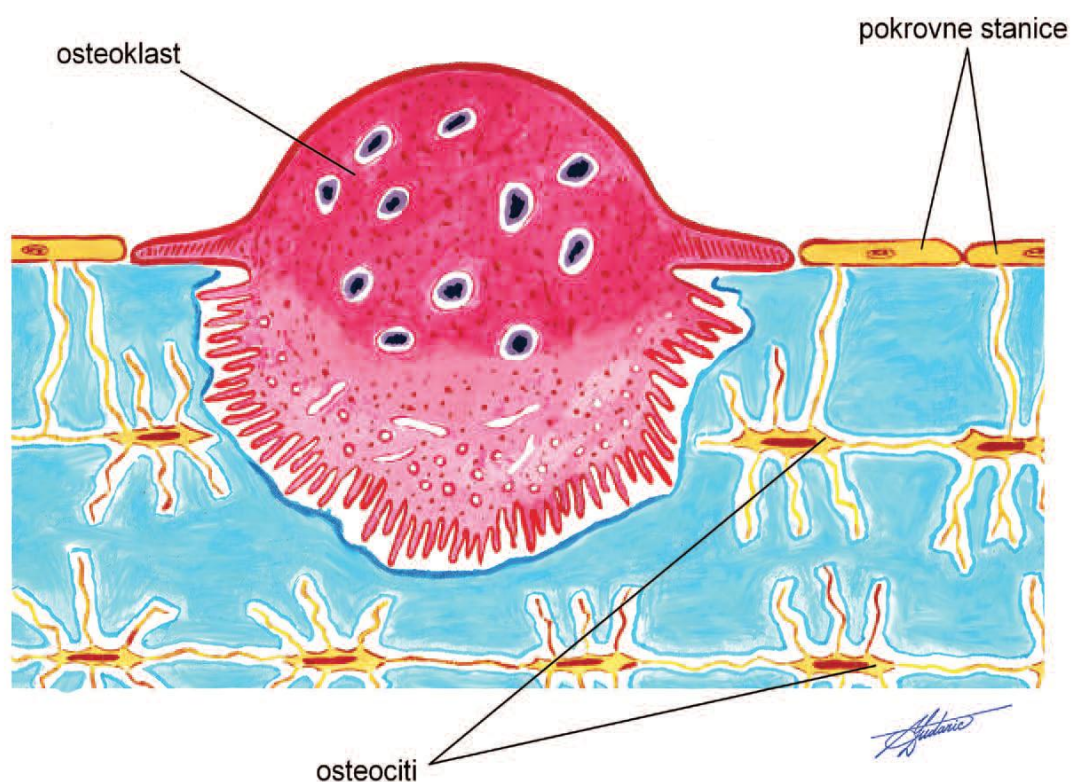
1.3.3. Rubne stanice

Rubne stanice ili „*lining*“ stanice neaktivni su osteoblasti ravnog oblika koji prekrivaju površinu kosti, gdje ne dolazi ni do resorpcije kosti kao ni do stvaranja kosti [1]. Ove stanice pokazuju tanak i ravan nuklearni profil; njihova citoplazma proteže se duž površine kosti i prikazuje malo citoplazmatskih organela poput profila hrapavog endoplazmatskog retikuluma i Golgijeva aparata [22]. Neke od tih stanica pokazuju nastavke koji se protežu u kanalikule, a uočeni su i spojevi između susjednih pokrovnih stanica i između tih stanica i osteocita. Sekretorna aktivnost stanica obloge kosti ovisi o fiziološkom statusu kosti, pri čemu te stanice mogu ponovno steći sekretornu aktivnost, povećavajući svoju veličinu i poprimajući kuboidni izgled. Funkcije rubnih stanica nisu potpuno razjašnjene, ali je pokazano da te stanice sprečavaju izravnu interakciju između osteoklasta i koštane matrice, kada ne bi trebalo doći do resorpcije kosti, a također sudjeluju u diferencijaciji osteoklasta, proizvodeći osteoprotegerin (engl. *osteoprotegerin*; OPG) i ligand aktivatora receptora nuklearnog faktora kappa-B (engl. *receptor activator of nuclear factor*, RANKL - κB ligand). Štoviše, rubne stanice, s drugim koštanim stanicama, važna su komponenta osnovne višestanične jedinice BMU-a, anatomske strukture koja je prisutna tijekom ciklusa pregradnje kosti [6,23].

1.3.4. Osteoklasti

Osteoklasti su multinuklearne stanice veličine 150-200 μm koje potječu iz hematopoetskih progenitornih stanica monocitno-makrofagnog sustava [1]. Njihova je primarna funkcija resorpcija kosti, proces koji uključuje razgradnju mineralne i organske komponente koštanog matriksa. Taj je proces neophodan za održavanje homeostaze kosti, uklanjanje oštećenog ili starog koštanog tkiva i stvaranje prostora za novoformiranu kost [24,25]. Diferencijacija osteoklasta regulirana je osteocitima humoralnim putem, posredovanim estrogenom te transformirajućim čimbenicima rasta tipa β (engl. *transforming growth factor β*) [26]. Mehanizmi koji određuju volumen kosti namijenjen resorpciji osteoklastima i način na koji se taj proces zaustavlja nakon što je određena količina kosti razgrađena, još nisu u potpuno razjašnjeni. Međutim, poznato je da osteoklasti fagocitiraju apoptotične osteocite, koji

predstavljaju rani signal za pokretanje lokalnog remodeliranja kosti. Njihovo uklanjanje istodobno dovodi do prestanka signala koji potiče ovaj proces. Kada organizmu nedostaje kalcija u krvi, pojača se aktivnost osteoklasta u odnosu na uobičajenu funkciju tijekom procesa remodeliranja [27,28].



Slika 3. Shematski prikaz osteoklasta u Howshipovoj lakuni

1.4. Međustanična tvar koštanog tkiva

Međustanična tvar koštanog tkiva sastoji se od anorganskih i organskih komponenti te vode. Najveći dio čini anorganski (mineralni) sadržaj što čini 50-70% ukupnog sastava, 30-40% čini organski dio, dok preostali dio čini voda [29].

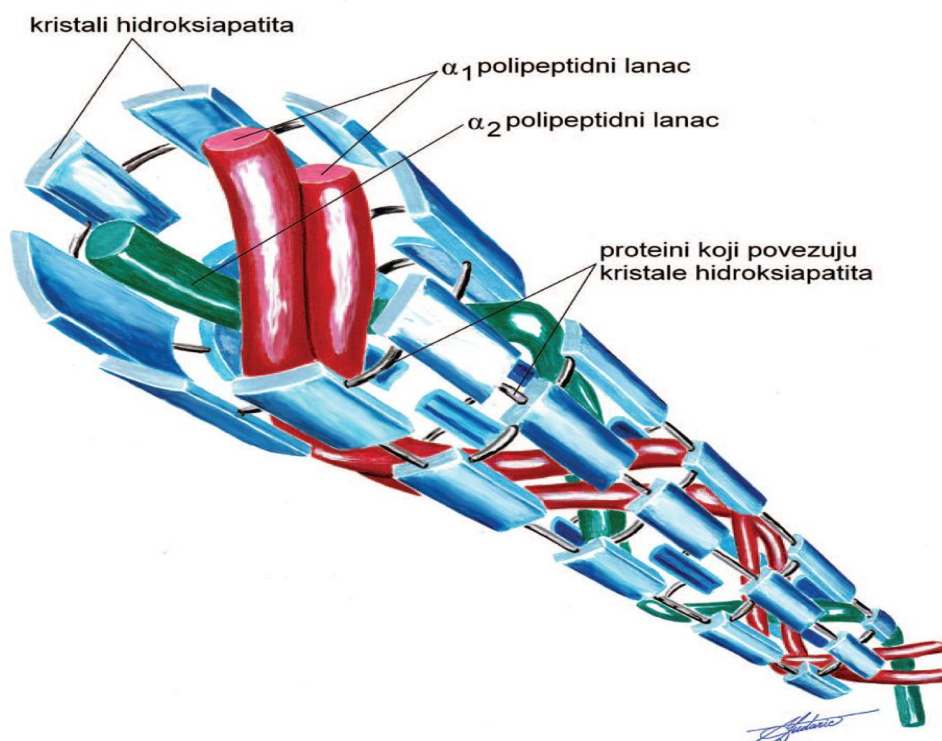
1.4.1. Anorganski (mineralni) sadržaj koštanog matriksa

Anorgansku komponentu ponajprije čine minerali kalcija i fosfata. Kristali hidroksiapatita (engl. *hydroxyapatite*; HAP), koji su građeni od kalcijeva fosfata, čine 95% mineralnog sadržaja i predstavljaju najzastupljeniji mineral u koštanom matriksu. Preostali dio mineralnog sadržaja čine karbonatne, fluoridne, kloridne i citratne soli magnezija, natrija te drugih metala. Prisutnost tih soli može smanjiti kristalnost koštanih minerala, mijenjajući njihova specifična svojstva, poput topljivosti, koja ima važnu ulogu u održavanju homeostaze i prilagodbi kosti [20]. Osteoblasti su zaduženi za mineralizaciju koštanog matriksa. Hidroksiapatit je složena sol sa središnjim ionom kalcija [30]. Hidroksiapatit, kao vitalna komponenta sastava kosti, ima važnu ulogu ne samo u održavanju strukture kosti nego i u olakšavanju njihove regeneracije, posebno u dva ključna procesa: osteoindukciji (odnosi se na mehanizam odgovoran za stvaranje novog koštanog tkiva i pretvaranje nezrelih stanica u preosteoblaste) i osteokondukciji (odnosi se na sposobnost stanica koje stvaraju novu kost). Primarna nukleacija odnosi se na početno stvaranje i rast kristala HAP, pri čemu koštani sijaloproteini kontroliraju taj proces – njihova proizvodnja povezana je s područjima gdje dolazi do nove mineralizacije. Ekspresija gena za te proteine aktivira se u ranim fazama osteoblasta pod utjecajem hormona i citokina koji potiču izgradnju koštanog tkiva. Sekundarna nukleacija uključuje spajanje pojedinačnih kristala HAP-a u veće agregate. Područja koštanog tkiva s manjim kristalima HAP-a smatraju se mlađim strukturama u odnosu na one s većim volumenom kristala [31,32].

1.4.2. Organski sadržaj koštanog matriksa

Vlaknasti (kolageni) proteini čine 95% organskog sadržaja koštanog matriksa od kojih je najznačajniji kolagen tipa I [33]. Ostatak organske tvari čine nevlaknasti proteini, glikoproteini i glukozaminoglikanske molekule (proteoglikani, elastin, glikoprotein, mikrofibrilarni proteini te male peptidne signalne molekule) koje su udružene s proteinima u makromolekularne komplekse. Isprva se smatralo da je međustanična tvar koštanog tkiva inertna (pasivna), ali danas su poznate brojne interakcije između organskih sastojaka koštanog matriksa koje reguliraju mnoge biološke pojave unutar koštanog tkiva (diferencijacija stanica, proliferacija, apoptoza, modeliranje te remodeliranje). Kolagen tipa I formira karakterističnu trostruko-spiralnu strukturu, koja osigurava strukturnu potporu kostima te doprinosi njihovim mehaničkim svojstvima poput savitljivosti i otpornosti na vlačna opterećenja [29]. Jedan od najzastupljenijih kolagena koštanog tkiva je kolagen tipa I. On je i nositelj biomehaničkih svojstava. Osteoblasti su zadušeni za stvaranje topljive preteče kolagena tipa I, odnosno prokolagena. Zbog dobre topljivosti prokolagena onemogućuje se stvaranje vlakanaca unutar stanice. Prokolagen se enzimatskim promjenama mijenja unutar koštanog matriksa u tropokolagen, nakon čega slijedi cijepanje molekule kolagena i sparivanje u kolagena vlakna. Trostruku uzvojnici čine tri peptidna lanca unutar molekula kolagena. Takvi peptidni lanci izgledom podsjećaju na konop zbog međusobne isprepletenosti i povezanosti vodikovim vezama. Pore se javljaju između paralelnih dijelova kolagena, a prazni prostori javljaju se između razmaknutih dijelova. Nekolageni proteini i minerali smješteni su u takvim prostorima. Kovalentne veze udružuju kolagena vlakanca u kolageno vlakno. Kolagen se odlikuje dobrom otpornošću na tlačne i vlačne sile zbog svoje čvrstoće i elastičnosti, no nije otporan na savijanje. Kristali hidroksiapatita koji su smješteni paralelno i između vlakanaca pružaju rigidnost kolagenu [34]. Proteoglikani su makromolekule koje se sastoje od proteina jezgre na koji su kovalentno vezani jedan ili više lanaca glukozaminoglikana, polisaharidnog lanca koji formira disaharide poput heparan-sulfata, hondroitin-sulfata, keratan-sulfata i hijalurona. Među najzastupljenijim proteoglikanima u koštanom tkivu su biglikani i dekorini. Oba proteoglikana imaju sposobnost vezivanja kolagena tipa I i transformiranog činitelja rasta (engl. *transforming growth factor* β , TGF- β) [35,36]. Glikoproteini su proteini koje nose N-i i O- glikozidno povezane lance ugljikohidrata složene strukture i funkcije. U koštanom tkivu važni glikoproteini uključuju osteonektin, trombospondin, osteoadherin, osteopontin, fibronektin,

fibrilin, sijaloprotein i druge. Glikoproteini imaju višestruke funkcije poput kontrole stanične proliferacije, posredovanja u staničnim interakcijama te sudjelovanja u mineralizaciji matriksa [37].



Slika 4. Shematski prikaz molekule kolagena tipa I i kristala hidroksiapatita

1.5. Fiziološki procesi stvaranja i održavanja koštanog tkiva

Osteogeneza je dug proces koji traje od šestog ili sedmog tjedna embrionalnog razvoja do otprilike 25. godine života. Osifikacija kostiju klasificira se u dvije vrste: intramembransku i endohondralnu. Obje započinju s mezenhimnim matičnim stanicama (engl. *mesenchymal stem cell*, MSC) kao prekursorima za različite vrste koštanih stanica [38]. Intramembransko stvaranje kosti odgovorno je za razvoj većine kranijalnih kosti, ravnih kosti lubanje i ključne kosti. Taj proces započinje diferencijacijom MSC-a u specijalizirane osteoblaste koji stvaraju kost, a koji se zatim grupiraju u skupine centara osifikacije. Osteoblasti luče nemineraliziranu matricu koja se sastoji od kolagena i proteoglikana, nazvanu osteoid. Ona može vezati kalcij, što rezultira očvršćivanjem matrice i hvatanjem osteoblasta, nakon čega slijedi diferencijacija osteoblasta u osteocite. Osteociti su najzastupljeniji u kosti i reguliraju pregradnju kosti. Osteoblasti su okruženi krvnim žilama, tvoreći trabekularnu/spužvastu kost, dok mezenhimske stanice tvore periost, membranu na površini kosti, i diferenciraju se u osteoblaste, lučeći osteoid paralelno s postojećim. Tako se stvaraju novi slojevi, nazvani kompaktna kost, a crvena srž nastaje krvnim žilama. Endohondralna osifikacija formira aksijalni kostur i duge kosti. Taj proces započinje kao i intramembranski proces, točnije s MSC-ovima kao prekursorima. No MSC-ovi se ne diferenciraju izravno u koštane stanice, već posredno u hondroците, koji luče izvanstanični matriks i posljedično tvore hrskavični model za kost. Broj hondrocita brzo se povećava, a matriks se mineralizira, što rezultira smanjenom dostupnošću hranjivih tvari za hondroците i njihovom apoptozom. Zatim krvne žile počinju prodirati u prostore koje su ostavile mrtve stanice i donose matične stanice koje se diferenciraju u osteoblaste, odgovorne za taloženje kosti, i osteocite. Cijeljenje kosti složen je fiziološki proces koji uključuje mnoge različite tipove stanica, citokine, kemokine, faktore rasta i stanične odgovore. Zbog toga se kost rekonstituirala bez stvaranja ožiljnog tkiva [39]. Kao i pri osifikaciji kosti, ovdje MSC-ovi također imaju značajnu ulogu. Proces obnove skeleta, poznat i kao preoblikovanje kosti, provodi se ključnim skupinama stanica. Te su stanice ponajprije osteociti, osteoblasti, osteoklasti i MSC-ovi. MSC-ovi daju osteoblaste osteogenom diferencijacijom. Zatim migriraju na površinu prijeloma kosti i moduliraju mikrookruženje za druge tipove stanica [40]. Postoje dvije vrste cijeljenja kosti: primarno i sekundarno. Prvo se odnosi na cijeljenje male pukotine prijeloma, gdje se na mjestu prijeloma ne događa pomicanje. Karakteristična je značajka primarnog cijeljenja kosti to da se ne stvara kalus. Umjesto toga, proces nalikuje

normalnom preoblikovanju kosti, tj. posljednjoj fazi sekundarnog cijeljenja kosti. Ipak, primarni popravak kosti prilično je rijedak, a većina slučajeva uključuje sekundarno cijeljenje [39]. Sekundarno cijeljenje prijeloma sastoji se od četiriju faza: stvaranje hematoma na mjestu prijeloma, stvaranje mekog kalusa, stvaranje tvrdog kalusa i preoblikovanje. Prvi i vjerojatno najvažniji faktor koji utječe na učinak zacjeljivanja kosti je hematoma. Krvne žile odmah okružuju oštećeno mjesto kosti nakon prijeloma u upalnoj fazi. Popravak započinje naknadnom infiltracijom upalnih stanica koje sprječavaju infekciju i luče proupalne citokine. Ti kemoatraktanti regrutiraju druge imunološke stanice, MSC-ove i endotelne stanice [40,41]. Citokini koji se pojavljuju na ozlijeđenom mjestu uključuju koštane morfogenetske proteine (engl. *bone morphogenetic protein*, BMP), faktore tumorske nekroze alfa (engl. *vascular endothelial growth factor*, TNF- α), vaskularne endotelne faktore rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*; VEGF) i interleukin 17 (engl. *interleukin 17*; IL-17), koji ima dvostruku ulogu: stimulira resorpciju kosti putem osteoklasta i pojačava osteogenu učinkovitost putem osteoblasta [39]. BMP pojačava diferencijaciju MSC-ova u osteogene stanice, a VEGF stimulira vaskularne stanice. Na mjestu nastanka hematoma dolazi do stvaranjarez izvanstanične matrice, koja se razvija u granulacijsko tkivo. To se tkivo ponajprije sastoji od MSC-ova te endotelnih i imunoloških stanica [40]. Stvaranje mekog kalusa druga je faza cijeljenja prijeloma, koja se odvija kada se MSC-ovi u granulacijskom tkivu počnu diferencirati u hondroblaste, fibroblaste i osteoblaste. Fibrohrskavični kalus nastaje tijekom endohondralne osifikacije i spaja krajeve kosti u prijelomnoj pukotini. Tvrdi kalus, nazvan tkana kost, formira se u sljedećoj fazi nakon formiranja mekog kalusa, a ovisno o stabilnosti mjesta prijeloma može se razviti izravno iz granulacijskog tkiva putem intramembranske osifikacije. Osteoblasti proizvode vezikule s kalcijevim fosfatnim kompleksima u matriksu, što zauzvrat uzrokuje formiranje tvrdog, kalcificiranog kalusa [42]. Preoblikovanje kosti, završna faza cijeljenja kosti, može trajati od nekoliko mjeseci do mnogo godina. Proces uključuje spajanje mekog kalusa nastalog tijekom endohondralne osifikacije s tvrdim kalusom intramembranske osifikacije, što rezultira regeneracijom kosti koja nosi težinu. Osteoklasti i osteoblasti posebno su uključeni u ovu fazu popravka. Oni stvaraju ravnotežu između resorpcije i stvaranja nove kosti. Vaskularizacija se također znatno preoblikuje. Resorpcijom kosti osteoklastima uvode se MSC-ovi. Oni, pak, stvaraju specifično mikrookružje koje omogućuje stvaranje kosti [43].

1.6. Augmentacija alveolarnog grebena

Implantologija u dentalnoj medicini predstavlja prvi izbor u liječenju bezubih pacijenata. Liječenje bezubih pacijenata dentalnim implantatima zahtijeva odgovarajuću predoperativnu procjenu kako bi se osigurao odgovarajući volumen kosti i pravilno planiranje postavljanja implantata. Kod protetske terapije poduprte implantatima (implatoprotetike) implantološka kirurgija mora biti ispravno izvođena te ne smije biti ograničena smanjenim volumenom kosti [44]. Jedan od najčešćih postupaka u dentalnoj medicini je ekstrakcija zuba. Nakon ekstrakcije zuba zabilježene su značajne promjene resorpcije koštanog tkiva alveolarnog grebena. Parodontno tkivo nakon ekstrakcije zuba prolazi postupak atrofije gdje se gubi cement, vlakna parodontnog ligamenta te *bundle bone* [40]. Tako se smanjuje dimenzija alveolarnog grebena te se stvaraju nepovoljni uvjeti za dentalnu implantaciju [45]. Najveća resorpcija alveolarnog grebena događa se kada su zubi zahvaćeni parodontnom ili endodontskom patologijom, traumom uzrokovanom gubitkom zuba ili agresivnim vađenjem zuba tijekom kojeg dolazi do lomljenja bukalne koštane stijenke. Pod tim okolnostima i u nedostatku koštane stijenke, meko tkivo urasta u čašicu nakon ekstrakcije, otežava regeneraciju alveolarne kosti te uzrokuje intenzivnu resorpciju alveolarnog grebena [46]. Brojna znanstvena istraživanja dokazala su da je najveći gubitak kosti vidljiv u prvih mjesec dana nakon vađenja zuba [47–49]. U prvih šest mjeseci nakon vađenja zuba horizontalni gubitak alveolarne kosti može iznositi između 29% i 63%, dok se vertikalni gubitak kreće od 11% do 22%. Chappuis i suradnici [50] pokazali su da je gubitak kosti u prosjeku 3,8 mm u bukalno-oralnom smjeru, a 1,24 mm inicijalne visine alveolarnog grebena. Istodobno vrlo se brzo resorbira-bukalna stijenka alveolarne kosti zbog čega se pomiče profil cijelog grebena prema lingvalno. Ako je bukalna stijenka alveolarnog grebena tanja od 1 mm, uočava se značajni gubitak kosti od čak 7,5 mm u prvih 8 tjedana nakon vađenja zuba. Međutim, ako je debljina bukalne stijenke veća od 1 mm, onda je zabilježen gubitak kosti od samo 1,1 mm u visini alveolarnog grebena. Za uspješnu implantaciju i dugoročne rezultate potrebno je postići tri glavna cilja: dovoljan volumen kosti, keratiniziranu gingivu oko vrata implantata i pravilan položaj implantata s protetskog stajališta. Vrlo je važno sačuvati što više alveolarne kosti pri vađenju zuba jer se tako smanjuje brzina resorpcije alveolarnog grebena i remodeliranje kosti nakon zahvata [51]. Tijekom posljednjih 20-ak godina razvojem različitih tehnika augmentacije alveolarnog grebena omogućeno je očuvanje optimalnog volumena i oblika kosti za uspješnu ugradnju dentalnih implantata. Tehnike

uključuju prezervaciju alveole, podizanje dna maksilarnog sinusa (*sinus lift*), vođenu regeneraciju kosti (engl. *guided bone regeneration*; GBR), horizontalnu i vertikalnu blok-augmentaciju te distrakcijsku oogenezu [52]. Najčešće korištene metode augmentacije, potvrđene brojnim kliničkim studijama, uključuju očuvanje alveole i tehnike vođene regeneracije kosti (GBR) [53,54]. Postupak s pomoću kojeg se minimizira resorpcija kosti nakon ekstrakcije zuba i omogućuje regeneracija koštanog tkiva zubne alveole radi pripreme za daljnji protetski tretman ili ugradnju dentalnog implantata je očuvanje alveole. Godine 1982. prvi put je opisan postupak kojem je cilj bio ispuniti ekstrakcijsku šupljinu koštanim transplantantnim materijalom, a zatim prekriti koronarno gingivalnim režnjem [55]. Očuvanje alveole temelji se na principima osteogeneze, osteoindukcije i osteokondukcije [56]. Istraživanja pokazuju da očuvanje alveole minimizira gubitak kosti, iako je gubitak kosti i dalje prisutan i iznosi do 2 mm u visinu i širinu [57,58]. Iz brojnih znanstvenih radova može se zaključiti kako očuvanje alveole omogućuje održavanje približno istih dimenzija alveolarnog grebena u usporedbi s prirodnim procesom cijeljenja nakon vađenja zuba [45,59]. Cilj postupka očuvanja alveole nije samo spriječiti curenje materijala koštanog transplantata iz ekstrakcijske čašice, već i spriječiti prodor epitelnog i vezivnog tkiva u ekstrakcijsku šupljinu, što je temeljeno na principima tehnike vođene regeneracije tkiva (GBR) [60].

1.7. Vođena regeneracija kosti

Nakon ozljede ili gubitka tkiva događa se prirodni biološki proces popravljjanja – regeneracija. Ponekad se ljudsko tijelo ne može obnoviti i vratiti u svoj prvobitni oblik, stoga danas sve više kliničara istražuje metode koje bi omogućile zamjenu izgubljenog ili oštećenog tkiva (regeneracija). Funkcija regeneracije nije samo obnavljanje strukture, već i vraćanje oštećenog tkiva u prvobitno stanje. Gubitak zuba može uzrokovati atrofiju alveolarnog grebena te gubitak tvrdih i mekih tkiva zbog čega se mijenja profil lica pacijenta [25]. Postoje različite kirurške tehnike, strategije te materijali koji potiču stanični odgovor u vođenoj regeneraciji kosti (GBR) i vođenoj regeneraciji tkiva (engl. *guided tissue regeneration*; GTR) [61]. Vođena regeneracija kosti odnosi se na povećanje alveolarnog grebena ili postupak regeneracije kosti, a vođena regeneracija tkiva odnosi se na regeneraciju kosti, parodontnog ligamenta i cementa oko prirodnih zuba [19]. Obje tehnike temelje se na staničnoj diferencijaciji, staničnoj

proliferaciji i indukciji i/ili provođenju stvaranja tkiva. Čimbenici su rasta polipeptidi koji kontroliraju rast, diferencijaciju i metabolizam stanica. Iako su prisutni u nanogramima, imaju vrlo snažan utjecaj na procese zacjeljivanja i oporavka rana. Dokazano je da parodontna regeneracija ovisi o interakcijama između barijera i faktora rasta, stanica i opskrbe krvlju [62]. Pretpostavlja se da je vođena regeneracija kosti postignuta isključivo kada je osteoprogenitornim stanicama dopušteno ponovno naseljavanje defekta kosti, a spriječen ulazak neosteogenog tkiva. Istraživanja su pokazala da čak 40% osteointegriranih implantata zahtijeva GBR kao dio rehabilitacije pacijenata [63]. U posljednjih desetak godina znanstvene su studije pokazale da je GBR uspješna i pouzdana tehnika za vertikalno i horizontalno povećanje grebena [64]. GBR se može postići na dva načina: primjenom gustih politetrafluoretilenskih membrana (engl. *dense polytetrafluoroethylene membrane*; d-PTFE) ili onih ojačanih titanom (nerazgradive membrane) ili kolagenih membrana (razgradive membrane) [65]. Neke od karakteristika membrana su: biokompatibilnost, svojstva okluzije stanica, integracija tkiva u domaćinu, klinička upravljivost, sposobnost stvaranja prostora te odgovarajuća mehanička i fizikalna svojstva [19]. Dokazano je da GBR koji upotrebljava razgradive membrane ispravlja/povećava grebene, no nerazgradive membrane (d-PTFE) predstavljaju bolji izbor zbog svoje sposobnosti održavanja/stvaranja prostora koji je neophodan za koštanu augmentaciju [66]. GBR se temelji na principu PASS (P: primarno zatvaranje, A: angiogeneza, S: održavanje prostora, S: stabilnost). Primarno zatvaranje treba provesti kako bi se spriječila dehiscencija rane što može uzrokovati zatajenje GBR-a zbog povećanog rizika od komplikacija kao što je infekcija. Izvrsna opskrba krvlju na mjestu primatelja može pomoći u postizanju uspješnog cijeljenja kosti. Osim toga, prostor treba osigurati tijekom tog procesa, uz stabilizaciju koštanog transplantata i barijerne membrane [61].

1.8. Koštani nadomjesni materijali

U oralnoj implantologiji, u procesu očuvanja alveole, najčešće korišteni biomaterijali jesu: autologni (autografti), heterologni (ksenografti), homologni (alografti) i sintetski nadomjesni biomaterijali [44].

1.8.1. Autologna kost (autografti)

Autologna, autogena kost predstavlja zlatni standard za regeneraciju koštanog tkiva različitih defekata [67,68]. Može potaknuti rast nove kosti (osteogeneza), privlači stanice koje potiču stvaranje kosti (osteokondukcija) i pruža adekvatno okruženje za regeneraciju kosti (osteoindukcija) [69]. Autolognu kost čini 30% organskih i 70% anorganskih spojeva. Od organskih spojeva 90-95% čini kolagen (tip I), dok ostatak čine nekolagenski proteini poput osteopontina, osteokalcina, kalcitonina te sijaloproteina. Kalcijev fosfat u obliku kristalnog hidroksiapatita glavna je komponenta anorganske tvari. Autologna kost potpuno je biokompatibilna s obzirom na to da je donor sam pacijent, no iziskuje dodatno kirurško mjesto s kojeg će se uzeti autologna kost. Autologna kost može se uzimati s intraoralnih (ramus mandibule, simfiza mandibule, tubera maksila) i ekstraoralnih mjesta (kalvarija, crista illiaca i dr.) s obzirom na to da predstavljaju dobar izvor kortikalne i spužvaste kosti [70]. Spužvasta tvar sadrži osteoblaste i progenitorske stanice, stoga se najčešće koristi za autotransplantate. Trabekularna kost zbog velike površine spužvaste strukture pogoduje stvaranju novog koštanog tkiva te revaskularizaciji. S druge strane, unatoč nedostatku osteoblasta i osteogenih stanica kortikalna kost pruža potporu te potiče regeneraciju osteoinduktivnim svojstvima. Najčešće se upotrebljava kombinacija kortikalne kosti i spužvaste autologne kosti kako bi se povećao potencijal cijeljenja [47,71]. Autotransplantati se smatraju najboljim izborom zbog biološke podudarnosti te minimalnog rizika od odbacivanja. Ipak, uključivanje autotransplantata iz mandibularnog ramusa ima veću mogućnost komplikacija u odnosu na druge izvore unutar usne šupljine, posebice zbog blizine donjeg alveolarnog živca koji može biti oštećen tijekom zahvata. Ta se metoda preporučuje isključivo za manje defekte, gdje je potrebna augmentacija debljine do 4 mm i koja ne zahvaća više od četiri zuba [72]. Ključan je izazov resorpcija –

tijekom procesa zarastanja može doći do gubitka do 60% početnog volumena kosti, što značajno utječe na dugoročnu stabilnost [73,74]. Osim toga, potreba za prikupljanjem tkiva s drugog mjesta na pacijentovu tijelu povećava opasnost od krvarenja, otekline, boli te produžuje oporavak. Ta ograničenja potaknula su istraživanje alternativnih metoda, poput upotrebe sintetskih materijala ili alogenih transplantata [71,75].

1.8.2. Ksenografti

Alternativni koštani materijali životinjskog podrijetla, dobiveni od različitih vrsta primatelja poput: goveda, svinja, konja ili morskih organizama (koralj), jesu ksenografti [76]. U usporedbi s alograftima, oni su znatno dostupniji i ekonomičniji. Prije primjene ksenografti prolaze niz fizikalno-kemijskih postupaka kako bi se uklonile organske tvari te se tako smanjio rizik od imunološkog odgovora i prijenosa zaraznih bolesti [77]. Postupak obrade uključuje postupno žarenje goveđe kosti, nakon čega slijedi tretman natrijevim hidroksidom. Konačan je proizvod anorganski hidroksiapatit (HA) s poroznom strukturom koji je kemijski vrlo sličan ljudskoj kosti [78,79].

Ksenografti su potpuno biokompatibilni, hidrofilni i ostekonduktivni. Zbog svojih mehaničkih svojstava te otpornosti na resorpciju mogu dugoročno održavati volumen, stoga se preporučuje miješanje autologne kosti s koštanim nadomjesnim materijalom radi postizanja stabilnosti koštanog volumena [80]. Komercijalno dostupni oblici uključuju: granule (koje se prije uporabe miješaju s fiziološkom otopinom ili krvlju) te gotove blokove koji se fiksiraju kirurškim vijcima. Zbog krutosti blokovi zahtijevaju pažljivu manipulaciju kako bi se izbjeglo lomljenje pod mehaničkim naprezanjem. Te karakteristike čine ksenografte korisnim u rekonstrukcijskim zahvatima, iako zahtijevaju pažnju pri postavljanju kako bi se osigurala stabilnost bez oštećenja materijala [81,82]. Jedan je od nedostataka tog biomaterijala to što predstavlja rizik od prijenosa prionskih infekcija na primatelja. Poznavanje fizikalnih i kemijskih svojstava biomaterijala jednako je važno kao i poznavanje njihova podrijetla jer ta svojstva znatno utječu na uspješnost regeneracije kosti. Biomaterijal koji se prebrzo resorbira može se razgraditi prije nego što osteogene stanice koloniziraju područje defekta putem osteokondukcije i potaknu stvaranje nove kosti. S druge strane, biomaterijal koji se ne resorbira

ili se razgrađuje iznimno sporo može ometati primarnu osteogenezu i sazrijevanje kosti. Zbog toga se često pojave kronične upale, koje mogu rezultirati stvaranjem fibroznog sloja oko biomaterijala (inkapsulacijom), čime se onemogućuje njegova integracija s okolnim tkivom [83]. Cerabone (Botiss biomaterials, GmbH, Zossen, Njemačka) je jedan od najčešće korištenih ksenogenih biomaterijala u postupku očuvanja alveolarnog grebena. Dobiva se iz trabekularne kosti goveda, pri čemu se fizikalnim i kemijskim postupcima uklanjaju organske komponente, uključujući osteoinduktivne molekule, imunosne stanice i patogene poput priona, bakterija i virusa. Kao rezultat ostaje kalcijev hidroksiapatit (HA). Tijekom proizvodnje ksenogena se kost izlaže visokim temperaturama ($>1200^{\circ}\text{C}$), što doprinosi specifičnim svojstvima [84,85]. U usporedbi s drugim često korištenim ksenogenim biomaterijalima, poput Bio-Ossa® (Geistlich Pharma AG, Švicarska) i THE Grafta® (Purgo Biologics Inc., Korea), skenirajuća elektronska analiza (engl. *scanning electron microscopes*, SEM) pokazuje da sva tri materijala imaju granuliranu strukturu (promjera 0,15–1 mm) i poroznost koja uključuje makropore i mikropore. Poroznost je ključna za osteokondukciju – makropore (promjera $>100\text{ }\mu\text{m}$) omogućuju bolji prodor krvnih žila te formaciju i reorganizaciju novog koštanog tkiva, a mikropore olakšavaju penetraciju tjelesnih tekućina, transport iona i adheziju osteoblasta. Cerabone ima najmanju ukupnu poroznost, ali najveći prosječan promjer pora (0,46 μm), što može smanjiti sposobnost osteoblasta. Također, Cerabone sadržava veće kristale HA što ga čini sporije razgradivim [79,83].

1.8.3. Alografti

Biomaterijali uzeti od živih donora ili kadavera iste vrste, ali različitog genotipa jesu alografti. 50-ih godina prošlog stoljeća u Sjedinjenim Američkim Državama prvi put su se pojavili, a danas su dostupni diljem svijeta u bankama tkiva. Ti transplantati razgrađuju se u tkivu, oslobađajući kalcijeve ione i kolagen tipa I, koji je ključna organska komponenta kosti. Njihovom upotrebom nije potrebno provesti sekundarni kirurški zahvat. Alogeni transplantati mogu se pripremiti u tri osnovna oblika: svježi, zamrznuti ili suho smrznuti [74]. Svježi ili zamrznuti imaju dobra osteoinduktivna svojstva, ali rijetko se upotrebljavaju zbog povećanog rizika imunoloških reakcija, ograničenog roka trajanja i mogućnosti prijenosa bolesti poput

HIV-a ili hepatitisa [86]. Demineralizirani suho smrznuti prolaze proces demineralizacije koji smanjuje imunogenost i poboljšava osteoinduktivni potencijal, iako taj učinak može varirati ovisno o dobi donora i načinu sterilizacije. Mineralizirani suho smrznuti zadržavaju mineralnu strukturu, pružajući mehaničku potporu, ali imaju slabija osteoinduktivna svojstva. Unatoč postupcima obrade poput sterilizacije, gama-zračenja i ultrazvučnog ispiranja, rizik od imunoloških reakcija ili prijenosa patogena ne može se potpuno eliminirati. Liofilizacija produljuje vijek trajanja materijala i smanjuje imunogenost, ali istodobno smanjuje osteoinduktivni potencijal. Taj smanjeni potencijal često nije dovoljan za regeneraciju kosti potrebne za oseointegraciju dentalnih implantanata. Alogeni transplantati suočavaju se s problemima kao što su nedostaci donorskog tkiva te visoke stope neuspjeha nakon dugotrajne primjene [87].

1.8.4. Sintetski materijal – aloplasti

Aloplastični koštani transplantati sintetski su biomaterijali koji se upotrebljavaju kao zamjena za prirodne koštane transplantate. Sintetski materijali mogu oponašati biološka svojstva prirodne kosti kako bi se spriječile potencijalne infekcije i morbiditet donorskog mjesta. Trenutačno dostupni sintetski materijali imaju osteointegrativna te osteokonduktivna svojstva [88]. Materijali koji čine tu kategoriju su: kalcijev fosfat (hidroksiapatit (HA), trikalcijfosfat), biostaklo, metali (nikal-titan), polimeri (polimetilmetakrilat, poliglikolide te kalcijev fosfat cement). Oni su potpuno biokompatibilni te imaju osteokonduktivna svojstva [89]. Za njih nije potrebno donorsko mjesto te ne mogu širiti zarazne bolesti. Jedan od glavnih nedostataka aloplastičnih materijala je spora resorpcija. Da bi se stvorila nova kost, potreban je određeni prostor koji u početku zauzima koštani transplantat. Ako se taj materijal ne resorbira, prostor koji je potreban za razvoj nove kosti ostaje ograničen te se smanjuje ukupan volumen novonastale kosti [75]. Sintetski biomaterijali predstavljaju veliku skupinu anorganskih tvari koje se razlikuju po svojim fizikalnim, kemijskim i strukturnim svojstvima. 1920. godine zabilježen je prvi pokušaj njihove primjene [90]. Sintetski kalcijevi fosfati sastoje se od resorptivnih β -trikalcijskih fosfata, neresorptivnih hidroksiapatita i kombinacija ova dva materijala koji se nazivaju dvofazni kalcijevi fosfatni materijali. β -trikalcijski fosfati potpuno

se resorbiraju i zamjenjuju vlastito tkivo tijela, a materijali koji sadrže hidroksiapatit se ne resorbiraju, nego se integriraju u kosti domaćina [91].

1.9. Biološki mehanizam cijeljenja

Nakon ekstrakcije zuba vidljive su histološke promjene na alveolarnom grebenu. One se odvijaju u tri uzastopne faze koje se često preklapaju: upalna, proliferativna i modeliranje/remodeliranje. Prva faza, inflamatorna ili upalna, obilježena je stvaranjem ugrušaka te migracijom upalnih stanica. U proliferativnoj fazi odvija se fibroplazija te započinje odlaganje koštanog matriksa. Završnu fazu čine faza modelacije i remodelacije kosti [45].

Nakon ekstrakcije zuba dentalna trauma uzrokuje prekid opskrbe metaboličkim hranjivim tvarima za stanice unutar alveolarnog ležišta zbog čega se stvaraju hematomi [92]. Unutar 24 sata na mjestu ozljede ugrušak regrutira polimorfonuklearne neutrofile koji luče citokine i kemokine kao što su: TNF- α , interleukin 1 (engl. *interleukin 1*; IL-1), interleukin 6 (engl. *interleukin 6*; IL-6), interleukin 11 (engl. *interleukin 11*; IL-11) i interleukin 18 (engl. *interleukin 18*; IL-18). Oni na mjestu oštećenja izazivaju angiogenezu, nakupljanje mezenhimskih stanica i akutnu upalu [41]. Trombociti stvaraju na mjestu oštećenja transformirajućega faktora rast $\beta 1$ (engl. *transforming growth factor- $\beta 1$* , TGF- $\beta 1$) i faktora rasta podrijetlom od trombocita (engl. *platelet-derived growth factor*, PDGF). Lokalno regrutiranje te osteogenu diferencijaciju mezenhimatskih stanica potiču koštani morfogenetski proteini 2 (engl. *bone morphogenetic protein*, BMP-2) koje proizvode osteoprogenitorne stanice [93]. Liza krvnog ugruška povezana je s neovaskularizacijom i kemotaktičkim djelovanjem citokina čime se omogućuje postupno ispunjavanje alveole stvaranjem granulacijskog tkiva i naseljavanjem novih stanica. Paralelno s tim, aktiviraju se osteoklasti koji resorbiraju zaostale koštane fragmente i remodeliraju alveolarne stijenke pripremajući teren za fiziološko zacjeljivanje [94]. U tom procesu važnu ulogu imaju makrofazi koji se diferenciraju u dva fenotipa: proinflamatorni M1 i antiinflamatorni M2 makrofazi. Ta dva tipa makrofaga koordinirano surađuju kako bi započeli i završili imunološki odgovor čime pomažu u složenom procesu cijeljenja kosti [95]. Makrofazi M1 istodobno pokreću upalne odgovore te započinju početak angiogeneze. Tijekom cijeljenja makrofazi M1 postupno se zamjenjuju makrofazima M2 čija je zadaća potaknuti cijeljenje, staničnu proliferaciju te stabilizaciju i sazrijevanje

vaskularne mreže. Makrofazi M2 luče upalne i progenitorne medijatore kao što su: $\text{TNF-}\alpha$, faktori rasta fibroblasta i koštani morfogenetski proteini [96]. Na mjestu oštećenja osim makrofaga prisutne su i druge stanice poput monocita, neutrofila te stanice koje preko citokina $\text{IFN-}\gamma$ i $\text{TNF-}\alpha$ inhibiraju proces cijeljenja [93]. Diferencijacijom mezenhimskih stanica nastaju hondrociti i osteoblasti koji sintetiziraju izvanstanični matriks, stvarajući kalus koji prevladava među odvojenim koštanim fragmentima. Transformacija mekog kalusa u tvrdi kalus s mineraliziranim matriksom odvija se endohondralnom osifikacijom [90]. Tijekom regeneracije kosti postupno se zamjenjuje primarna kost sekundarnom. U tom procesu osteociti prolaze kroz apoptozu što omogućuje vraćanje normalne fiziologije kosti. Nadalje, takva kost prolazi proces koštane remodelacije. Proliferacija osteoblasta postiže svoj vrhunac između 7. i 10. dana kada dolazi do ekspresije osteokalcina. Vrhunac osteoblastne proliferacije odvija se od 7. do 10. dana uz pojačanu ekspresiju osteokalcina. Nakon dva tjedna slijedi kritično razdoblje neovaskularizacije potaknute vaskularnim endotelnim faktorom rasta VGF. Između 14. i 21. dana osteogeneza je najjača te je vidljiva pojačana ekspresija protuupalnih citokina $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IL-6. Od 21. do 35. dana nezrela kost transformira se u zrelu kost u kojoj je smanjena ekspresija $\text{TGF-}\beta$, ali povećana ekspresija sklerostina [97].

1.10. Barijerne membrane

Važne komponente u postupku vođene regeneracije kosti jesu zaštitne membrane. One bi u postupku vođene regeneracije kosti trebale ispunjavati neke od sljedećih kriterija za sigurnu upotrebu:

1. Biokompatibilnost – interakcija membrana i okolnih tkiva mora omogućiti cijeljenje na mjestu defekta
2. Očuvanje prostora (engl. *space maintaining*) – membrana zadržava svoj oblik te sprječava propadanje u defekt, čime osigurava dovoljno prostora za stvaranje nove kosti
3. Stanična barijera (engl. *cell occlusiveness*) – membrana blokira urastanje mekih tkiva na mjestu regeneracije, no istodobno omogućava prolaz kisika, staničnih tekućina te bioaktivne tvari koje potiču stanični rast kako bi dospjele na mjesto defekta
4. Jednostavna primjena – membrane moraju biti jednostavne i fleksibilne za upotrebu te ne smiju biti previše krute niti previše savitljive
5. Pogodnost za bioaktivaciju (engl. *bioactivation friendly*) – ovo svojstvo membrana nije obvezno, no danas se sve više zagovara da one u budućnosti poprime aktivnu ulogu u procesu regeneracije.

Barijerne membrane, osim prema podrijetlu: prirodne (kolagene) i sintetske, mogu se podijeliti i s obzirom na kemijski sastav na resorptivne i neresorptivne [98].

1.10.1. Resorptivne membrane

Upotrebom resorptivnih membrana izostavlja se sekundarni kirurški zahvat. Lakše su za manipulaciju, ali podložnije smanjenju prostora koji pokrivaju. Resorpcija je tih membrana nepredvidiva, a prerani gubitak barijerne funkcije negativno utječe na formiranje nove kosti. Danas su dostupne dvije vrste resorptivnih membrana: kolagene te sintetske polimerne membrane [99].

1.10.2. Kolagene membrane

Glavni sastojak prirodnih resorptivnih membrana je kolagen (kolagen tipa I, goveđeg ili svinjskog podrijetla). Od svih kolagena najzastupljeniji je kolagen tipa I koji čini 25% tjelesnih proteina, 80% proteina vezivnog tkiva te 90% mineraliziranog koštanog matriksa [100]. Kolagene membrane ističu se: homeostazom, kemotakcijom za fibroblaste, imunogenošću, jednostavnom manipulacijom te prilagodbom na formiranje kosti [101]. Enzimatskom razgradnjom makrofaga i polimorfonuklearnih leukocita kolagen se razgrađuje. Prednost je kolagenih membrana to što nije potrebno provoditi sekundarni kirurški zahvat nakon 4. tjedna s obzirom na to da se same resorbiraju [102]. Međutim, kako je Rider sa suradnicima utvrdio, one već nakon 2. tjedna od ugradnje počinju gubiti čvrstoću i otpornost te nakon 4. tjedna ta su svojstva potpuno izgubljena [103].

1.10.3. Sintetske polimerne membrane

Alifatski poliesteri predstavljaju sintetske polimere bazirane na poli-2-hidroksipropanskoj kiselini (engl. *polyglycolic acid*, PLA), poliglikolnoj kiselini (engl. *polyglycolic acid*, PGA) ili polikaprolaktonu (engl. *polycaprolactone*, PCL) [104]. Vrlo su jednostavne za obradu i korištenje te imaju mogućnost dodavanja lijekova. No njihov su manjak rigidnost i stabilnost. Potrebno je i do mjesec dana da bi se one resorbirale [105,106].

1.10.4. Neresorptivne barijerne membrane

Povijest neresorptivnih barijernih membrana seže u osamdesete godine prošlog stoljeća kada je prva generacija barijernih membrana bila zamišljena da funkcionira isključivo kao okluzivna membrana [107]. Tako su 1986. godine Gottlow i dr. na 10 pacijenata ugradili politetrafluoretilen (engl. *polytetrafluoroethylene*; PTFE), od kojeg su najčešće izgrađene neresorptivne membrane [108]. Mogu se podijeliti na guste politetrafluoretilenske membrane (engl. *dense polytetrafluoroethylene*; d-PTFE) ili ekspanzirane politetrafluoretilenske membrane (engl. *expanded polytetrafluoroethylene*; e-PTFE) [109,110]. Imaju sposobnost održavanja volumena i biokompatibilnosti. Međutim, neresorptivne membrane imaju dva ograničenja u kliničkoj uporabi [111].

Zbog svoje krutosti mogu uzrokovati dehiscenciju mekog tkiva te iziskuju potrebu za sekundarnim kirurškim zahvatom kako bi se uklonile neresorbirajuće membrane nakon regeneracije defekta [102]. PTFE predstavlja osnovni materijal neresorptivnih membrana. Vrlo je inertan i stabilan polimer zbog jakih veza između ugljika i fluora [63]. Također, polimer je koji ne izaziva imunološku reakciju domaćina. Danas se PTFE najčešće upotrebljava u obliku e-PTFE ili d-PTFE, no najčešće se primjenjuju membrane visoke gustoće d-PTFE. Membrana d-PTFE ima gušću strukturu u odnosu na membranu e-PTFE, ne širi se i manje je porozna (0,2 μm) [112]. Zbog svoje hidrofobnosti membrane d-PTFE imaju smanjenu adheziju mikroorganizma na površinu, također nije ih potrebno prekriti mekim tkivom, što olakšava njihovo vađenje. Tako su znanstvenim istraživanjima [113,114] pokazali da je veća bakterijska adhezija na membranama d-PTFE u odnosu na e-PTFE, a razlog je tomu veća i deblja biomasa biofilma te makropovršinska udubljenja i hrapavost. Danas su na tržištu dostupne dvije vrste membrana d-PTFE, koje se razlikuju po svojim fizikalnim svojstvima. Permamem® (Botiss bioamterials, Zossen, Njemačka) hidrofobna je i rigidna membrana kojom se teže manipulira, ali ima glatku unutrašnju površinu koja bi mogla biti manje adherentna za bakterije u usnoj šupljini. Za razliku od nje, Cytoplast™ se (Osteogenics Biomedical, Texas, SAD) odlikuje hrapavom unutrašnjom površinom. Fizikalna svojstva površine s kojom bakterije dolaze u kontakt imaju ključnu ulogu u njihovoj adheziji i sposobnosti stvaranja biofilma [115,116].

Begić i suradnici [117] pokazali su da membrane Permamem® i Cytoplast™ imaju isti kemijski sastav, ali se razlikuju po mikrostrukтури: stupnju kristaliničnosti, veličini kristalita, morfologiji

kristalita te u hrapavosti površine. Rezultati tog istraživanja upućuju na to da je hrapavost na nanometarskoj skali glavni čimbenik koji pridonosi ranoj bakterijskoj adheziji. Manja nanohrapavost membrane Cytoplast™ posljedica je visokog stupnja kristaliničnosti (78,6%) zbog čega ima jaču bakterijsku adheziju u odnosu na membranu Permamem® (kristaliničnost 34,2%). Veća kristaliničnost, uz nanohrapavost, utječe i na površinsku krutost, što je dodatni čimbenik u stvaranju razlika među membranama tijekom rane bakterijske adhezije. Također je utvrđeno da jedna strana svake membrane sadrži mikrometarske topološke artefakte različitih morfologija (kuglaste nakupine kod membrane Cytoplast™, nitaste kod membrane Permamem®). Učinak artefakata i površinske hrapavosti neovisan je o bakterijskoj vrsti: sve četiri vrste oralnih bakterija pokazale su jaču adheziju na membranu Cytoplast™. Najjače rano prijanjanje utvrđeno je za bakterijsku vrstu *S. oralis*, nakon koje slijede *Veionella parvula*, *Streptococcus mutans* i *Actinomyces actinomycetemcomitans*. Razlike u adhezijama između pojedinih bakterijskih vrsta objašnjene su razlikama u slobodnim energijama površine (engl. *surface free energy*, SFE).

Mazzucchi i sur. [118] analizirali su membrane d-PTFE koristeći se testovima SEM i BioTimer™ četiri tjedna nakon očuvanja alveole. Izvijestili su da su membrane d-PTFE kolonizirane bakterijama s obje strane, ali je sveukupno opterećenje bakterijama bilo nisko, što je omogućilo da se proces zacjeljivanja odvija nesmetano i bez infekcije. Nadalje, rani kolonizator, *S. sanguinis*, inhibira svaku površinu unutar usne šupljine, vežući druge parodontopatogene bakterije, kao što su *Porphyromonas gingivalis* i *Fusobacterium nucleatum*. *F. nucleatum* parodontni je patogen povezan sa širokim rasponom ljudskih bolesti uključujući parodontitis [119]. Zabilježeno je da koagregira s mnogim oralnim mikroorganizmima, kao što su *S. sanguinis*, *S. mutans* i *P. gingivalis* [120]. Štoviše, pojačava koagregaciju između *S. sanguinis* i *P. gingivalis*. Tako su Zelikaman i sur. [112] pokazali da zbog različite hrapavosti membrana bakterija *S. sanguinis* ima jaču bakterijsku adheziju na Cytoplast u odnosu na membranu Permamem®, dok bakterija *F. nucleatum* nije pokazala značajnu bakterijsku adheziju na membranama. Također, Al-asfour i sur. [121] pokazali su da kvantitativnom polimeraznom lančanom reakcijom u stvarnom vremenu (engl. *real-time quantitative*: RT-qPCR) i SEM-om veća je bakterijska adhezija *Candida albicans* na membrani Cytoplast™.

1.11. Oralni mikrobiom

Druga najsloženija mikrobna populacija u ljudskom tijelu oralni je mikrobiom koji čini više od 700 komenzalnih, simbiotskih i patogenih bakterijskih vrsta [122]. Mikrobiom nastanjuje različita mjesta usne šupljine poput: sline, jezika, mekog i tvrdog nepca, obraza, gingivalnog sulkusa, gingive te zuba. Osim usne šupljine, nastanjuje i krajnike, ždrijelo, jednjak, Eustahijevu tubu, srednje uho, dušnik, pluća, nosni prolaz te sinuse [123]. Usna šupljina i njezine pripadajuće strukture pružaju idealne uvjete za rast bakterija, uglavnom se to postiže stabilnom temperaturom (35-37°C) i pH-vrijednošću (6,5-7,5) [124]. Mikroorganizmi koji nastanjuju usnu šupljinu s obzirom na nutritivnu potrebu i potrebu za kisikom klasificiraju se u: obligatne anaerobe (*Veillonella* spp. i *Fusobacterium* spp.), fakultativne anaerobe (većina streptokoka, *Actinomyces*), mikroaerofile (vrste koje rastu pri niskim koncentracijama kisika od 2% do 10%) te kapnofili (*Neisseria*, vrste koje rastu pri visokim koncentracijama kisika od 5% do 10%) [125]. Dokazano je da mikroorganizmi iz usne šupljine uzrokuju niz dentalnih bolesti, uključujući karijes, parodontitis (bolest desni), endodontske (korijenski kanal) infekcije, alveolarni osteitis (suha čašica) i tonzilitis [126]. Također, oralni mikrobiom izravno utječe i na neke sistemske bolesti kao što su: kardiovaskularne bolesti, prijevremeni porod, dijabetes, moždani udar te upala pluća. Članovi oralne mikrobiote uglavnom koegzistiraju te tvore složene biofilme. U tom simbiotskom stanju koagregacije, različite bakterijske vrste, bilo aerobi bilo anaerobi, održavaju homeostazu oralnog ekosustava, otporni su na podražaje iz okoliša stvarajući ravnotežu između patogena i komenzala, čime se pomaže njihov opstanak [127]. Međusobna komunikacija (engl. *quorum sensing*, QS) tih vrsta omogućava tvorbu supragingivnog (zubnog plaka) i subgingivnog biofilma. Svaka promjena u homeostazi oralnog mikrobioma uzrokovana unutarnjim (npr. genetikom) ili vanjskim (npr. prehranom, otrovima, antibioticima) čimbenicima mogla bi povećati patološki potencijal oralne mikrobiote u smislu povećanja brojnosti patoloških bakterijskih vrsta pospješujući napredovanje oralnih bolesti [102,112]. Pri porodu ljudska je usna šupljina sterilna te je kolonizirana iz okoline nekoliko sati nakon rođenja. Međutim, teško je definirati točan sastav oralnog mikrobioma jer su usta izložena egzogenim bakterijama u hrani, vodi i zraku. Društveni kontakt i ljubljenje također mogu rezultirati promjenama u mikrobnoj zajednici. Populacije oralnih mikroba u početku se uglavnom sastoje od aeroba i obligatnih anaeroba koji se uglavnom odnose na rodove *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Neisseria* i pojedine kvasce. Nakon nicanja

zuba dominiraju anaerobni oblici *Segatella*, *Fusobacterium* itd., dok između desni i zuba *Streptococcus* spp. kao što su *S. parasanguis* i *S. mutans* koji rastu na caklini, a neki koloniziraju epitelne površine gingive i slinu. Tako u zdravoj usnoj šupljini nailazimo na: gram-pozitivne i gram-negativne bakterije, protozoe, viruse i gljive [127,128].

Tablica 1. Prikaz zdravog oralnog mikroba

Gram-pozitivni		Gram-negativni		Spirohete	Protozoe	Gljive
Koki	Štapići	Koki	Štapići			
<i>Abiotrophia</i>	<i>Actionomyces</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Treponema</i>	<i>Entamoeba gingivalis</i>	<i>Candida</i> spp.
<i>Peprostreptococcus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Capnocytophaga</i>		<i>Trichomonas tenax</i>	<i>Saccharomyxetales</i> spp
<i>Streptococcus</i>	<i>Cornynebacterium</i>	<i>Veillonella (kokobacil)</i>	<i>Desulfobacter</i>			
<i>Stomatococcus</i>	<i>Eubacterium</i>		<i>Desulfovibrio</i>			
	<i>Lactobacillus</i>		<i>Eikenella</i>			
	<i>Cutibacterium</i>		<i>Fusobacterium</i>			
	<i>Pseudoramibacter</i>		<i>Hemophilus</i>			
	<i>Rothia</i>		<i>Leptotrichia</i>			
			<i>Prevotella</i>			
			<i>Selenomonas</i>			
			<i>Simonsiella</i>			
			<i>Wolinella</i>			

Dobro je poznato da oralna mikrobiota predstavlja veću ksenografti-raznolikost u usporedbi s drugim mjestima, poput kože ili vaginalne mikrobiote, no pokazuje najnižu beta-raznolikost od ostalih dijelova tijela, što zapravo znači manje promjena u sastavu oralne mikrobiote između nepovezanih ispitanika [129].

Mikrobna raznolikost uzorka opisuje varijabilnost mikrobioma te se procjenjuje na temelju brojnosti i relativne zastupljenosti operativnih taksonomskih jedinica (engl. *Operational Taxonomic Units*, OTU). OTU predstavlja analitičku jedinicu u istraživanjima temeljenima na 16S rDNA sekvenciranju, pri čemu se sekvence grupiraju statističkim klasteriranjem kada je njihova međusobna sličnost visoka, najčešće $\geq 97\%$. Obilje, koje se često koristi kao sinonim za raznolikost, odnosi se na ukupan broj jedinstvenih OTU prisutnih

u uzorku, dok relativna zastupljenost označava udio pojedinih taksonomskih skupina u odnosu na ukupnu mikrobnu zajednicu. Razlike u sastavu mikrobioma analiziraju se procjenom alfa i beta raznolikosti. Filogenetska struktura mikrobnih zajednica procjenjuje se analizom alfa i beta raznolikosti. Alfa raznolikost izražava se parametrima poput Faithove filogenetičke raznolikosti, Shannonova indeksa, „evennessa“ te broja opaženih OTU-ova ili ASV-ova, dok se beta raznolikost procjenjuje primjenom Jaccardove, Bray–Curtisove i UniFrac distance, u težinskoj ili netežinskoj varijanti. Na temelju matrice udaljenosti QIIME 2 generira analizu glavnih koordinata (PCoA), kojom se u trodimenzionalnom prostoru prikazuje sličnost između uzoraka. Dodatno, rarefakcijska analiza omogućuje procjenu dubine sekvenciranja, odnosno utvrđivanje je li broj očitavanja bio dostatan za obuhvaćanje cjelokupne mikrobne raznolikosti uzorka.

Alfa-raznolikost omogućava uvid u razlike unutar uzorka uzimajući u obzir strukturu mikrobne zajednice u smislu broja taksonomskih skupina, njihove distribucije ili oboje. Alfa raznolikost mjeri raznolikost bakterijskih zajednica unutar pojedinog uzorka te može biti slična između uzoraka koji se razlikuju u taksonomskom sastavu. Za njezinu kvantifikaciju koriste se različiti procjenitelji raznolikosti, uključujući OTU, a u novije vrijeme i amplikonske sekvencijske varijante (engl. *amplicon sequence variant*, ASV). ASV predstavljaju jedinstvene sekvence koje se razlikuju u barem jednom nukleotidu te služe kao preciznije taksonomske jedinice.

Beta-raznolikost daje uvid u razlike između uzoraka uzimajući u obzir prisutnost/odsutnost određenih sekvenci ili njihovu relativnu brojnost. Obje razine mogu se predstaviti korištenjem različitih metrika, kao što su Shannonov indeks za alfa-raznolikost i Bray-Curtisova različitost za beta-raznolikost. Beta raznolikost omogućava usporedbu raznolikosti između uzoraka, pri čemu se rezultati izražavaju u obliku matrica udaljenosti između parova uzoraka. Za razliku od alfa raznolikosti, beta raznolikost može pokazivati značajne varijacije i u slučajevima kada je alfa raznolikost slična.

Kvantifikacija obje razine raznolikosti provodi se pomoću algoritama integriranih u bioinformatičke alate, uključujući QIIME i Mothur, kao i R pakete *vegan* i *phyloseq* [130–132].

1.12. Dentalni biofilm

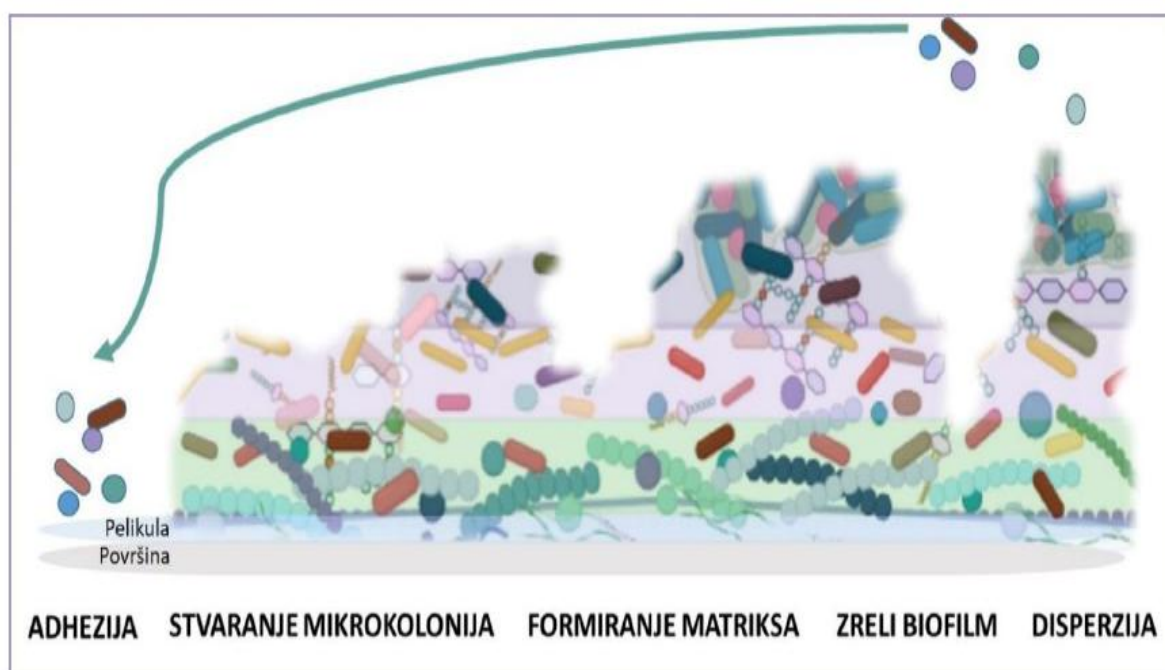
U usnoj šupljini biofilm je složena mikrobna zajednica koja prijanja uz površinu zuba i implantata [133]. Takav biofilm ima visoku gustoću mikrobnih stanica i obavljen je zaštitnim izvanstaničnim matriksom koji štiti mikroorganizme od neprijateljskog okruženja, omogućujući održavanje uravnoteženog ekosustava [134].

1.12.1. Stvaranje biofilma

Dentalni biofilm stvara se točno određenim kronološkim redom, s diskretnim stadijima mikrobne sukcesije [135]. Taj je mehanizam ključan za razumijevanje progresije parodontnih i periimplantantnih bolesti i stanja [136]. Prijanjanje bakterija na bilo koju površinu može se podijeliti u četiri faze: (1) transport do površine; (2) početna (slaba, reverzibilna) adhezija; (3) čvrsto vezanje i (4) razvoj biofilma [137]. Stadiji su vođeni mješavinom nespecifičnih i specifičnih interakcija, s nizom bioloških aktivnosti. Stvaranje dentalnog biofilma započinje stvaranjem stanične pelikule na svim biotičnim i abiotičkim površinama usne šupljine. Stvaraju je proteini sline koji adheriraju na površinu. Tijekom stadija rane kolonizacije površina je u velikoj mjeri kolonizirana gram-pozitivnim aerobnim bakterijama. U ovoj fazi prevladavaju *Streptococcus* vrste, osobito *S. oralis* i *S. mitis*, *Actinomyces naeslundii*, *Neisseria spp.* i *Veillonella parvula*. Takve bakterije počinju izlučivati izvanstanični polimerni matriks (engl. *extracellular matrix*; EPS) koji omogućuje da ostanu pričvršćene i vezane za staničnu pelikulu [137]. Kako biofilm raste i ulazi u međufaznu kolonizaciju, pojavljuju se premošćujuće vrste poput *Fusobacterium nucleatum*. Ti organizmi imaju važnu ulogu u koagregaciji ranih i kasnih kolonizatora povećavajući složenost i raznolikost zajednice biofilma. Kasni stadij kolonizacije odlikuje se širenjem patogenih gram-negativnih anaeroba. Prethodne kolonizacijske vrste osigurale su specifična vezna mjesta za vezanje drugih bakterijskih vrsta.

Ključni organizmi ove faze uključuju *Porphyromonas gingivalis*, *Segatella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola* i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Biofilm počinje sazrijevati u trodimenzionalnu strukturu i omogućuje bakterijama hranjive tvari, kisik, bakterijsku koagregaciju te heterogeni okoliš uz odgovarajući pH medij. U skladu sa svojim biokemijskim karakteristikama, obligatni anaerobni mikroorganizmi imaju

tendenciju da se pojavljuju interno, fakultativno ili obligatno aerobni mikroorganizmi skloni su pojavljivati se periferno, a mikroorganizmi koji konzumiraju ili proizvode isti metabolit skloni su pojavljivati se u neposrednoj blizini jedni drugima [138]. Kasni kolonizatori uglavnom su odgovorni za kroničnu upalu i resorpciju kosti koja se vidi kod parodontitisa i periimplantitisa. Nakon što biofilm sazrije odvajaju se njegovi slojevi te raspršuju u okoliš. Razumijevanje višeslojnog procesa kolonizacije ključno je za stvaranje ciljanih terapija za sprječavanje ili liječenje parodontitisa i periimplantitisa. Strategije koje inhibiraju ranu kolonizaciju ili ometaju prijelaz prema infekcijama u kasnom stadiju mogu biti posebno uspješne u očuvanju dugoročnog zdravlja i funkcije zuba i implantata [139] (Slika 5) .



Slika 5. Prikaz stvaranja biofilma u usnoj šupljini

1.13. Bakterijske interakcije tijekom stvaranja biofilma

Bakterijska međustanična komunikacija (engl. *quorum sensing*, QS) jedan od najvažnijih mehanizama za razvoj i održavanje biofilma te je široko rasprostranjen među brojnim bakterijama i gljivama. Takav sustav omogućuje međusobnu komunikaciju s pomoću signalnih molekula kao što su: peptidni autoinduktori, autoinduktori tipa 2 (AI-2), acil-homoserin-laktoni te gljivični QS mehanizmi. Peptidni autoinduktori čine temeljni oblik signalizacije QS u usnoj šupljini [55]. Zubni biofilmovi ističu se koagregacijom. To je složen proces koji omogućuje prijanjanje raznih bakterijskih vrsta na površinu zuba te njihovu metaboličku suradnju s različitim organizmima. Unutar takvih zajednica proizvodnja bakteriocina doprinosi očuvanju biološke raznolikosti te ekološke ravnoteže u mikrobiomu [140,141]. AI-2 signalni put koriste i bakterije *Streptococcus gordonii* i *Porphyromonas gingivalis* za vrijeme rasta biofilma u usnoj šupljini. Različite vrste streptokoka kao što su *S. mutans*, *S. gordonii* i *S. mitis* također proizvode signalne molekule quorum sensinga te tako reguliraju stvaranje biofilmova. Takva interakcija znatno doprinosi usklađenom suživotu brojnih mikrobnih vrsta unutar usne šupljine [142]. Važnu ulogu u regulaciji zubnih naslaga ima i *Streptococcus gordonii* koji osim što proizvodi vodikov peroksid ima i negativan utjecaj na rast patogenih bakterija. Utvrđeno je da su interakcije pronađene među različitim mikroorganizmima unutar oralnog biofilma vrlo složene i mogu biti antagonističke ili sinergističke [143]. Druga važna vrsta povezana s biofilmovima je *Actinomyces naeslundii*. Ona razgrađuje vodikov peroksid i pomaže rastu *S. gordonii* u nedostatku arginina. S druge strane, vodikov peroksid koji proizvodi *S. gordonii* fatalan je za rast *A. naeslundii* [129]. Druge takve interakcije također su otkrivene kod *Fusobacterium nucleatum* i *Streptococcus cristatus* gdje je prva bakterija pomogla *S. cristatus* u uspješnoj kolonizaciji epitelnih stanica. Međutim, *S. cristatus* smanjuje ekspresiju citokina koju pokreće *F. nucleatum* u epitelnim stanicama [140]. Veliku pozornost privlače i zajednice unutarstaničnih bakterija koje nastanjuju gingivalne i bukalne epitelne stanice usne šupljine. Smatra se da većina tih zajednica pokazuje potencijalno patogene svojstva, ali ne izaziva bolesti u zdravih ljudi.

1.14. Periimplantantne bolesti

Periimplantitis je bolest usne šupljine koja uzrokuje oticanje i bol u mekim i tvrdim tkivima oko zubnih implantata. Izvješće Američke akademije za paradontologiju iz 2017. kaže da je periimplantitis stanje u kojem se nakuplja plak i uzrokuje oticanje te postupni gubitak potpore kosti. Uobičajeni su simptomi crvenilo, krvarenje tijekom sondiranja, upala i gnojni iscjedak - koji nalikuju znakovima paradontitisa [144].

Periimplantantne bolesti su: periimplantatni mukozitis i periimplantitis. Mukozitis je lezija u kojoj je periimplantantna mukoza upaljena, ali nema povezanog gubitka kosti. Crvenilo i otekline mukoze su pokazatelji bolesti uz krvarenje pri sondiranju. Periimplantitis je kasnija faza periimplantantne bolesti. Ona ne utječe samo na mukozu, nego se širi i na kost koja podupire implantat te s vremenom uzrokuje gubitak kosti. Gubitak kosti oko zubnog implantata koji se ne može popraviti ono je što karakterizira periimplantitis. Neki od znakova su bolnost, krvarenje, gnoj koji izlazi mukoze. Periimplantitis se teško liječi, a često je potrebna operacija kako bi se riješila i bolest mekog tkiva i gubitak kosti [145].

1.15. Mikrobiom periimplantitisa

Upalna destrukcija tkiva oko implantata, uzrokovana stvaranjem biofilma na površini implantata - periimplantitis, ozbiljna je komplikacija dentalnih implantata. To je bolest paradontitisa, koji zahvaća prirodne zube. Ključna je iznimka česta prisutnost velikog broja stafilokoka i crijevnih bakterija u slučajevima periimplantitisa. Postoji sedam najčešćih vrsta koje se povezuje s bolestima [146]. To su *Staphylococcus epidermidis*, koji može stvarati biofilme na površinama implantata; *Fusobacterium nucleatum*, organizam koji premošćuje biofilme; *Treponema denticola*, invazivni patogen sposoban izazvati snažan imunološki odgovor i upalu; *Tannerella forsythia*, koja doprinosi persistentnoj infekciji i upali; *Segatella intermedia*, povezana s akutnim i teškim kliničkim stanjima; te *Porphyromonas gingivalis*, značajan patogen koji remeti imunološki odgovor domaćina i tako potiče disbiozu oralnog mikrobioma. Te bakterije prisutne su na mjestima kompromitiranih implantata, što sugerira važnu korelaciju s patofiziologijom periimplantitisa. Kod periimplantitisa, poremećen je mikrobiom oko implantata jer zajednice bakterija nisu

uravnotežene (u stanju su takozvane disbioze). To stvara periimplantantni sulkus koji je uvijek otečen i ima patološke proliferatore koji se ne nalaze u zdravim zubima. Taj poremećeni mikrobiom pogoršava gubitak kosti, što otežava funkcioniranje i dobar izgled oseointegriranih implantata [147].

1.16. Mikrobiom parodontitisa

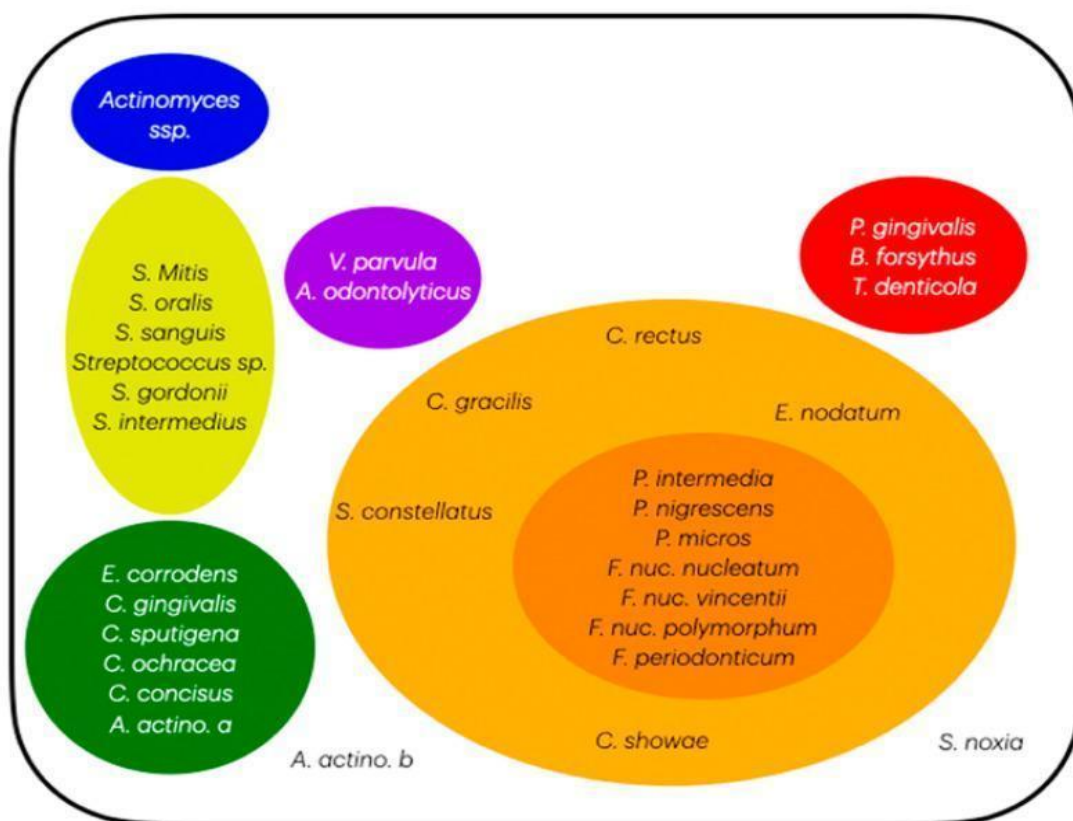
Produbljeni džepovi i anaerobna okružja koja podržavaju složene bakterijske, gljivične i virusne biofilmove uzrokuju parodontitis. Gram-negativni anaerobi poput *A. actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga spp.*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *T. maltophilum* i *P. gingivalis* dominirali su submukoznom florom, što je u početku uspoređivano s parodontitisom. Sofisticiranim molekularnim tehnikama otkriveni su i drugi oportunisti, poput *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Peptostreptococcus* vrsta, *Neisseria spp.*, *Porphyromonas endodontalis*, *Lactococcus lactis*, *Filifactor alocis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* vrsta, *Helicobacter pylori* i vrsta *Candida*. Trećina lokacija ima koinfekcije Epstein-Barrovim virusom i humanim citomegalovirusom, što može smanjiti lokalni imunitet i potaknuti razvoj patogena [148].

1.17. Parodontni patogeni

Prema Socranskyju i suradnicima [149], u parodontnim bolestima može se pronaći pet (5) glavnih mikrobnih kompleksa (crveni, narančasti, žuti, zeleni i ljubičasti). Prvi kompleks (crveni) sastojao se od usko povezane skupine: *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* i *Treponema denticola*. Drugi kompleks (narančasti) sastojao se od usko povezane osnovne skupine koja uključuje članove podvrste *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*, *Seagrella intermedia*, *Segatella nigrescens* i *Parvimonas micra*. Vrste povezane s ovom skupinom uključivale su *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Streptococcus constellatus* i *Campylobacter gracilis*. Treći kompleks (žuti) sastojao se od

Streptococcus sanguis, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii* i *S. intermedius*. Četvrti kompleks (zeleni) sastojao se od triju (3) vrsta: *Capnocytophaga* (gingivalis, ochracea, sputigena), *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* i *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotipa a. Peti kompleks (ljubičasti) sastojao se od *Veillonella parvula* i *Actinomyces odontolyticus*. *A. actinomycetemcomitans* serotipa b, *Selenomonas noxia* i *Actinomyces naeslundii* *genospecies* 2 (*A. viscosus*) bili su netipičnih vrijednosti s malom povezanošću jedan s drugim i s pet glavnih kompleksa.

Crveni je kompleks najviše istraživao u parodontnim džepovima i korijenskim kanalima zbog svoje visoke patogenosti te je izrazito povezan s kliničkim simptomima parodontalne bolesti, posebno dubinom džepa i krvarenjem pri sondiranju. Međutim, narančasti kompleks također može imati visoku prevalenciju. Mikrobiološke studije parodontnih džepova uz korijenske kanale zuba s endodontsko-parodontalnim lezijama sugerirale su prevalenciju vrsta prisutnih u tim specifičnim kompleksima. Crveni i narančasti kompleksi karakteriziraju se prisutnošću anaerobnih gram-negativnih bakterija s faktorima virulencije odgovornim za razvoj ili održavanje upalnog procesa. Stoga identifikacija tih mikrobnih kompleksa u endodontsko-parodontalnim lezijama može pokazati mogu li specifične bakterije biti povezane s težinom patologije i komplikacijama liječenja [150] (Slika 6)



Slika 6. Prikaz mikrobijalnih kompleksa prema Sigmundu Socranskyju

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovog istraživanja bio je analizirati broj i vrstu bakterija u dentalnom biofilmu membrana Cytoplast™ i Permamem® te ispitati povezanost bakterijskih vrsta s količinom novostvorene kosti i rezidualnim biomaterijalom.

Pojedinačni ciljevi:

1. Odrediti vrijednosti dimenzija alveolarnog grebena prije ekstrakcije zuba i nakon završetka postupka očuvanja alveole (od 4 do 6 mjeseci).
2. Analizirati broj i vrstu mikroorganizama adheriranih na membranama (aerobi, anaerobi i streptokoki).
3. Odrediti ukupni bakterijski DNK iz suspenzije biofilma membrane d-PTFE i iz ukupnog bakterijskog DNK kvantificirati određene vrste oralnih streptokoka i parodontopatogena.
4. Odrediti količinu novostvorene kosti i rezidualnog biomaterijala nakon završetka postupka očuvanja alveole.
5. Usporediti mikrobiološku kolonizaciju i sastav biofilma na različitim membranama d-PTFE primjenom sekvencioniranja 16S rRNK.

HIPOTEZA

Zbog razlike u fizikalnim svojstvima membrana Permamem® i Cytoplast™ te zbog *in vitro* utvrđene razlike adhezije oralnih bakterija na te membrane, pretpostavljalo se da je prisutnost oralnih streptokoka i parodontopatogenih bakterija bila različita tijekom njihove primjene u postupku očuvanja alveole. Osim toga, pretpostavljalo se da ishod koštane regeneracije ovisi o vrsti i relativnoj količini bakterija iz dentalnog biofilma.

3. MATERIJAL I METODE RADA

3.1. Ispitanici istraživanja

Ovo je istraživanje randomizirano kliničko istraživanje. U njemu je sudjelovalo 48 ispitanika. Ispitanici su bili podijeljeni slučajnim odabirom u dvije skupine; u prvoj skupini od 24 ispitanika postupak očuvanja alveole je proveden primjenom mješavine goveđeg koštanog biomaterijala Cerabona i autologne kosti uz upotrebu d-PTFE membrane - Permamem®, a u drugoj skupini od 24 ispitanika isti postupak je proveden primjenom iste mješavine biomaterijala, ali je augmentirano mjesto pokriveno drugom vrstom d-PTFE membrane - Cytoplast™. U svih ispitanika koji su sudjelovali u ovom istraživanju bila je indicirana ekstrakcija zuba te terapijsko liječenje očuvanja alveole zbog planiranog nadomještanja zuba.

Ispitanici uključeni u istraživanje bili su punoljetne osobe muškog i ženskog spola kojima je bila indicirana ekstrakcija zuba zbog:

- 1) vertikalne frakture zuba
- 2) horizontalne frakture zuba apikalnije od 2mm od granice gingive
- 3) nemogućnosti endodontskog liječenja zuba ili provođenja druge konvencionalne metode terapije.

Iz istraživanja su bili isključene:

- 1) osobe zračene u području glave i vrata
- 2) osobe na intravenskoj ili peroralnoj terapiji bisfosfonatima
- 3) trudnice i dojilje
- 4) osobe s neliječenom parodontnom bolesti
- 5) osobe s nekontroliranom šećernom bolesti
- 6) osobe na imunosupresivnoj terapiji
- 7) osobe na dugotrajnoj terapiji kortikosteriodima
- 8) osobe kod kojih se dogodila resorpcija više od 50% visine bukalne koštane stijenke zubne alveole
- 9) osobe s defektom oralne koštane stijenke

10) osobe koje puše više od 10 cigareta dnevno.

U ovom istraživanju nije bilo kontrolne skupine ispitanika jer su klinička iskustva i dosadašnja istraživanja pokazala da se alveolu ne smije ostaviti da zacijeli *per primam* s obzirom na to da tada dolazi do atrofije alveolarnog grebena.

3.2. Etički aspekti istraživanja

Ovo randomizirano kontrolirano ispitivanje provedeno je u skladu s Helsinškom deklaracijom. Etički odbor Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci (klasa: 003-05/20-1/151, br. 2170/29-02/1-20-2) odobrio je studiju na ljudskim sudionicima koji su bili spremni dati informirani pristanak. Ova studija provedena je u skladu s etičkim standardima i odobrena je kao randomizirano kontrolirano ispitivanje, registrirano na ClinicalTrials.gov (NCT06694844). Ova studija pridržavala se smjernica CONSORT-a za izvještavanje o randomiziranim kontroliranim ispitivanjima. Povjerljivost sudionika strogo je održavana tijekom cijelog istraživanja. Prije uključivanja svaki je sudionik primio sveobuhvatne pisane i usmene informacije s detaljnim opisom ciljeva, metodologije i planova za diseminaciju rezultata istraživanja. Svi sudionici dobrovoljno su pristali sudjelovati nakon što su bili potpuno upoznati s postupcima i zahtjevima istraživanja te je dobiven informirani pristanak.

3.3. Veličine uzorka

Izračun najmanje potrebne veličine uzorka na temelju preliminarnih mjerenja i dosadašnje literature [77,151–154] pokazuje da je najmanja potrebna veličina uzorka u svakoj skupini 24 ispitanika uz snagu testa 80% i razinu značajnosti 0,05. Izračun je učinjen u programu Statistica s pomoću testa Power Analysis na osnovu srednjih vrijednosti i standardne devijacije.

3.4. Standardni kirurški protokol očuvanja alveole

Nakon što je liječnik postavio indikaciju za ekstrakciju zuba, prije njegova samog vađenja, pacijentu je snimljena čeljust s pomoću uređaja Cone Beam kompjuterizirane tomografije s konusnim snopom (engl. *cone beam computed tomography*, CBCT), (A 300 Morita, Kyoto, Japan) te se izmjerila dimenzija alveolarnog grebena čeljusti.

Prije operacije svim sudionicima mehanički su uklonjeni plak i kamenac te su upućeni u postupke oralne higijene. Sat vremena prije operativnog zahvata primijenjen je oralni antibiotik (Klavocin[®] bid 1000 mg, Pliva, Zagreb, Hrvatska, ili Clindamycin MIP[®] 600 mg, Chem. Pharm. Fabrik GmbH, Ingbert, Njemačka, za pacijente alergične na penicilin). Osim toga, pacijenti su prije operacije isprali usta 0,2-postotnom otopinom klorheksidin-diglukonata (Parodontax[®] 0,2%, Brentford, London, UK).

Regija zuba za ekstrakciju (Slika 7A) i regija iz koje se uzimalo autologno koštano tkivo bili su anestetizirani lokalnim anestetikom, 4-posto-tnim artikain-hidrokloridom s adrenalinom u koncentraciji 1:200 000 (Ubistesin[®] Forte, 3M, Neuss, Njemačka). Nakon bezbolne ekstrakcije zuba, pri čemu se nije očekivala komplikacija, izljuštio se upalni sadržaj unutar alveole te se provjerila očuvanost koštanih stijenki s pomoću sonde (15 UNC Color- Coded, Hu-Friedy, Chicago, SAD). Na mjestu ekstrakcije vestibularno je odignut režanj pune debljine koji je uključivao susjedni mezijalni i distalni zub (intrasulkularne incizije i incizije kroz papilu) (Slika 7B).

Donorsko mjesto iz kojeg se uzela autologna kost pripremljeno je odizanjem režnja pune debljine u području retromolarne regije. Nakon toga prikupila se kost, ili s pomoću strugača za kost Safescraper[®] Twist (Geistlich Bone Harvesting Instruments, Basel, Švicarska), ili s pomoću svrdla za prikupljanje autologne kosti Bonesier (Jeil medical corporation, Seoul, Južna Koreja). Na kraju se mjesto reza sašilo uobičajenim postupkom (Slika 7D).

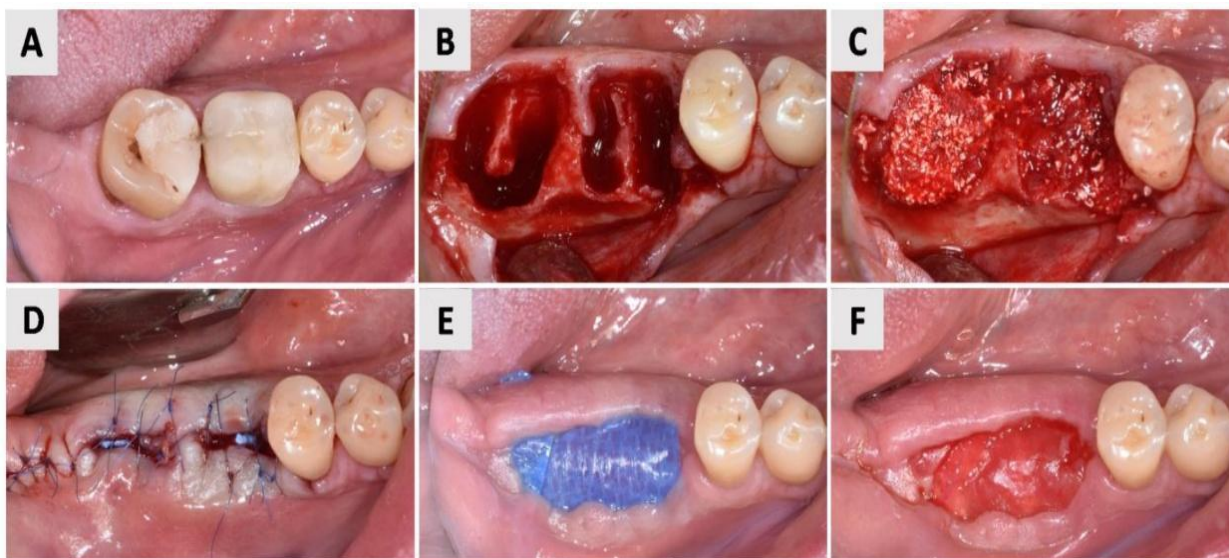
U ovo istraživanje bile su uključene dvije skupine pacijenata s indikacijom za postupak očuvanja alveole: pacijenti s očuvanim koštanim stijenkama alveole i pacijenti kod kojih postoji resorpcija dijela bukalne stijenke alveole. S obzirom na nalaz stanja alveolarne kosti i očuvanosti stijenki daljnji se kirurški postupak očuvanja alveole razlikovao u ova dva slučaja:

1. U slučaju kada je alveola iz koje je ekstrahiran zub imala očuvane koštane stijenke, u alveolu se postavio goveđi koštani biomaterijal s autolognom kosti. Zatim se biomaterijal pokrio jednom od sintetskih membrana d-PTFE. Mješavina goveđeg koštanog biomaterijala s alveolarnom kosti je pripremljena u omjeru 50:50. Tijekom kirurškog postupka dno i središnji dio alveole ispuni se sve do razine gornjeg ruba bukalne stijenke alveole. Membrana se postavila ispod bukalnog i oralnog režnja mekog tkiva, koji su ranije odignuti, a prekrivena je 3-5 mm gornjeg dijela koštane stijenke. U središnjem dijelu membrana je ostala izložena, bez pokušaja pomicanja režnja sluznice kako bi se dobilo primarno cijeljenje mekog tkiva.

2. U slučaju kada se nakon ekstrakcije zuba utvrdi vertikalna resorpcija dijela bukalne stijenke alveole, prvo se stabilizirala tako da membrana pokrije minimalno 3 mm ostatke bukalne stijenke apikalno, distalno i mezijalno od koštanog defekta. Šupljina zubne alveole bila je ispunjena mješavinom goveđeg koštanog biomaterijala i autologne kosti na način da su dno i središnji dio alveole ispunjeni autolognom kosti, a od razine oštećenja bukalne stijenke stavlja se mješavina goveđeg koštanog biomaterijala s autolognom kosti do razine gornjeg ruba lingualne stijenke. Završno, membrana se stabilizirala na lingulanoj površini alveolarne kosti (Slika 7C).

Pacijentima je savjetovano da nastave uzimati antibiotik prema uputama proizvođača te analgetik Brufen tbl. od 600 mg prema potrebi, odnosno kad nastupi bol, do ukupne maksimalne dnevne doze od 1200 mg. Također se preporučilo korištenje tekućine za ispiranje usta na bazi klorheksidina.

Nakon dva tjedna od kirurškog zahvata uklonili su se šavovi (Slika 7E), a nakon četiri tjedna i membrana (Slika 7F). Poslije 4-6 mjeseci cijeljenja alveolarnog grebena učinjena je nova CBCT snimka područja očuvanja alveole kako bi se procijenila visina alveolarnog grebena nakon cijeljenja, odnosno prije ugradnje dentalnog implantata. Ako je postignuta odgovarajuća visina alveolarnog grebena, pri prepariranju ležišta za dentalni implantat, s pomoću svrdla trepan promjera od 2,3 do 2,8 mm (Helmut Zepf, Seitingen-Oberflacht, Njemačka) uzet je uzorak koštanog tkiva.



Slika 7. Kliničke faze kirurškog postupka

(A) Početna klinička situacija: okluzalni aspekt zuba kod kojih je indicirana ekstrakcija, zubi 46 i 47 (sustav notacije FDI). Zubi se nisu mogli restaurirati zbog neizlječivih periapikalnih lezija. **(B)** Postekstrakcijske alveole zuba 46 i 47, s minimalno podignutim režnjem koji otkriva defekt bukalne kosti. **(C)** Alveole su ispunjene kompozitnim koštanim nadomjestkom koji se sastoji od autologne kosti i goveđim koštanim nadomjestkom (Cerabone[®], Botiss biomaterials, GmbH, Zossen, Njemačka). **(D)** Budući da je pacijent dodijeljen skupini P, postavljena je membrana d-PTFE (Permamem[®], Botiss biomaterials, Zossen, Njemačka) kako bi se prekrila ekstrakcijska alveola i defekt bukalne kosti, pri čemu je režanj repozicioniran i učvršćen šavovima, ostavljajući dio membrane namjerno izloženim. **(E)** Mjesto zacjeljivanja četiri tjedna nakon očuvanja alveole i prije uklanjanja membrane. **(F)** Nakon uklanjanja membrane, pseudoperiost koji prekriva dio grebena ekstrakcijske alveole ostavljen je izložen čime je omogućen nastavak zacjeljivanja do ugradnje implantata nakon šest mjeseci.

3.5. METODE ISTRAŽIVANJA

3.5.1. Kompjuterizirana tomografija s konusnim snopom (engl. cone beam computed tomography, CBCT)

Prije ekstrakcije zuba te 4-6 mjeseci nakon augmentacije alveole ispitanicima se napravila CBCT analiza snimanjem regije u kojoj se nalazi zub koji je bio indiciran za ekstrakciju. Snimanje se napravilo s pomoću uređaja (A 300 Morita, Kyoto, Japan) te su se analizirale dimenzije alveolarnog grebena prije i nakon provedenog zahvata u programu za obradu.

3.5.2. Određivanje ukupnog broja bakterija

Nakon što su se prikupili uzorci membrana Permamem® (Botiss biomaterials, Zossen, Njemačka) i Cytoplast™ (Osteogenics Biomedical, Texas, SAD) u transportnom mediju dostavili su se na Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci radi daljnje obrade.

Membrane su tri puta isprane sterilnom fiziološkom otopinom, a potom su bakterije oslobođene iz biofilma korištenjem ultrazvučne kupelji (Bactosonic, Bandelin, Njemačka) pri frekvenciji od 40 kHz tijekom jedne minute. Na taj je način dobiven sonikat membrane d-PTFE, koji je dalje korišten za pripremu deseterostrukih razrjeđenja i nasađivanje na selektivne podloge radi izolacije bakterija adheriranih na membranu.

Hranjivi mediji za uzgoj bakterija su:

- krvni agar (Biolofo, Italija) s dodatkom ovčje krvi (Biognost, Hrvatska)
- Difco Mits Salivarius agar (BD, SAD) s dodatkom otopine BBL Chapman Tellurite (BD, SAD)

Očitava se broj (CFU/ml) anaerobnih nakon 48 sati te aerobnih bakterija i streptokoka nakon 24 sata.

3.5.3. Ekstrakcija nukleinskih kiselina DNK

Kako bi se izbjegla kontaminacija tijekom pripreme i izolacije DNK, svi su postupci izvedeni u sterilnim uvjetima. Osoblje zaduženo za pripremu, izolaciju i mjerenje koncentracije strogo je poštovalo protokole, koristeći se novom sterilnom opremom za svaki korak. Posebna pozornost posvećena je zaštitnoj opremi, uključujući rukavice, laboratorijske kute i maske. Da bi se smanjio rizik od zamjene uzoraka, rad je proveden u malim serijama, pri čemu su se u svakom krugu ekstrakcije obrađivala samo dva uzorka. Koraci centrifugiranja provedeni su u velikoj centrifugi (Eppendorf SE, Hamburg, Njemačka), uz maksimalni razmak između uzoraka. Epruvete su bile zatvorene te su se otvarale isključivo pri dodavanju izolacijskih pufera, a svi pipetni koraci izvedeni su unutar laminarnog protoka (LANXESS AG, Köln, Njemačka). Korišteni su certificirani reagensi, prethodno pripremljeni u alikvotama, a za svaki ciklus korišten je novi alikvot za ekstrakciju DNK. Izolirani DNK pohranjen je u zatvorenim sterilnim epruvetama kako bi se spriječila kontaminacija, a njihovo ponovno otvaranje svedeno je na minimum radi smanjenja mogućnosti izlaganja. DNK je izoliran iz prikupljenih uzoraka sonikata membrana s pomoću kita Nucleospin Tissue (Macherey Nagel, Duren, Njemačka) po modificiranom protokolu za bakterije. Uzorci sonikata u 1,5 ml epicama, centrifugirani su 15 min /15000 rpm, te je odstranjen supernatant i ostavljeno oko 50 µl sedimenta. Sediment se potom resuspendirao u 250 µl pripremljenog G+ lizirajućeg pufera pripremljenog prema modificiranom protokolu proizvođača za bakterije sastava 20 mM Tris/HCl, 2 mM etilendiamintetraoctene kiseline (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*; EDTA), 1% Triton X-100, pH 8). Sve je skupa vorteksirano te dodano 40 µl svježe pripremljene otopine lizozima (također prema uputi proizvođača). Slijedila je inkubacija na 37 °C/1 h, dodatak 30 µl proteinaze K te inkubacija na 56 °C/2 h. Nakon inkubacije u uzorak je dodano 400 µl pufera B3 te se vorteksiralo i još jednom inkubiralo na 70 °C/15 min. Nakon toga je precipitiran DNK s 400 µl ohlađenog 98-postotnog etanola. Zatim se slijedio protokol proizvođača te na finalnom koraku smanjio elucijski volumen na 50 µl pufera BE. Koncentracija i čistoća genomskog DNK određena je s pomoću Qubit fluorometra (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

1. Priprema uzorka 2. Predliza uzorka	 250 μL G+ lizirajućeg pufera 40 μL lizozima 30 μL proteinaza K 56 °C/2 h
3. Liza uzorka	 400 μL B3 70 °C/15 min
4. Precipitacija DNK	 400 μL 98% etanola
5. Vezanje DNK	  11000 x g 1 min
6. Ispiranje silikatne membrane	 1. ispiranje 500 μL BW 2. ispiranje 600 μL B5 1st and 2nd  11000 x g 1 min
7. Sušenje silikatne membrane	 11000 x g 1 min
8. Elucija DNK	  50 μL BE (70 °C) RT 1 min 11000 xg

Slika 8. Protokol izolacije bakterijskog DNK iz membrana s pomoću NucleoSpin Tissue

3.5.4. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. real-time quantitative, RT-qPCR)

Tehnikom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (RT-qPCR) na uređaju Applied Biosystems 7500 fast real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, SAD) s pomoću specifičnih metoda TaqMan (Applied Biosystems) kvantificirana je relativna količina bakterija u uzorcima sonikata membrana, koje su važne za kariogeni potencijal (gram-pozitivni fakultativni anaerobi *Streptococcus mutans* i *Streptococcus sobrinus* kao bakterije visokog rizika za razvoj karijesa te *Streptococcus salivarius* kao njihov antagonist). Također su analizirani gram-negativni anaerobi *Veillonella parvula* i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* kako bi se opisale interakcije u biofilmu te poveznica s progresijom parodontnih i periimplantantnih bolesti. Specifična metoda Taqman za kvantifikaciju gena 16s rRNK korišten je kao ekvivalent ukupnih bakterija prisutnih u dentalnom biofilmu. Početnice i metoda TaqMan bili su specifični za glikoziltransferazni *gtfB* gen (*S. mutans*) i *gtfT* gen (*S. sobrinus*), transpozazni *tnpA* gen (*S. salivarius*), RNK polimerazni B *rpoB* gen (*V. parvula*) te leukotoksinski *lktA* gen (*A. actinomycetemcomitans*). Za kvantifikaciju ukupnih bakterija odabrana je konzervirana regija gena 16s rRNK (1) (Tablica 2).

Tablica 2. Sekvence početnica i proba

Vrsta bakterija	sekvence	Target	Assay ID
<i>S. mutans</i>	F 5' GCCTACAGCTCAGAGATGCTATTCT 3' R 5' GCCATACACCACTCATGAATTGA 3' Proba 5' TGGAAATGACGGTCGCCGTTATGAA 3'	<i>gtfB</i>	APWCYCU
<i>S. sobrinus</i>	F 5' TTCAAAGCCAAGACCAAGCTAGT 3' R 5' CCAGCCTGAGATTCAGCTTGT 3' Proba CCTGCTCCAGCGACAAAGGCAGC 3'	<i>gtfT</i>	APXGTWR
<i>S. salivarius</i>	F 5' CACGCCATGCTGGAAGTG 3' R 5' GCGATGAGCCAAGCTGAAG 3' Probaj 5 'TTAGCTGCTGCGTAGACTTCGTCT 3'	<i>tnpA</i>	APYMMG N
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	F 5' CAGCATCTGCGATCCCTGTA 3' R 5' TCAGCCCTTTGTCTTTCCTAGGT 3' Proba TCGAGTATTCCCTCAAGCATTCTCGCACG 3'	<i>lktA</i>	APKA6FU
<i>V. parvula</i>	Custom TaqMan metoda, sekvenca nije dostupna	<i>rpoB</i>	APEPVGY
Ukupne bakterije	F 5' CGCTAGTAATCGTGGATCAGAATG 3' R 5' TGTGACGGGCGGTGTGTA 3' Probasonda CACGGTGAATACGTTCCCGGGC 3'	<i>16s</i> <i>rRNA</i>	APZTF2K

Reakcijska smjesa za RT-qPCR (20 μ L) sadržavala je 10 μ L TaqMan Master Miksa, 1 μ L pojedinačnog Custom TaqMan metode (za svaku od odabranih bakterija), 4 μ L vode i 5 μ L uzorka DNK razrijeđenog na 0,5 ng/ μ l. Korištena TaqMan metoda obuhvaćala je specifične, po narudžbi dizajnirane, početnice za amplifikaciju *gtfB*, *gtfT*, *tnpA*, *lktA* i *rpoB* gena te gena za *16s rRNA* kao kontrolu. Uz navedeno, esej je imao i po narudžbi dizajniranu fluorescentno označenu sondu TaqMan s vezanom bojom FAM i prigušivačem Q. Uvjeti reakcije RT-qPCR-a na instrumentu 7500 Fast Real-Time PCR System bili su: inkubacija na 95 °C /10 min za aktivaciju Taq DNK polimeraze, zatim 95 °C/15 s za DNK denaturiraciju te 60 °C /1 min za vezanje početnica i ekstenziju. Uzorak se amplificirao kroz 50 ciklusa. Upotrebljavale su se pločice od 96 jažica u koje su pipetirani triplikati otopina za svaku pojedinačnu bakteriju, te kontrola bez predloška (*non-template control*) za sve gene.

Detekcija i kvantifikacija amplificiranih gena pojedinačnih bakterija te ukupnog 16srRNA, mjerile su se promjenom fluorescentnog signala specifično dizajniranih TaqMan sondi. Fluorescencija nastaje nakon hibridizacije te hidrolize probe na ciljnom mjestu nukleinske kiseline, stoga povećanje razine fluorescencije predstavlja razinu umnoženih gena. Rezultati se detektiraju s pomoću granične vrijednosti (vrijednosti *threshold* – Ct-vrijednost, iz engl. *threshold cycle*) koja označava dovoljnu razinu fluorescencije nužnu za detekciju svakog uzorka, te se uvijek postavlja u eksponencijalnoj fazi amplifikacije produkta RT-qPCR-a. Kada se umnoži dovoljno DNK traženog gena, detektira se fluorescentni signal, a Ct je ciklus umnažanja ili amplifikacije u kojem se ta detekcija fluorescentnog signala dogodila. Veća Ct-vrijednost znači manju početnu količinu kopija traženog gena u uzorku i obrnuto, manja Ct-vrijednost znači veću početnu količinu kopija traženog gena u uzorku.

Za izračunavanje relativne količine različite bakterijske populacije u odnosu na ukupnu bakterijsku masu upotrebljavala se delta Ct. Δ Ct je izračunat kao razlika između Ct-vrijednosti za određenu skupinu bakterija i Ct-vrijednosti za ukupnu količinu bakterija (ekvivalent 16s rRNA). Metodom $2^{\Delta Ct}$ koristilo se za izračun relativne količine različite bakterijske populacije u odnosu na ukupnu bakterijsku masu.

3.5.5 Histološka bojenja

3.5.5.1. Hematoksilin i eozin (HE)

Koštani uzorci dekalcinirani su u otopini Ostefast 2 (Biognost, Zagreb, Hrvatska) i uklopljeni u parafinske blokove. Tkivni rezovi za histološka bojenja rezani su s pomoću mikrotoma (Leica RM2155, Austria) opremljenim nožem za meka tkiva na debljinu 3-5 μm . Rezovi su deparafinizirani u otopini ksilola te su rehidrirani u nizu etilnih alkohola padajućih koncentracija (100%, 96% i 75%) po 10 minuta. Zatim je slijedio postupak ispiranja tkiva destiliranom vodom i bojenje hamatoksilinom (Shandon Instant Hematoxylin, Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, SAD) 10 minuta. Nakon ispiranja (tekuća voda 10 minuta) rezovi su bojeni eozinom (Shandon Instant Eosin-Y, Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, SAD) 5 min, zatim kiselim alkoholom (HCL-etanol) te ponovo ispirani (tekućom vodom sljedećih 10 minuta i destiliranom vodom 5 minuta). Nakon ispiranja tkivo je prolazilo proces dehidracije: uranjanjem u alkohole rastućih koncentracija, bistrenje u ksilolu te uklapanje u Entellan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MD, SAD). Kao rezultat bojenja hematoksilin-eozinom vidljivo je plavo obojenje jezgara te ružičasto obojenje citoplazme i dijela međustanične tvari.

3.5.6. Koštana histomorfometrija

Na tkivnim rezovima koji su obojeni metodom HE provedena je metoda koštane histomorfometrije. S pomoću svjetlosnog mikroskopa Olympus BHA (Olympus, Tokyo, Japan) na koji je adaptirana digitalna kamera Sony (Sony, Yokohama, Kanagawa) dobivene su mikrofotografije tkivnih rezova. Mikrofotografije tkivnih rezova analizirane su s pomoću računalnog programa za obradu slike (VAMS, Zagreb, Hrvatska) kako bi se kvantificirale vrijednosti histomorfometrijskih parametara: obujam kosti (BV/TV; %) i rezidualni biomaterijal (RB; %).

3.5.7. Skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. scanning electron microscopy, SEM)

Radi procjene bakterijske adherencije na membrane d-PTFE, uzorci s malim komadićima membrane, odsječenim tijekom uklanjanja, pripremljeni su za SEM analizu odmah nakon ekstrakcije. Membrane su isprane sterilnom fosfatno-puferskom otopinom (PBS) te su sušene na zraku u visokopropusnoj sterilnoj komori (Ehret Bioban 190, Freiburg, Njemačka). Fiksacija uzoraka provedena je uranjanjem membrana u otopinu od 4% glutaraldehida i 0,5% paraformaldehida (Sigma-Aldrich, Burlington, SAD) u 0,1 M puferu PBS (pH 7,2) (Sigma-Aldrich, Burlington, SAD) na 4 °C tijekom 30 minuta. Taj korak fiksacije očuvao je bakterijske stanice i strukturu membrane osiguravajući stabilnost tijekom pripreme za SEM analizu. Nakon fiksacije uzorci su podvrgnuti postupnom dehidriranju uranjanjem u rastuće koncentracije etanola (50%, 70%, 80%, 90% i 100%), pri čemu je svako uranjanje trajalo 20 minuta. Taj korak uklanja vodu iz uzoraka da bi se spriječile morfološke promjene tijekom SEM snimanja u visokom vakuumu. Svaka membrana zatim je montirana na držač uzoraka s pomoću vodljive ugljične trake. Kako bi se poboljšala površinska vodljivost i spriječilo nakupljanje naboja pod utjecajem elektronskog snopa u visokom vakuumu, nanesen je tanki sloj zlato-paladija debljine 15 nm s pomoću preciznog sustava za oblaganje (PECS II, Gatan Inc., Pleasanton, SAD). Konačno, SEM snimke napravljene su mikroskopom Jeol JSM-7800F s emisijom polja (JEOL Ltd., Tokio, Japan) pri ubrzanom naponu od 7 kV i radnoj udaljenosti od 10 mm. Na snimkama nije provedena nikakva naknadna obrada, te su u radu prikazane u izvornom, nemodificiranom obliku.

3.5.8. Sekvencioniranje nove generacije (engl. next-generation sequencing technology, NGS)

Sekvenciranje uzoraka provedeno je u laboratoriju Molecular Research (MRDNA) u Teksasu, u SAD-u, koristeći se sekvencerom Illumina za *pair-end* sekvenciranje regija V3 i V4 gena 16S rRNK. U tu svrhu korišten je set primera 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') i 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3'). Podaci sekvenciranja preuzeti su s platforme Illumina's BaseSpace Sequence Hub u formi *pair-end*, demultipleksirane datoteke fastq. Obrada podataka provedena je korištenjem softverskog paketa Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2 (QIIME2). Obrada je uključivala filtriranje i *denoising* putem programa DADA2, spajanje sekvenci (s obzirom na to da je korišteno *pair-end* sekvenciranje) i kontrolu prisutnosti mogućih kimera. Za taksonomsko određivanje mikroorganizama primijenjen je alat Naive Bayes classifier u QIIME2, prilagođen za rad s bazom podataka SILVA, verzija 138. Sekvence su grupirane prema kriteriju od 99% sličnosti.

Analiza alfa i beta-raznolikosti provedena je s pomoću biblioteka seaborn, matplotlib, pandas i matplotlib korištenjem programskog jezika Python, verzija 3.12, unutar okruženja PyCharm. Za izračun alfa-raznolikosti korišten je indeks Shannon, a beta-raznolikost analizirana je korištenjem metrike Bray-Curtis [155,156].

Grafički prikazi mikrobnih vrsta izrađeni su korištenjem programskog jezika Python, verzija 3.12, unutar okruženja PyCharm. Za izradu grafika korištene su taksonomske tablice OTU generirane na temelju dobivenih podataka sekvenciranja.

3.6. Statistička obrada podataka

Podaci prikupljeni tijekom istraživanja analizirani su korištenjem konvencionalnih metoda deskriptivne statistike. Normalnost distribucije podataka procijenjena je s pomoću dijagrama QQ. Za provedbu većine analiza korišten je programski jezik Python, verzija 3.12, pri čemu su se unutar okruženja PyCharm koristile biblioteke pandas, seaborn i matplotlib. Dodatne statističke analize provedene su u programskom jeziku R, verzija 4.4.2, koristeći se paketom ALDEx2 (Analysis of Differential Abundance Taking Sample Variation Into Account). Za usporedbu rezultata mjerenja CFU/ml za ukupne bakterije, aerobe, streptokoke i obvezne anaerobe između membrana Cytoplast™ i Permamem® korišten je t-test uz Benjamini–Hochbergovu korekciju. Statistički značajnim smatrani su rezultati kod kojih je we.eBH-Wilcoxon p-vrijednost (korigirana Benjamini–Hochbergovom korekcijom) bila manja od 0,05. Pozitivna vrijednost varijable *diff.btw* (*difference between*) označavala je veću prisutnost dotične bakterije u membrani Permamem® u odnosu na Cytoplast™, dok su negativne vrijednosti pokazale suprotan trend. Također, rezultati dobiveni RT-qPCR-om uspoređeni su između membrana Permamem® i Cytoplast™ korištenjem Mann-Whitneyjeva U-testa, uz dodatnu Benjamini–Hochbergovu korekciju. Dobiveni zaključci bili su u skladu s rezultatima dobivenim analizom CFU/ml. Kako bi se dodatno istražile razlike u sastavu mikrobioma između dviju membrana, na podacima dobivenim sekvencioniranjem sljedeće generacije (engl. *next-generation sequencing technology*; NGS) analizom je primijenjen ALDEx2 koji se temelji na simulacijama Monte Carlo Dirichletove raspodjele te omogućuje robustno određivanje diferencijalne prisutnosti taksonomskih jedinica u NGS podacima, uz automatsku primjenu Benjamini–Hochbergove (BH) korekcije. Kao i u prethodno navedenim skupovima podataka, koeficijenti *diff.btw* te we.eBH pokazivali su isto. Za ispitivanje razlike između histomorfometrijskih parametara koštanih uzoraka te širine alveolarnog grebena korištena je one-way ANOVA. Rezultati su smatrani statistički značajnima na razini $p < 0,01$.

4. REZULTATI

4.1. Koštana histomorfometrija

Na tkivnim rezovima koji su obojeni histološkim bojama, s pomoću svjetlosnog mikroskopa Olympus BHA (Olympus, Tokyo, Japan) na koji je adaptirana digitalna kamera Sony (Sony, Yokohama, Kanagawa) učinjene su mikrofotografije tkivnih rezova. Mikrofotografije tkivnih rezova analizirane su s pomoću kompjuterskog programa za obradu slike (VAMS, Zagreb, Hrvatska) kako bi se kvantificirale vrijednosti histomorfometrijskih parametara: obujam kosti [BV/TV (%)] i rezidualni biomaterijal [RB (%)] (Tablica 3).

Tablica 3. Prikaz rezultata koštane histomorfometrije

	Obujam kosti BV/TV (%)	Rezidualni biomaterijal RB (%)	Meko tkivo
Cytoplast™			
¹ BX+AB	52,08 ± 5,68%	25,43 ± 3,2%	22,49 ± 7,59
Permamem®			
¹ BX+AB	51,76 ± 7,29%	25,20 ± 3,32%	23,04 ± 8,74

¹ (BX+AB) - goveđi koštani biomaterijal + autologna kost

Nije nađena statistička značajna razlika između parametara [BV/TV (%)] $p=0,152$ i [RB (%)] $p=0,093$ uspoređujući Cytoplast™ i Permamem® skupinu.

4.2. Kompjuterizirana tomografija s konusnim snopom (engl. Cone beam computed tomography, CBCT)

Snimanje čeljusti učinjeno je uređajem CBCT (A 300 Morita, Kyoto, Japan). Vrijednosti dimenzija alveolarnog grebena (debljina/mm) kvantificirane su prije vađenja zuba i nakon završetka postupka očuvanja alveole - nakon 4-6 mjeseci (Tablica 4).

Tablica 4. Prikaz rezultata CBCT mjerenja dimenzija alveolarnog grebena

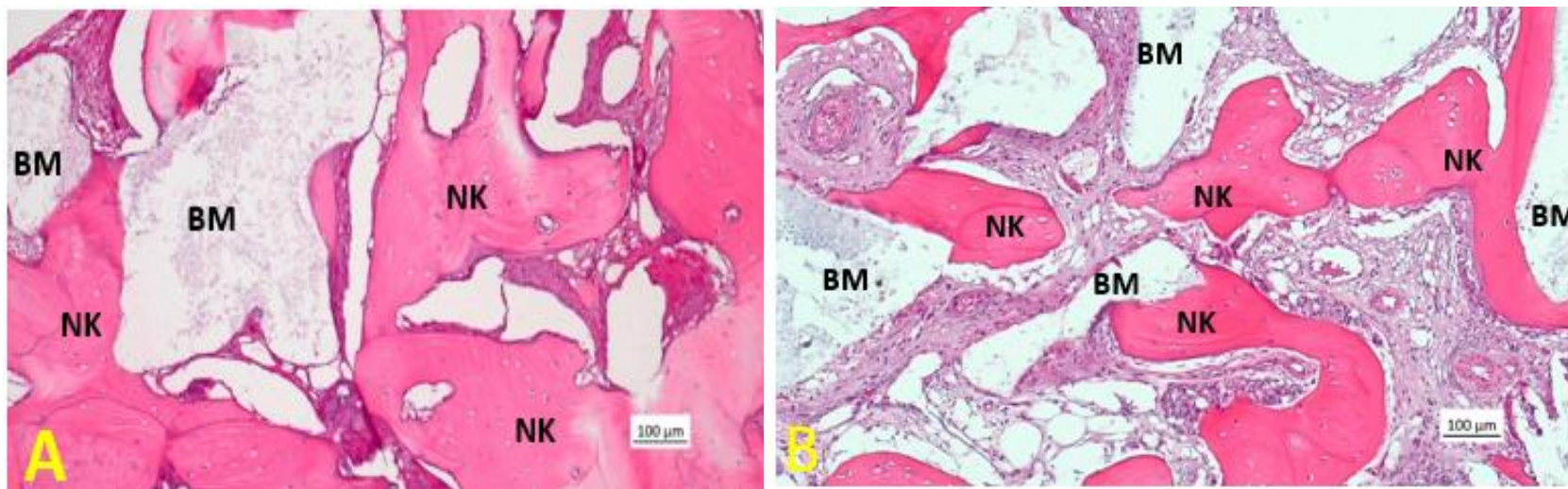
	Širina prije vađenja (mm)	Širina nakon vađenja zuba (mm)	Razlika
Cytoplast™			
¹ BX+AB	8,20 ± 2,01 mm	7,25 ± 1,38 mm	-0,95 ± 0,74
Permamem®			
¹ BX+AB	8,45 ± 2,15 mm	7,85 ± 2,48 mm	-0,6 ± 0,38

¹ (BX+AB) - goveđi koštani biomaterijal + autologna kost

Nije nađena statistička značajna razlika širine alveolarnog grebena prije vađenja zuba $p=0,08$ i nakon vađenja zuba $p=0,101$ uspoređujući Cytoplast™ i Permamem® skupinu..

4.3. Histološko bojenje hematoksilin-eozinom

Uzorci su koštanog tkiva dekalcinirani, uklopljeni u parafinski blok i narezani s pomoću mikrotoma (Leica RM2155, Austria) opremljenog s nožem za meka tkiva kako bi se dobili tkivni rezovi željene debljine (3-5 μm). Tkivni rezovi obojeni su histološkom bojom Hematoxylin-eosin prema standardnim protokolima (Slike 9).

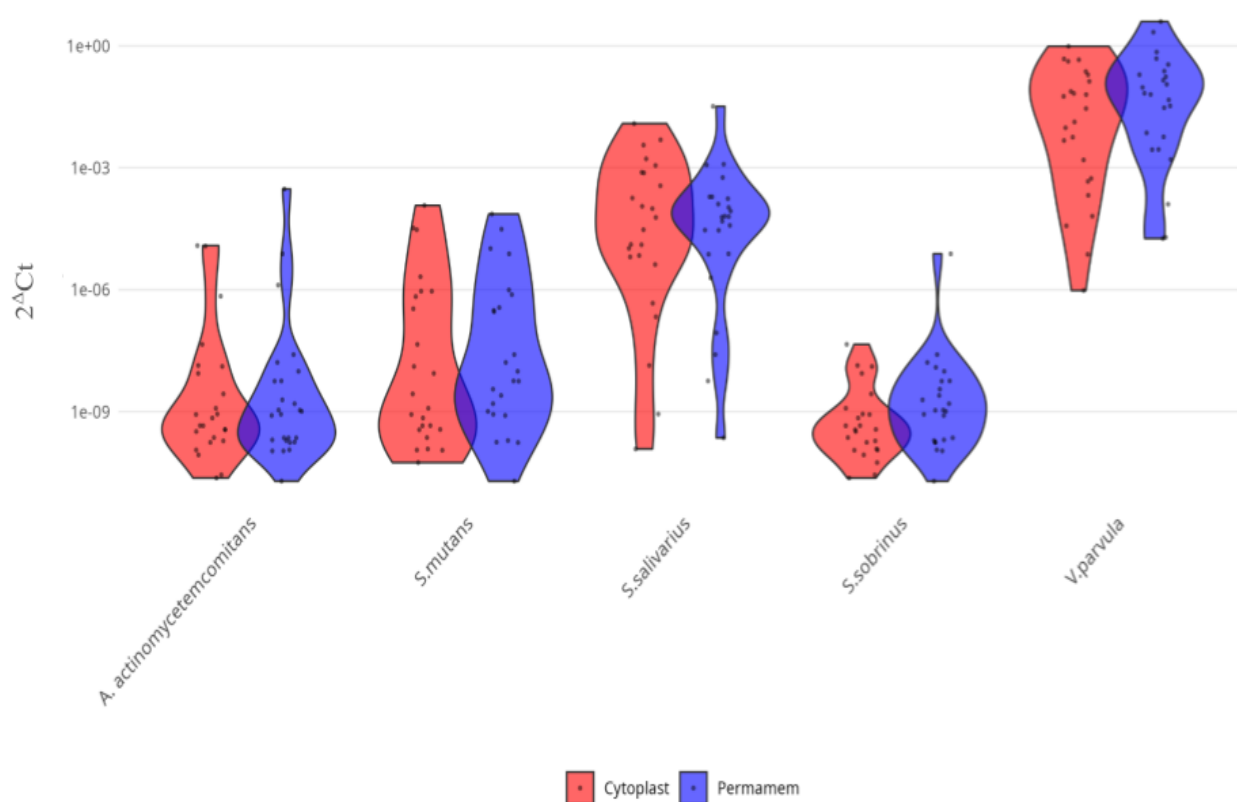


Slika 9. Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova koštanih uzoraka dobivenih iz grebena alveolarne kosti primjenom membrane Cytoplast™ nakon augmentacije s BX+AB (A) te primjenom membrane Permamem® nakon augmentacije s BX+AB (B). (Biomaterijal (BM); novostvorena kost (NK). Hematoxylin-eosin, povećanje 100X.)

4.4. Kvantitativna reakcija lančanom polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR), broj bakterija (CFU/ml) i sekvencioniranje sljedeće generacije (NGS)

4.4.1. Kvantitativna reakcija lančanom polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR)

Radi utvrđivanja mikrobnog profila usporedbom uzoraka Cytoplast™ i Permamem®, provedena je RT-qPCR analiza za identifikaciju i kvantifikaciju sljedećih bakterija: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus salivarius*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* te *Veillonella parvula*.



Slika 10. Rezultati RT-qPCR-a

U slučaju *A. actinomycetemcomitans* i *S. sobrinus* obje membrane pokazale su niske vrijednosti $2^{\Delta Ct}$, uglavnom između 10^{-9} i 10^{-6} . *S. mutans* pokazala je malo širi raspon vrijednosti kod membrana Permamem® u odnosu na membrane Cytoplast™. *S. salivarius* istaknuo se višim vrijednostima u odnosu na prethodno navedene vrste s distribucijama koje dosežu do 10^{-3} u obje membrane. Vrijednosti $2^{\Delta Ct}$ za *V. parvula* bile su najviše među ispitivanim bakterijskim vrstama (Slika 10). U pogledu distribucije uzoraka unutar skupina, kod većine ispitivanih bakterijskih vrsta pokazala se ravnomjernija distribucija, dok je malo izraženija razlika zamjećena u slučaju *S. salivarius* u korist skupine Permamem®.

Između grupa proveden je Mann-Whitneyjev U-test s korekcijom FDR kako bi se osiguralo nepostojanje lažno pozitivnih statistički značajnih rezultata (Tablica 5).

Tablica 5. Rezultati RT-qPCR-a

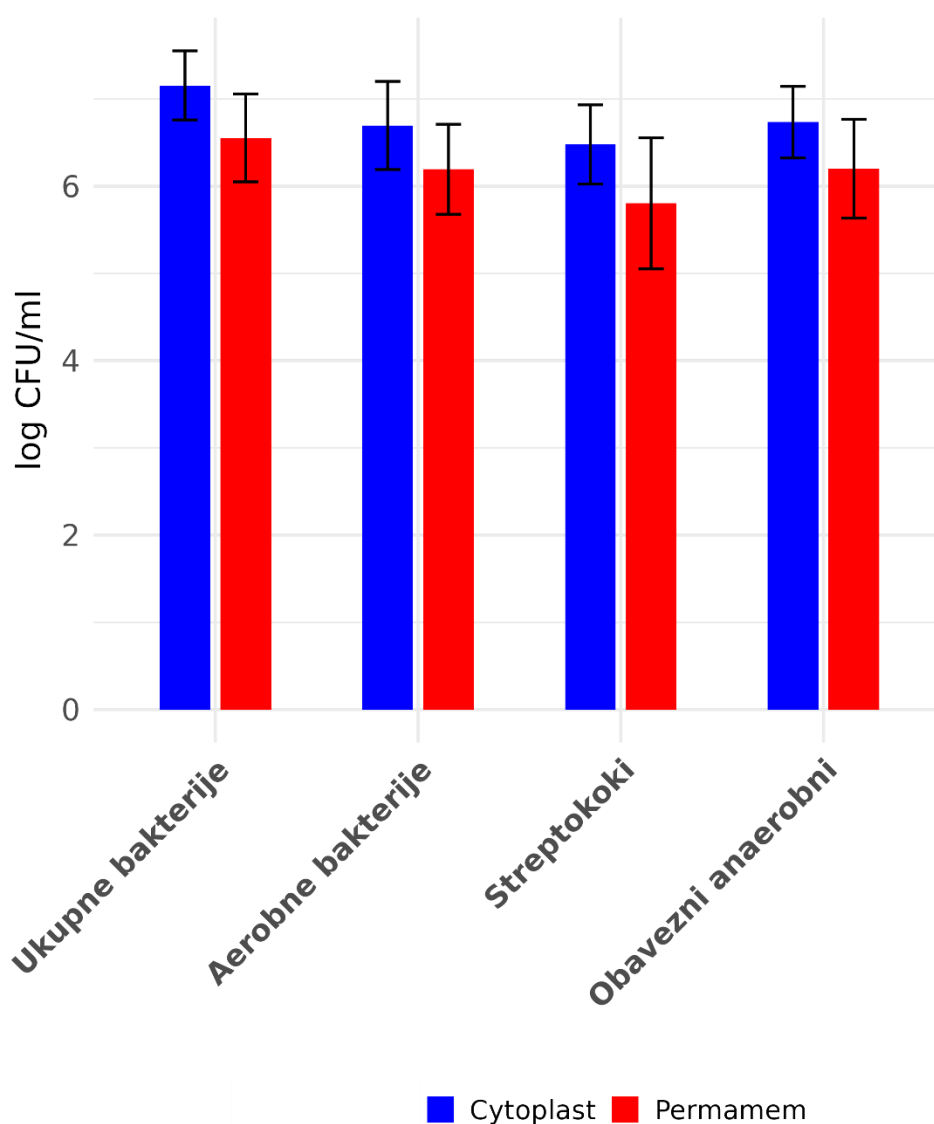
Bakterijska vrsta	p-vrijednost	BH korekcija
<i>S. mutans</i>	0,455	0,759
<i>S. sobrinus</i>	0,102	0,508
<i>S. salivarius</i>	0,959	0,992
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0,992	0,992
<i>V. parvula</i>	0,248	0,621

BH korekcija – Benjamini-Hochberg, p-vrijednost ($p < 0,05$)

Navedeni rezultati upućuju na to kako ne postoje statistički značajne razlike između uzoraka u ispitivanim bakterijama ($p > 0,05$). Također, sve vrijednosti korekcija p-vrijednosti bile su više u odnosu na dobivene p-vrijednosti što potvrđuje da nisu utvrđene značajne razlike između ispitivanih skupina za pojedine bakterijske vrste.

4.5. Broj bakterija (CFU/ml)

Mjeren je ukupan broj bakterija te broj po pojedinim skupinama (CFU/ml) za aerobne, obvezne anaerobe te bakterije iz roda *Streptococcus* na uzorcima membrana Permamem® i Cytoplast™.



Slika 11. Grafički prikaz rezultata broja bakterija (CFU/ml)

Uočeno je da su vrijednosti za sve analizirane bakterijske skupine bile više u uzorcima skupine membrana Cytoplast™ u usporedbi sa skupinom membrana Permamem® (Slika 11). Izmjerene vrijednosti log CFU/ml za sve skupine uzorka Cytoplast™ prelazile su 6, a vrijednosti za Permamem® bile su oko 6, izuzev streptokoka za koje je izmjereno malo manje od 6 (Slika 11).

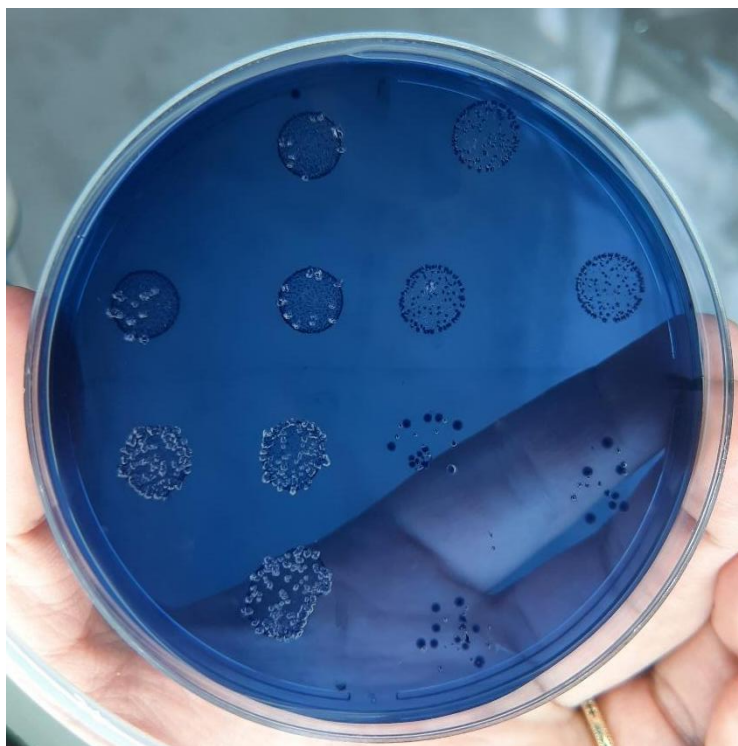
Između promatranih skupina s obzirom na vrijednost CFU/ml proveden je t-test uz korekciju FDR (Tablica 6).

Tablica 6. Rezultati broja bakterija (CFU/ml)

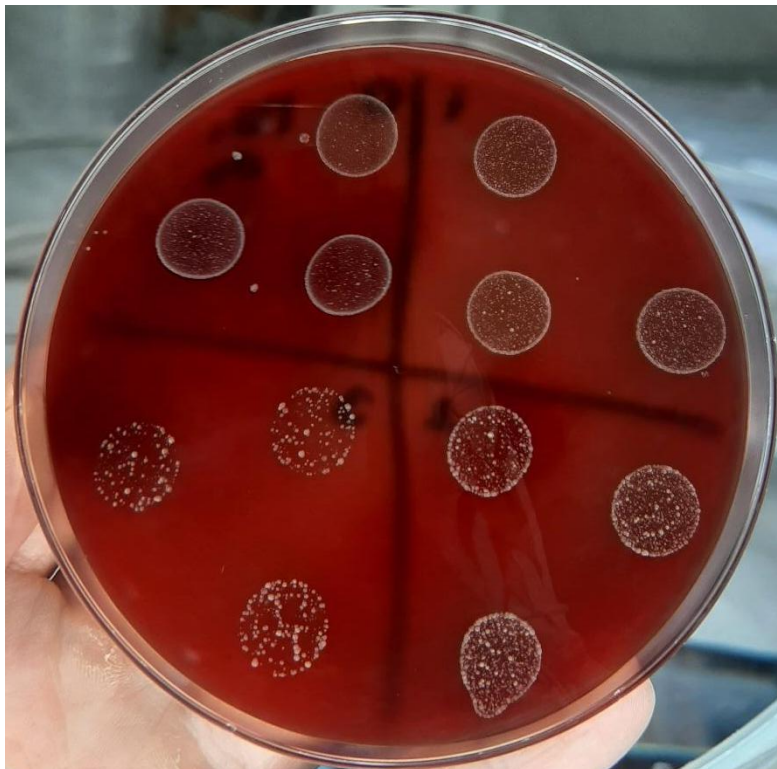
Kategorija	Membrana	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	p-vrijednost	cohen-d
Obligatni anaerobi	Cytoplast™	6,73	0,410	0,00055	-1,08
Obligatni anaerobi	Permamem®	6,20	0,567		
Aerobi	Cytoplast™	6,70	0,505	0,00137	-0,983
Aerobi	Permamem®	6,19	0,516		
Streptokoki	Cytoplast™	6,48	0,454	0,00056	-1,09
Streptokoki	Permamem®	5,80	0,751		
Ukupne bakterije	Cytoplast™	7,16	0,396	0,00004	-1,33
Ukupne bakterije	Permamem®	6,55	0,503		

Cohenov d-koeficijent veličine, p-vrijednost ($p < 0,05$)

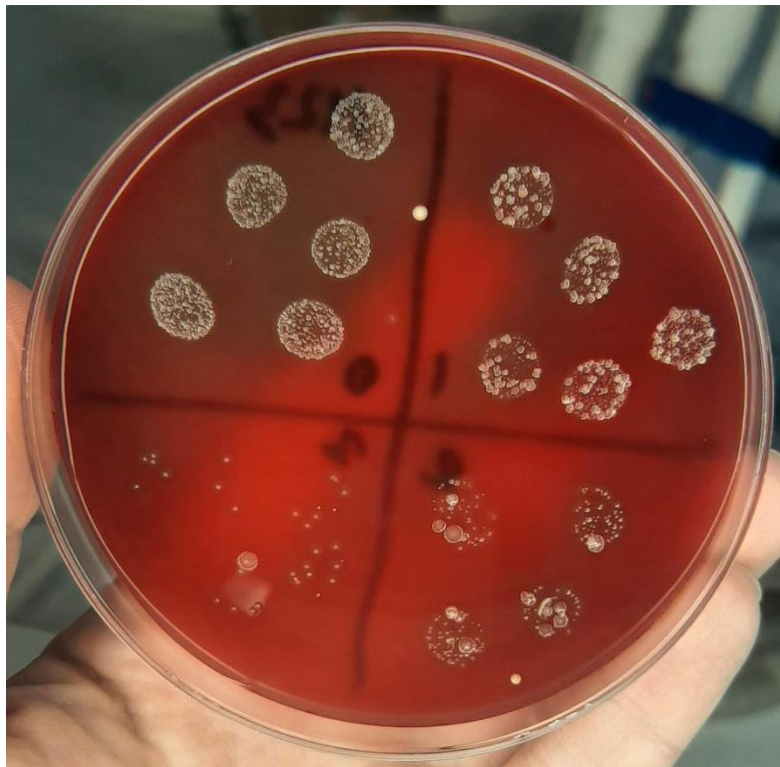
U Tablici 6 prikazane su srednje vrijednosti, standardne devijacije, p-vrijednosti te Cohenov d (veličina efekta) za svaku od ispitivanih skupina. Zanimljivo je da su statistički značajne razlike prisutne u svim kategorijama bakterija ($p < 0,05$), pri čemu je najsnažnija razlika uočena kod ukupnog broja bakterija ($p = 0,00004$). Skupina membrana Cytoplast™ dosljedno pokazuje više srednje vrijednosti u svim kategorijama, što je vizualno potvrđeno i Slikom 11. Veličine efekta izražene Cohenovim d-koeficijentom kreću se u rasponu od -0,98 do -1,33, što upućuje na to da razlike nisu samo statistički značajne nego i biološki relevantne. Negativan predznak kod Cohenova d proizlazi iz metode izračuna i označava smjer razlike potvrđujući da su vrijednosti veće u skupini membrana Cytoplast™.



Slika 12. Reprezentativni prikaz porasta streptokoka CFU/ml na hranjivoj podlozi (autorski rad)



Slika 13. Reprezentativni prikaz porasta obligatnih anaeroba CFU/ml na hranjivoj podlozi (autorski rad)

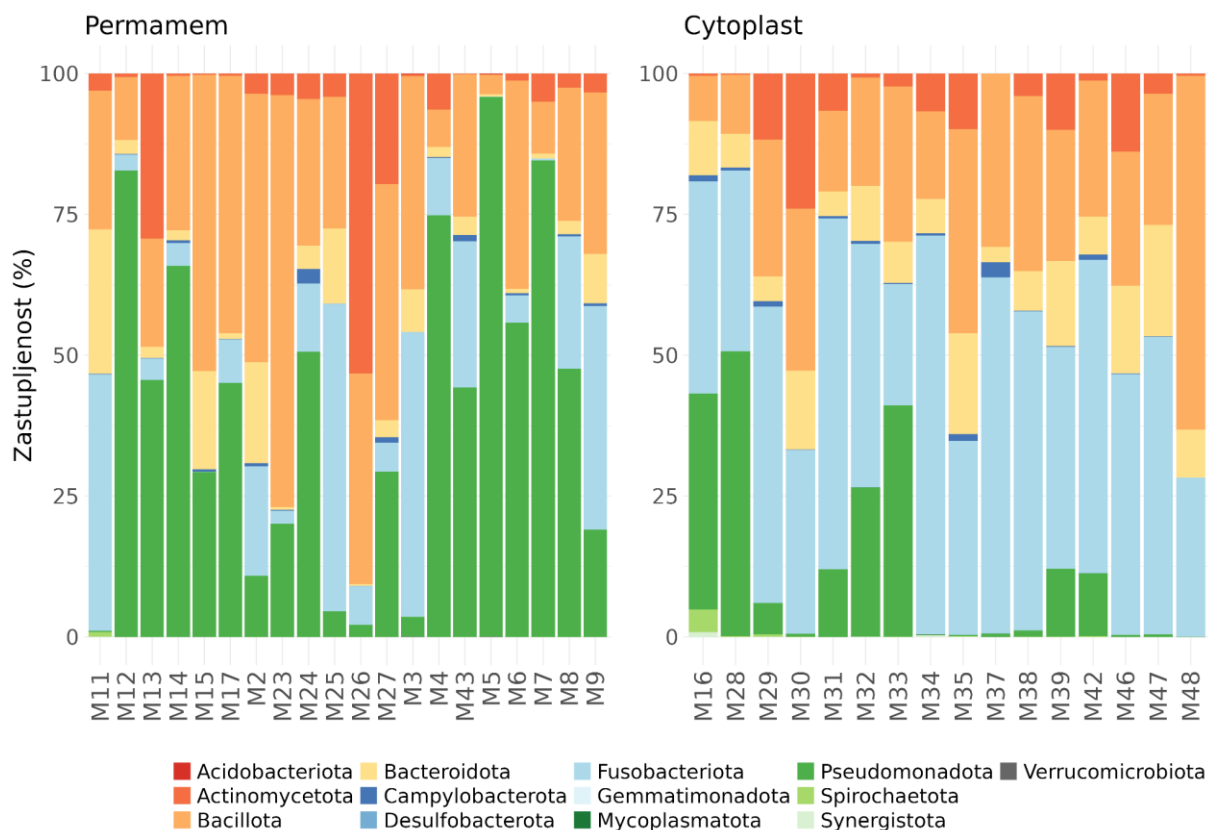


Slika 14. Reprezentativni prikaz porasta aeroba CFU/ml na hranjivoj podlozi (autorski rad)

4.6. Sekvencioniranje sljedeće generacije (engl. next-generation sequencing technology, NGS)

Da bi se procijenile raznolikosti i razlike u mikrobiomu između membrana Cytoplast™ i Permamem® (d-PTFE), provedena je komparativna analiza rezultata NGS-a. Uzorci M23, M24, M25, M26, M27, M7, M9, M13, M15, M17, M43, M2, M3, M4, M5, M11, M14, M12, M6 i M8 svrstani su u skupinu membrana Permamem®, a uzorci M28, M29, M30, M31, M32, M33, M34, M35, M37, M38, M39, M42, M46, M47, M48 i M16 pripali su skupini membrana Cytoplast™.

Kako bi se utvrdilo postoje li značajne razlike između skupina, analizirani su najzastupljeniji i rijetki rodovi te vrste bakterija specifične za skupinu i bolest. Nakon obrade podataka ukupan broj očitavanja za sve uzorke iznosio je 1 099 274, s prosječnim brojem očitavanja od 377 862 za uzorke membrana Cytoplast™ i 351 592 za uzorke membrana Permamem®. Taksonomska klasifikacija sekvenci identificirala je 284 vrste koje su pripadale ukupno 13 koljena. Među njima 275 vrsta bilo je povezano s uzorcima Permamem®, a 242 s uzorcima Cytoplast™.



Slika 15. Sastav mikrobioma na razini koljena (phylum)

Na taksonomskoj razini koljena uočene su jasne razlike između dviju skupina (Slika 15). U skupini membrana Permamem® najdominantnija koljena bila su *Pseudomonadota* (40%), *Bacillota* (30%) i *Fusobacteriota* (16%), a u skupini membrana Cytoplast™ *Fusobacteriota* (46%), *Bacillota* (25%) i *Pseudomonadota* (13%). U skupini Permamem® koljena *Actinomycetota* (7%) i *Bacteroidota* (6%) bila su slabije zastupljena, a u skupini Cytoplast™ koljena *Bacteroidota* (10%) i *Actinomycetota* (6%) pokazala su manju relativnu zastupljenost.

Ostala koljena, uključujući *Spirochaetota*, *Mycoplasmatota*, *Synergistota*, *Acidobacteriota*, *Verrucomicrobiota*, *Gemmatimonadota*, *Desulfobacterota* i *Campylobacterota*, bila su prisutna u vrlo niskim udjelima (<1%) i pokazivala nekonzistentnu prisutnost (Slika 15).

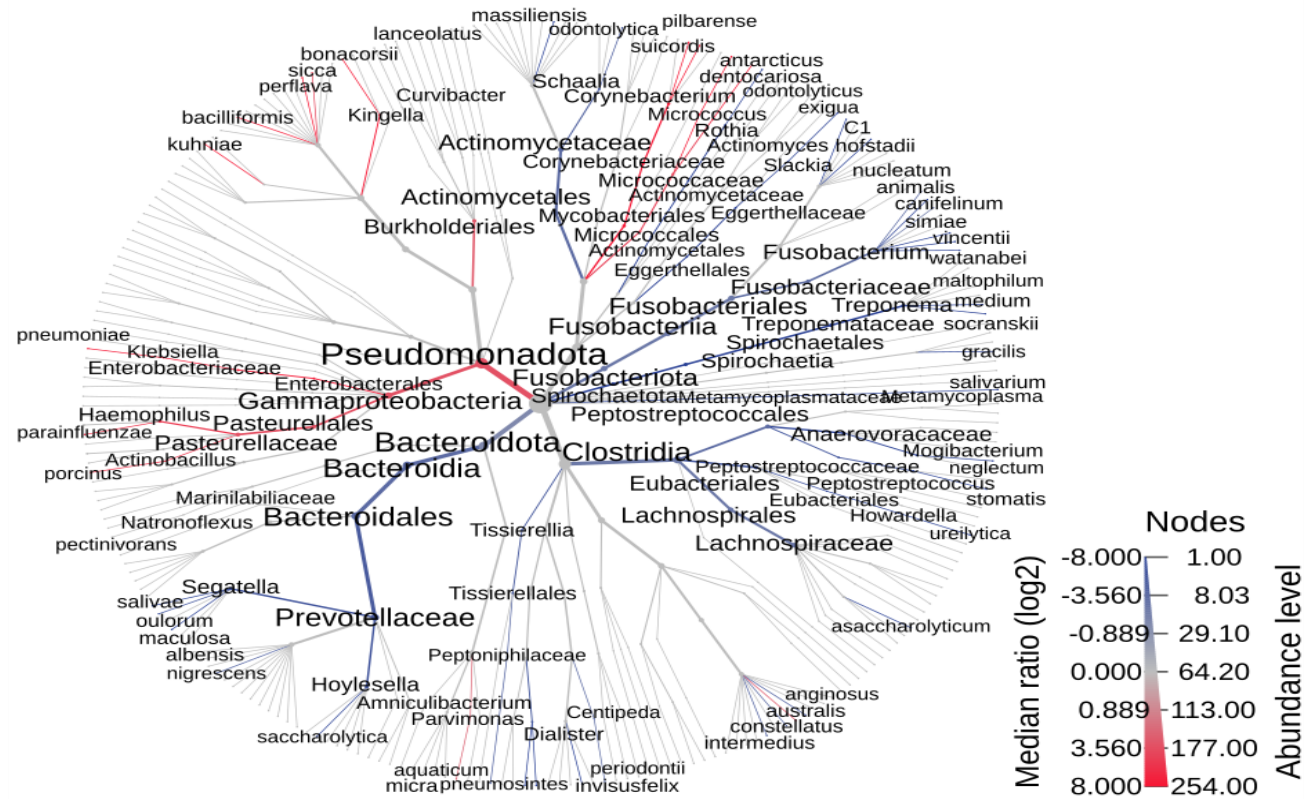
Da bi se dodatno istražile razlike između skupina na nižim taksonomskim razinama, provedena je analiza *heat tree* s pomoću web-alata MicrobiomeAnalyst 2.0 (Slika 16). Razlike među skupinama definirane su Wilcoxonovim testom na tri razine značajnosti ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$) kako bi se uz što strože kriterije definirale značajne razlike. U dobivenim *heat tree* prikazima čvorovi predstavljaju taksone, veličina čvora označava zastupljenost, boja čvora smjer i značajnost razlika između skupina, a grane taksonomsku hijerarhiju (plava označava veću zastupljenost u skupini membrana Cytoplast™, a crvena u skupini Permamem®) [156,157].

a) Permamem_vs_Cytoplasm



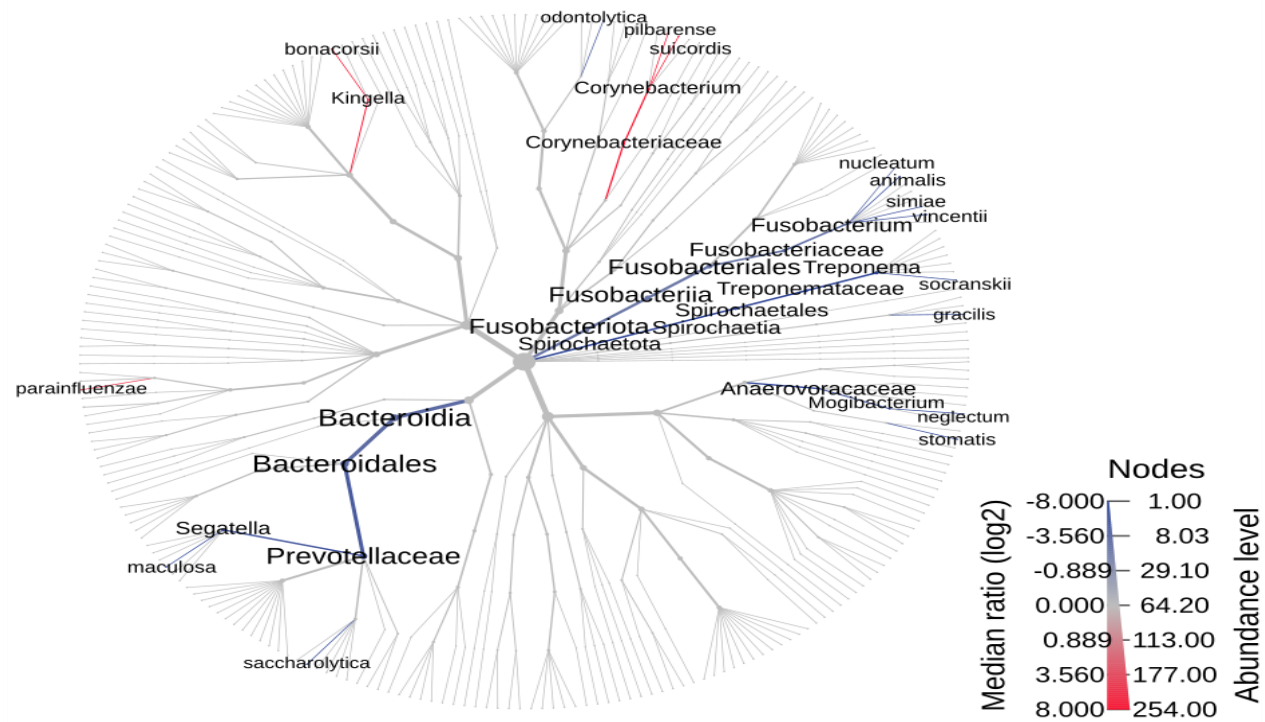
Slika 16. Heat tree analiza, a) $p < 0,05$

b) Permamem_vs_Cytoplasm



Slika 16. Heat tree analiza, b) $p < 0,01$

c) Permamem_vs_Cytoplasm



Slika 16. Heat tree analiza, c) $p < 0,001$

Kao što je vidljivo na slici 16., broj različitih taksona pri razini značajnosti $p < 0,05$ bio je iznenađujuće velik (Slika 16a). Zanimljivo je da su razlike ostale uočljive čak i pri strožim pragovima značajnosti (Slika 16 b,c). Brojčane vrijednosti za navedene slike prikazane su u Tablici 7.

Tablica 7. Brojčane vrijednosti *heat tree* analize za različite bakterijske vrste između skupina Permamem® i Cytoplast™ otkrivene na pragu značajnosti od $p < 0,05$ – $0,01$, $p < 0,01$ – $0,001$ i $p < 0,001$. Plava boja označava povećanu prisutnost vrsta u skupini membrana Cytoplast™, a crvena veću prisutnost vrsta u skupini Permamem®.

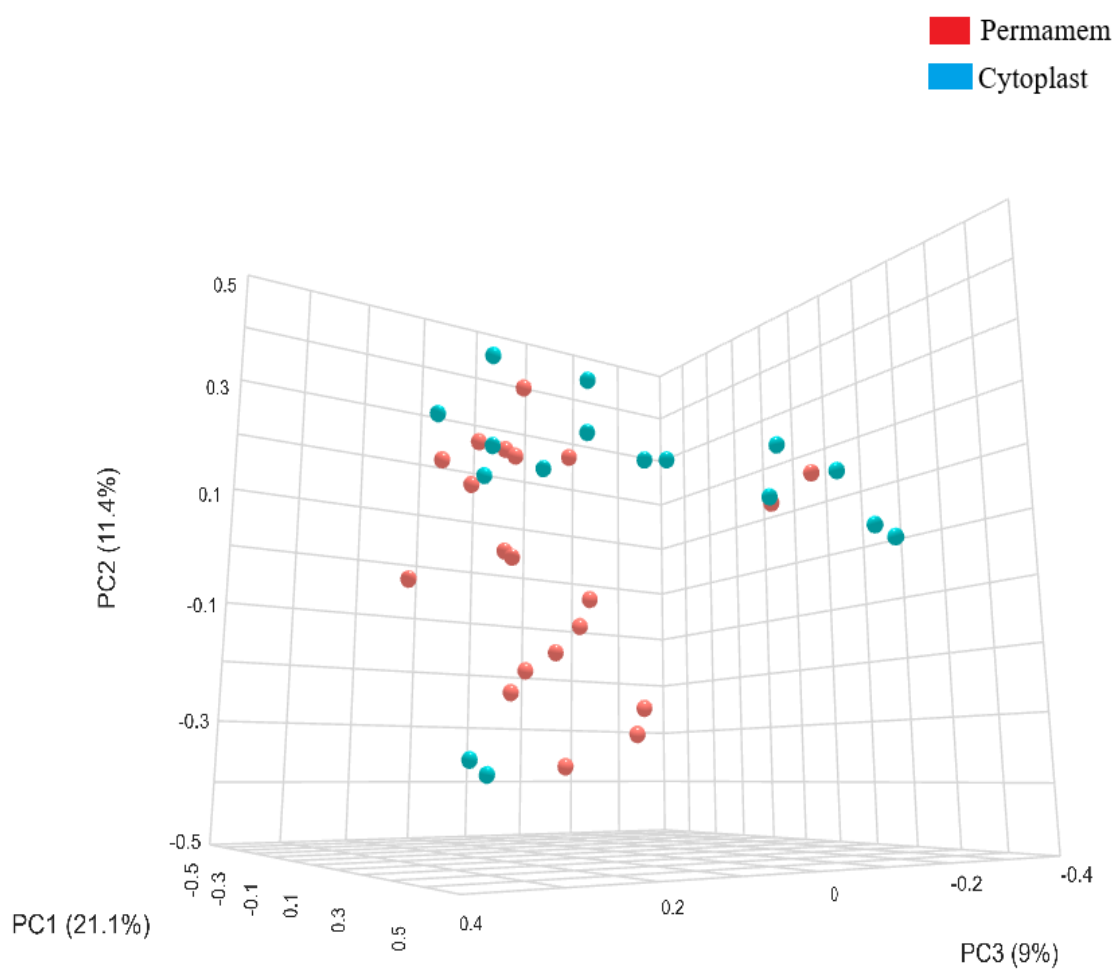
p (< 0,05-0,01)		p (0,01-0,001)		p < 0,001	
Bacterial species	p	Bacterial species	p	Bacterial species	p
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	0,035	<i>Treponema maltophilum</i>	0,005	<i>Treponema socranskii</i>	0,00011
<i>Acinetobacter oleivorans</i>	0,036	<i>Streptococcus anginosus</i>	0,001	<i>Kingella bonacorsii</i>	1,00E-05
<i>Actinomyces bouchedurhonensis</i>	0,020	<i>Streptococcus constellatus</i>	0,006	<i>Hoylesella saccharolytica</i>	0,00004
<i>Actinomyces graevenitzii</i>	0,034	<i>Streptococcus porcinus</i>	0,007	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	0,0003
<i>Actinomyces howellii</i>	0,011	<i>Slackia exigua</i>	0,001	<i>Fusobacterium vincentii</i>	0,0002
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	0,042	<i>Segatella salivae</i>	0,004	<i>Fusobacterium simiae</i>	0,0002
<i>Anaerobacterium chartisolvans</i>	0,015	<i>Segatella oulorum</i>	0,002	<i>Fusobacterium animalis</i>	0,0003
<i>Bradyrhizobium yuanningense</i>	0,036	<i>Segatella albensis</i>	0,004	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0,0003
<i>Cardiobacterium hominis</i>	0,025	<i>Rothia dentocariosa</i>	0,004	<i>Corynebacterium suicordis</i>	0,0007
<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	0,044	<i>Oribacterium asaccharolyticum</i>	0,003	<i>Corynebacterium pilbarensis</i>	0,0006
<i>Dialister invisus</i>	0,015	<i>Natronoflexus pectinivorans</i>	0,001	<i>Campylobacter gracilis</i>	0,0003

<i>Eikenella halliae</i>	0,026	<i>Neisseria bacilliformis</i>	0,003	<i>Schaalia odontolytica</i>	0,000
<i>Enterobacter hormaechei</i>	0,036	<i>Metamycoplasma salivarium</i>	0,001	<i>Mogibacterium. neglectum</i>	0,0007
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	0,019	<i>Micrococcus antarcticus</i>	0,001	<i>Peptostreptococc us stomatis</i>	0,0003
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	0,037	<i>Leptotrichia genomosp. C1</i>	0,004	<i>Segatella maculosa</i>	0,0005
<i>Halothiobacillus neapolitanus</i>	0,018	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,001		
<i>Leptotrichia shahii</i>	0,012	<i>Howardella ureilytica</i>	0,002		
<i>Atopobium rimae</i>	0,039	<i>Actinomyces massiliensis</i>	0,001		
<i>Leptotrichia wadei</i>	0,017	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	0,005		
<i>Neisseria weaveri</i>	0,031	<i>Fusobacterium watanabei</i>	0,005		
<i>Parvimonas micra</i>	0,021	<i>Dialister pneumosintens</i>	0,001		
<i>Peptococcus niger</i>	0,018	<i>Curvibacter lanceolatus</i>	0,005		
<i>Prevotella micans</i>	0,034	<i>Conchiformibius kuhniae</i>	0,003		
<i>Pseudomonas lini</i>	0,039				
<i>Ruminiclostridium cellobioparum</i>	0,029				
<i>Segatella baroniae</i>	0,048				
<i>Selenomonas sputigena</i>	0,019				
<i>Treponema medium</i>	0,011				

Od 23 vrste koje su se razlikovale između skupina i koje su otkrivene pri vrijednosti $p < 0,01$, većina u skupini Cytoplast™ pripadala je rodovima *Fusobacterium* i *Segatella*, dok su u skupini Permamem® dominantne vrste pripadale rodovima *Kingella*, *Klebsiella* i *Corynebacterium* (Slika 16b i Tablica 7).

Pri najstrožem pragu značajnosti od $p < 0,001$, dvije su se skupine razlikovale u 15 vrsta koje pripadaju rodovima *Segatella*, *Haemophilus*, *Kingella*, *Fusobacterium*, *Corynebacterium*, *Treponema* i *Mogibacterium*. Sve navedene rodove, osim *Kingella* i *Corynebacterium*, karakterizirala je veća zastupljenost u skupini Cytoplast™ u usporedbi sa skupinom Permamem® (Slika 16c i Tablica 7).

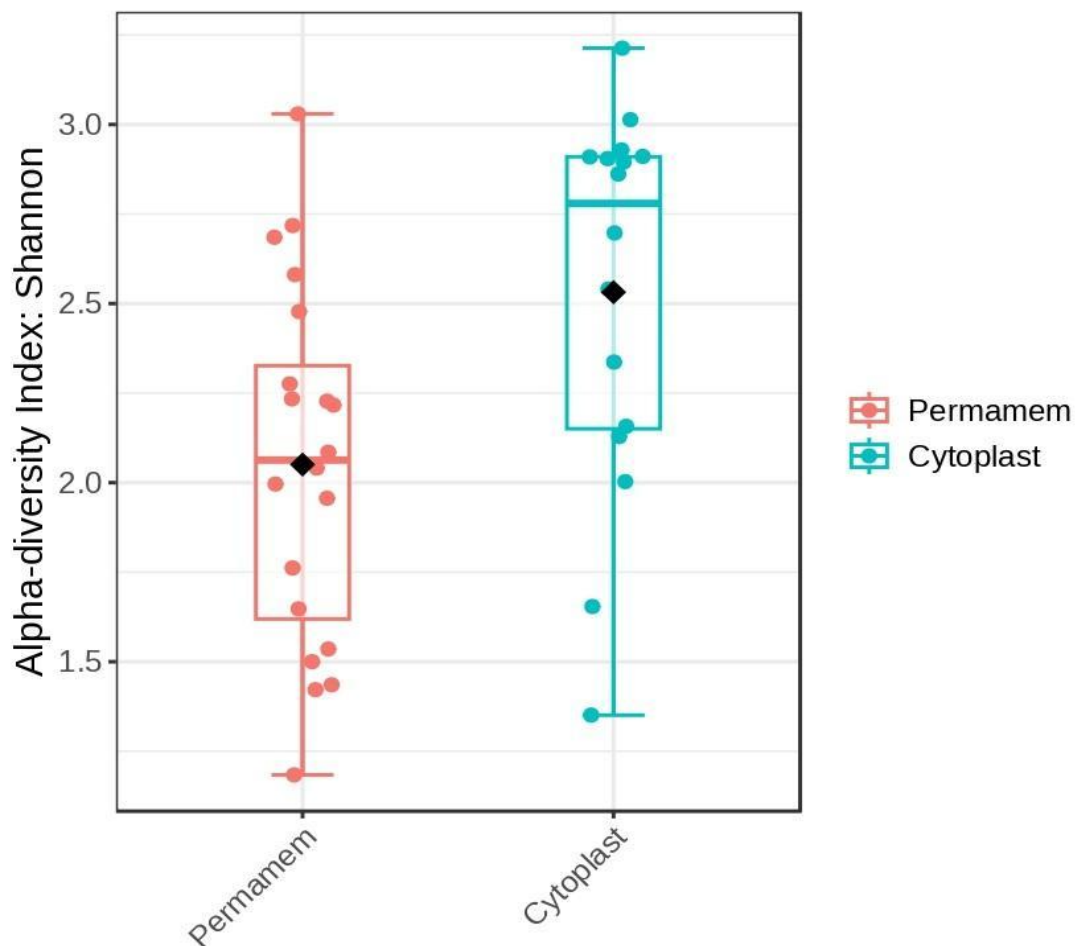
Analiza beta-raznolikosti nije pokazala značajne razlike između dviju grupa ($p = 0,5$) (Slika 17).



Slika 17. Grafički prikaz beta-raznolikosti

Analiza glavnih koordinata (PCoA) pokazala je djelomičnu separaciju između uzoraka dviju skupina. Uzorci označeni plavom bojom (Cytoplast™) grupirali su se uglavnom na jednoj strani grafa, dok su crveni uzorci (Permamem®) bili raspoređeni šire, ali su ipak pokazivali određeno međusobno grupiranje. To pokazuje veću konzistentnost u sastavu uzoraka

Cytoplast™, dok je u membranama Permamem® prisutna veća heterogenost među uzorcima (Slika 17).



Slika 18. Grafički prikaz rezultata alfa-raznolikosti

Rezultati alfa-raznolikosti pokazali su kako uzorci membrana Cytoplast™ imaju veći Shannonov indeks (2,75) u odnosu na Permamem® (2,01), što upućuje na statistički značajno uravnoteženiji sastav mikrobioma u uzorcima membrana Cytoplast™ u odnosu na Permamem® (Slika 18).

Da bi se procijenila mogućnost lažno pozitivnih rezultata, provedena je analiza ALDEx2 (analiza diferencijalne abundancije uzimajući u obzir varijaciju uzorkovanja). Tijekom analize primijenjena je Benjamini-Hochbergova korekcija radi kontrole lažno pozitivnih nalaza. Rodovi i vrste s p-vrijednošću (Wilcoxon – Benjamini-Hochberg) manjom od 0,05 smatrani su statistički značajnima (Tablica 8).

Tablica 8. Rezultati analize ALDEx2 (analiza diferencijalne abundancije uzimajući u obzir varijaciju uzorkovanja): a) na razini roda, b) na razini vrste

a)

Bakterijski rodovi	we.eBH	diff.btw
<i>Kingella</i>	0,00069	7,56497
<i>Corynebacterium</i>	0,00820	4,77803
<i>Fusobacterium</i>	0,02174	-2,98425
<i>Haemophilus</i>	0,00717	5,50947
<i>Segatella</i>	0,01525	-5,16926

b)

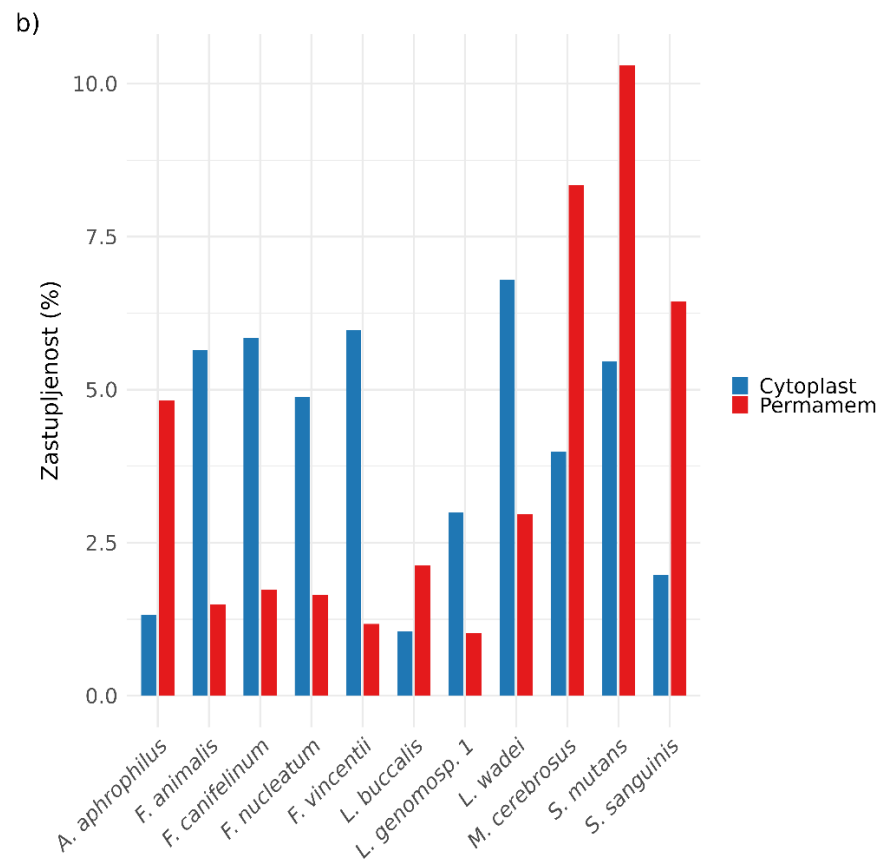
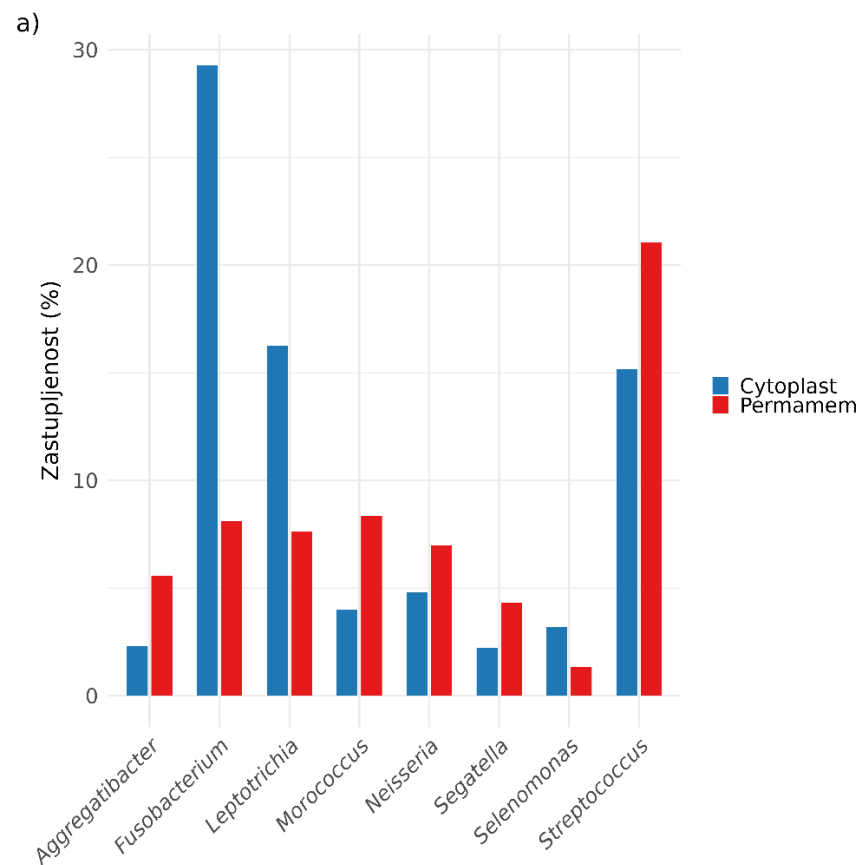
Bakterijske vrste	we.eBH	diff.btw
<i>Fusobacterium vincentii</i>	0,00751	-6,45941
<i>Kingella bonacorsii</i>	0,00104	7,42369
<i>Fusobacterium simiae</i>	0,00408	-7,07080
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0,02003	-3,53571
<i>Segatella maculosa</i>	0,00409	-5,21526
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	0,00772	5,74857
<i>Fusobacterium nucleatum subsp. animalis</i>	0,00852	-7,15001

we.eBH-Wilcoxon Effect – Benjamini-Hochberg p-vrijednost; diff,btw- razlika između grupa Permamem® i Cytoplast™.

Pozitivne vrijednosti indiciraju veću zastupljenost u grupi Permamem®, a negativne u skupini Cytoplast™.

Na temelju rezultata, među statistički značajnim bakterijskim rodovima, rod *Kingella* pokazao je najveću pozitivnu razliku u abundanciji između skupina Permamem® i Cytoplast™, s izrazito većom prisutnošću u skupini Permamem®. S druge strane, rodovi *Segatella* i *Fusobacterium* bili su značajno zastupljeniji u skupini Cytoplast™, što pokazuje specifične mikrobne profile između analiziranih skupina (Tablica 8a).

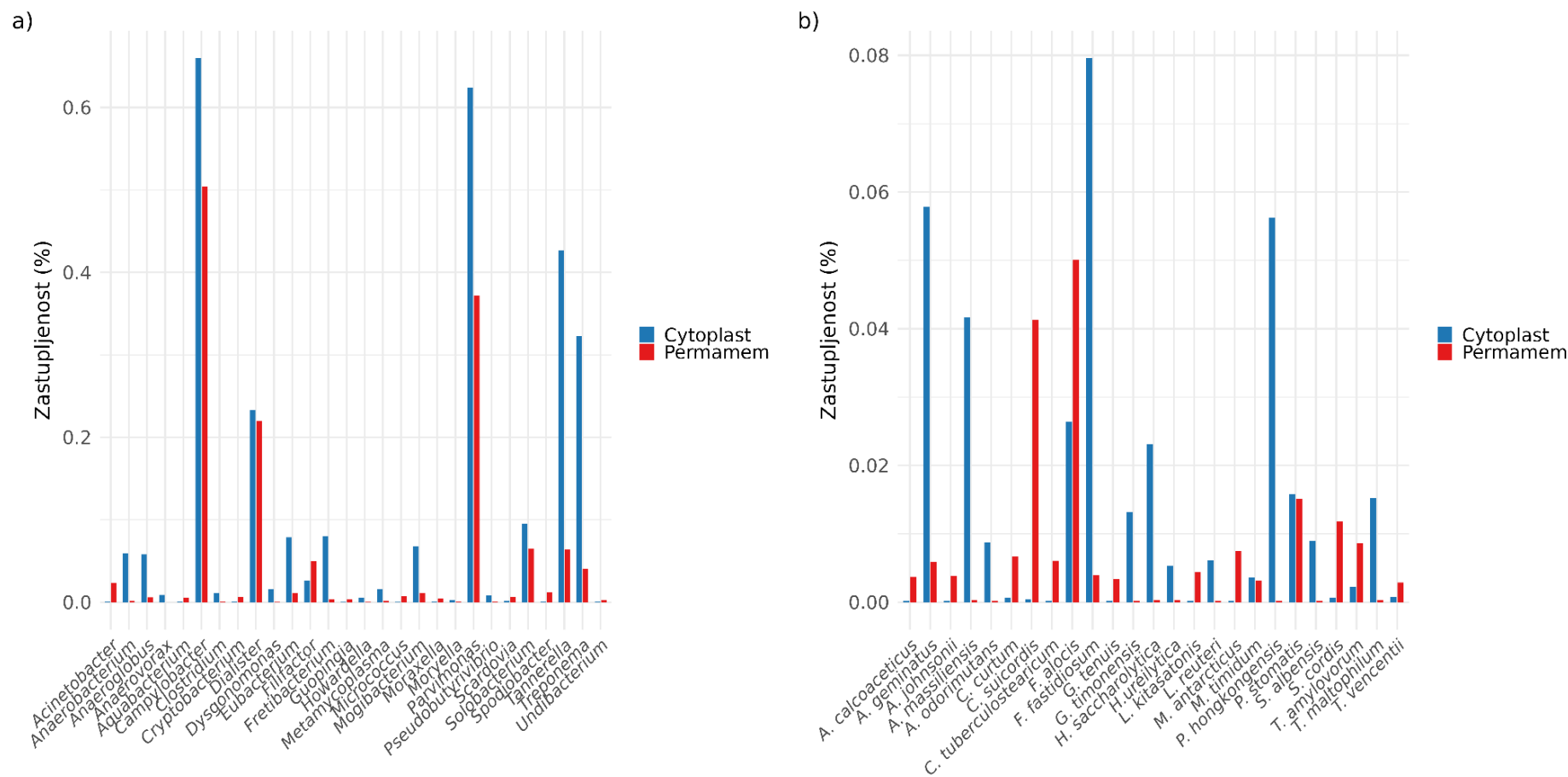
Sličan trend uočen je i na razini vrsta, gdje je *Kingella bonacorsii* identificirana kao vrsta s najvećom pozitivnom razlikom u abundanciji u korist skupine Permamem®. S druge strane, vrste roda *Fusobacterium* pokazale su višu relativnu abundanciju u skupini Cytoplast™ u usporedbi s Permamem®, što dodatno potvrđuje postojanje različite mikrobne dominacije unutar te skupine (Tablica 8b). Na temelju identificiranih bakterija određene su i najzastupljenije vrste na razini roda i vrste (Slika 19), te rijetko zastupljene bakterije (Slika 20).



Slika 19. Najzastupljenije bakterije na razinama: a) rod, b) vrsta

Relativna zastupljenost bakterijskih rodova značajno se razlikovala između skupina Cytoplast™ i Permamem®. Skupina Cytoplast™ bila je osobito obogaćena rodovima *Fusobacterium* (~30%), *Leptotrichia* (~17%) i *Streptococcus* (~15%). Suprotno tomu, skupina Permamem® pokazala je drugačiju distribuciju, pri čemu su *Fusobacterium* (~8%) i *Leptotrichia* (~7%) bili manje zastupljeni, dok je *Streptococcus* (~21%) bio dominantan rod (Slika 19a).

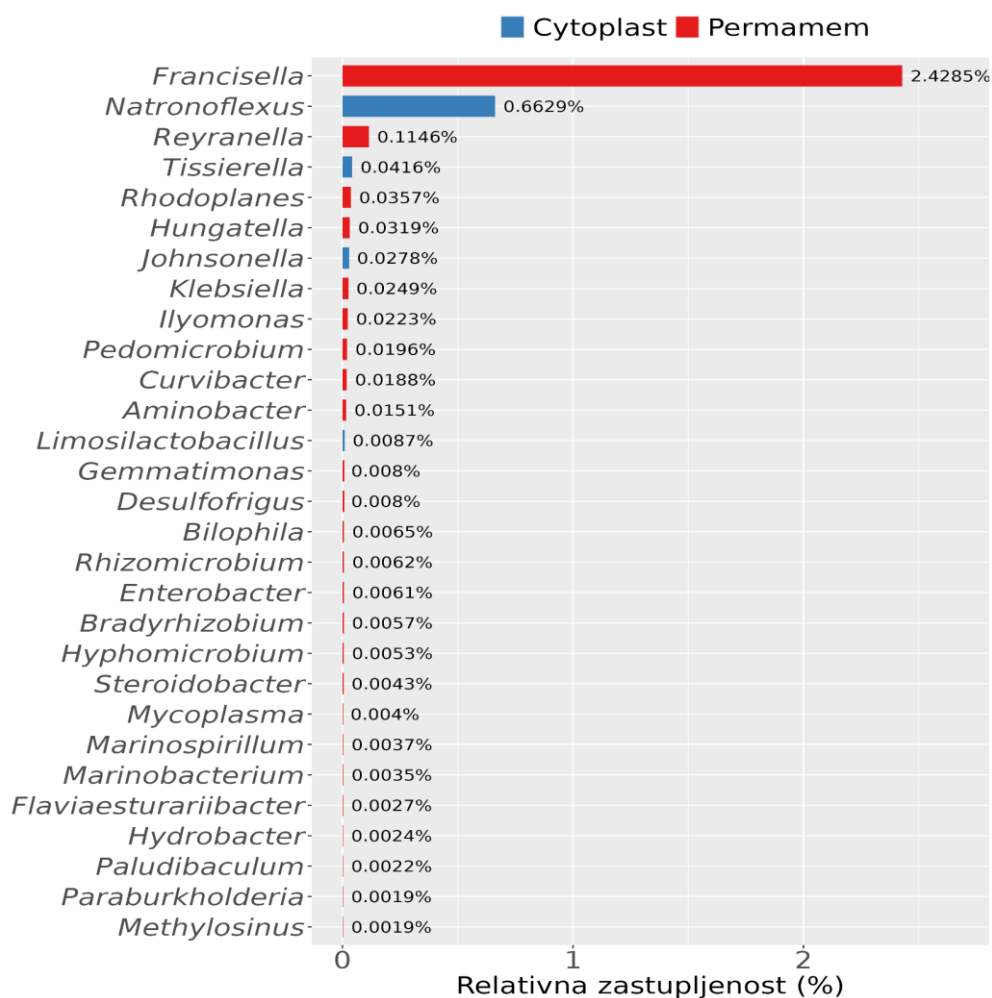
Na razini vrsta profili su također bili neujednačeni. U skupini Permamem® najzastupljenije vrste bile su *Streptococcus mutans* (~10,5%), *Morococcus cerebrosus* (~8,5%) i *Streptococcus sanguinis* (~6,5%), zatim *Aggregatibacter aphrophilus* (~4,8%) i *Leptotrichia wadei* (~3%). Iste vrste bile su prisutne i u skupini Cytoplast™, ali s osjetno drukčijom zastupljenošću: *S. mutans* (~5,5%), *M. cerebrosus* (~4%), *S. sanguinis*, *A. aphrophilus*, dok je *L. wadei* također detektirana u niskim udjelima (Slika 20b). Sukladno slici 19a, skupinom Cytoplast™ dominirale su vrste roda *Fusobacterium* (*F. nucleatum* subsp. *animalis*, *F. canifelinum*, *F. vincentii* i *F. nucleatum*), dok su u uzorcima Permamem® bile prisutne u udjelu manjem od 2,5% (Slika 19b).



Slika 20. Rijetko zastupljene bakterije na razinama: a) rod, b) vrsta

Što se tiče rjeđe zastupljenih rodova, u skupini Cytoplast™ dominirali su rodovi *Campylobacter* (0,65%), *Dialister* (0,22%), *Treponema* (0,31%), *Parvimonas* (~0,63%) i *Tannerella* (~0,42%). Od tih rodova, najzastupljeniji je bio *Campylobacter* (0,5%) u skupini Permamem®, slijedili su *Parvimonas* (0,38%) i *Dialister* (0,21%). *Treponema* i *Tannerella*, kao i većina rodova prikazanih na slici 20a, bili su detektirani na razinama ispod 0,1% (Slika 20a).

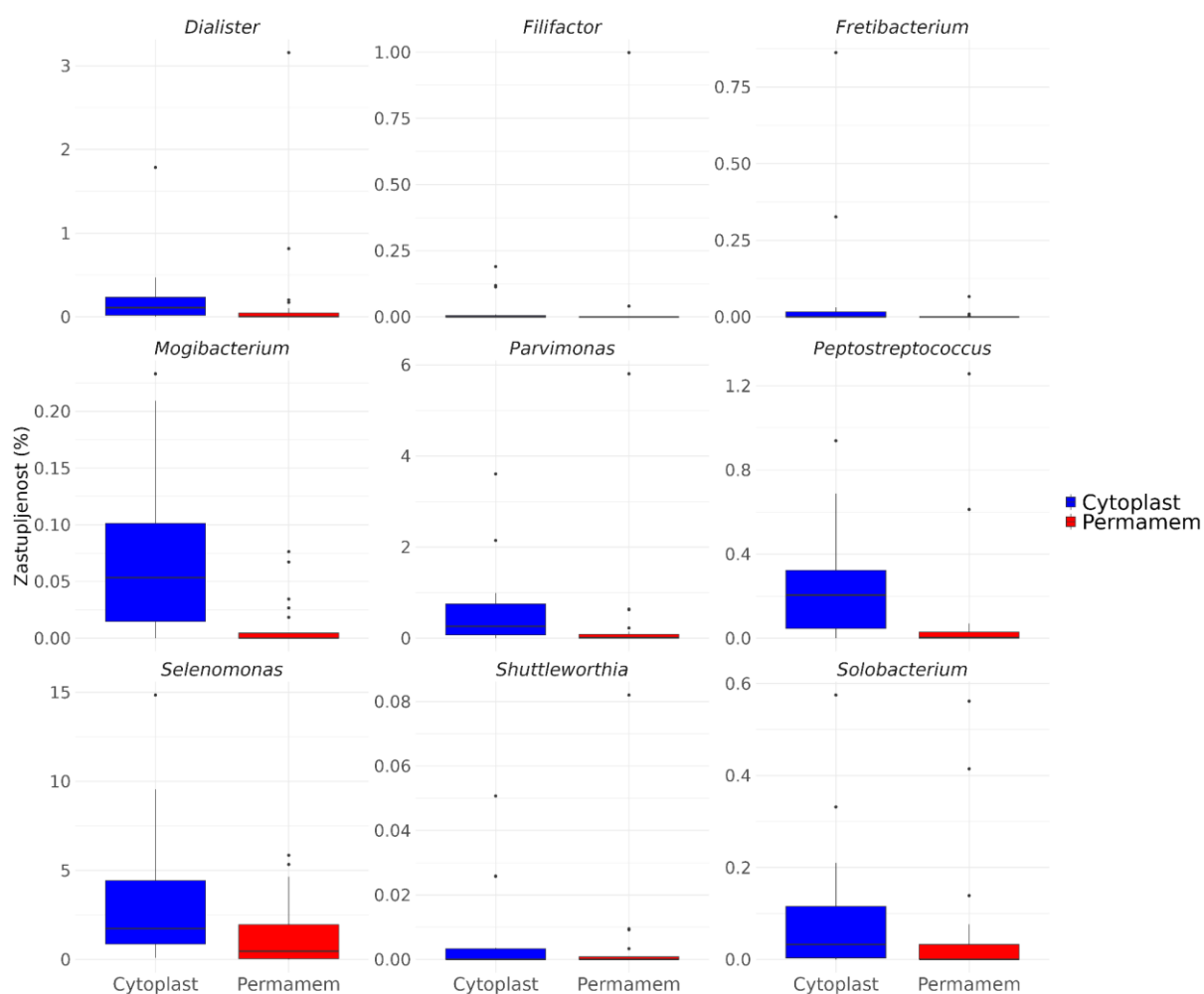
Na razini vrsta (Slika 20b), u skupini Permamem® prevladavale su vrste *Corynebacterium suis cordis* (0,041%) i *Filifactor alocis* (0,05%), koje su u skupini Cytoplast™ bile prisutne tek 0,001% i 0,008%. Suprotno tomu, skupina Cytoplast™ bila je obogaćena rijetkim vrstama poput *Anaeroglobus geminatus* (0,059%), *Actinomyces massiliensis* (~0,042%), *Filifactor fastidiosum* (0,08%) i *Pseudostreptobacillus honkongensis* (0,058%). Ono što je zanimljivo je to da su određeni rodovi detektirani samo u jednoj od dviju skupina (Slika 21).



Slika 21. Bakterije zapažene samo u pojedinoj grupi na razini roda

Na slici 21. vidljivo je da je u uzorcima Permamem® identificiran veći broj jedinstvenih rodova u usporedbi sa skupinom Cytoplast™. Najizraženije razlike uočene su za rodove *Francisella*, *Reyranella* i *Natronoflexus*. *Francisella* je dominirala u uzorcima Permamem® s relativnom zastupljenošću od 2,4%, dok su *Reyranella* (0,1%), *Rhodoplanes* i *Hungatella* (0,04%) bile slabije zastupljene. Suprotno tomu, u uzorcima Cytoplast™ pronađeni su članovi rodova *Natronoflexus* (0,7%), *Tissierella* (0,04%), *Johnsonella* (0,2%) i *Limosilactobacillus*, koji nisu detektirani u skupini Permamem®. Ostali rodovi, prikazani na slici 21., pripadali su skupini Permamem®, ali su bili prisutni u vrlo niskim udjelima (<0,1%).

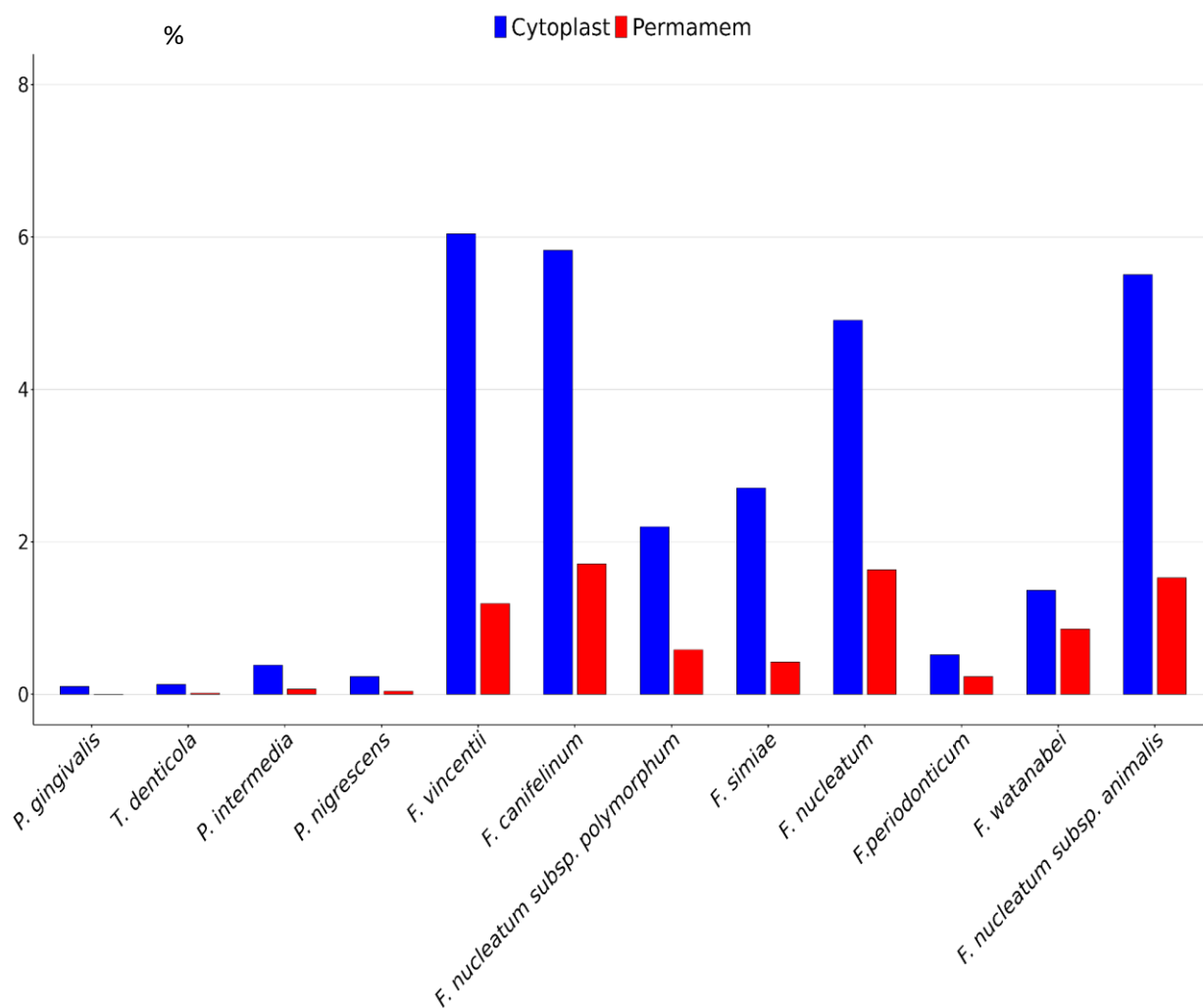
Posebna pozornost posvećena je bila bakterijama značajnim u kontekstu parodontitisa i oralnog zdravlja. Analizirano je devet rodova povezanih s navedenim tematikama: *Dialister*, *Filifactor*, *Fretibacterium*, *Mogibacterium*, *Parvimonas*, *Peptostreptococcus*, *Selenomonas*, *Shuttleworthia* i *Solobacterium* (Slika 22).



Slika 22. Odabrane bakterije povezane s oralnim zdravljem

Analiza njihove relativne zastupljenosti pokazala je da su u uzorcima membrana Cytoplast™ svi navedeni rodovi bili dosljedno zastupljeniji u usporedbi s uzorcima membrana Permamem® (Slika 22). Najizraženija zastupljenost bila je roda *Selenomonas*, čija je zastupljenost u nekim uzorcima grupe Cytoplast™ prelazila 10%, dok je u skupini Permamem® iznosila svega ~2%. Slično tomu, *Parvimonas* i *Peptostreptococcus* bili su značajno zastupljeniji u skupini Cytoplast™, dok su u skupini Permamem® bili gotovo neprimjetni. Rod *Mogibacterium* također je pokazao višu zastupljenost u skupini Cytoplast™ (medijan ~0,05%), ali je u skupini Permamem® bio gotovo odsutan. Ostali rodovi – *Dialister*, *Filifactor*, *Fretibacterium*, *Shuttleworthia* i *Solobacterium* – slijedili su sličan trend (Slika 22). Taj prikaz potvrđen je i statističkom analizom (Wilcoxonov test uz Benjamini–Hochbergovu korekciju) kojom se pokazalo da postoje statistički značajne razlike za rodove *Dialister*, *Mogibacterium*, *Parvimonas* i *Peptostreptococcus* ako se uspoređuju isključivo odabrane bakterije u dvije ispitivane skupine (Slika 22).

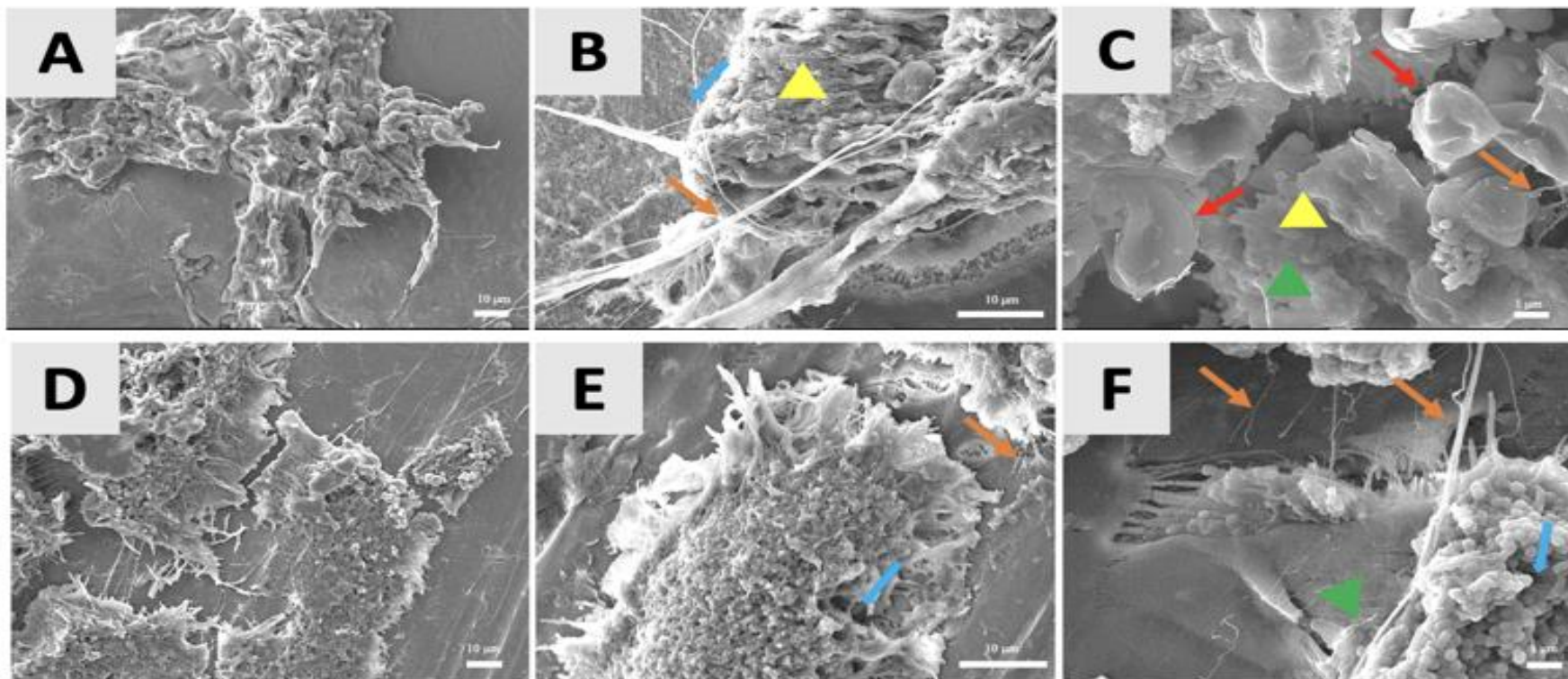
U sklopu bakterija koje pripadaju specifičnim parodontopatogenim kompleksima (crveni i narančasti), identificirano je ukupno 12 vrsta (Slika 23). Članovi crvenog kompleksa uključivali su *Porphyromonas gingivalis* i *Treponema denticola*, a narančasti kompleks uključivao je vrste roda *Fusobacterium* te vrste *Segatella intermedia* i *Segatella nigrescens*.



Slika 23. Vrste narančastog i crvenog kompleksa

Analiza bakterija crvenog i narančastog kompleksa pokazala je da su uzorci skupine Cytoplast™ sadržavali znatno veću zastupljenost bakterija roda *Fusobacterium* (osobito *F. vincentii*, *F. canifelinum* i *F. nucleatum*), pri čemu je prosječna relativna zastupljenost u pojedinim slučajevima prelazila 5%. Suprotno tomu, uzorci s membrane Permamem® pokazivali su općenito niže vrijednosti zastupljenosti. Vrste poput *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Segatella intermedia* i *Segatella nigrescens* zabilježene su u vrlo niskim udjelima u obje skupine, što upućuje na to da ne predstavljaju dominantne članove crvenog i narančastog kompleksa u analiziranim uzorcima. Ti rezultati pokazuju dominantnost vrsta roda *Fusobacterium* u uzorcima membrane Cytoplast™ u odnosu na Permamem®, dok je prisutnost patogena crvenog kompleksa ostala ograničena (Slika 24).

4.7. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)



Slika 24. Reprezentativne slike pretražne elektronske mikroskopije biofilma formiranog na membranama iz grupe (Cytoplast™; C) (A–C) i (Permamem®; P) (D–F) pri različitim uvećanjima: 800× (A, D), 2000× (B, E) i 5000× (C, F)

(A–C) Reprezentativna membrana C prikazuje gustu mrežu izvanstaničnog matriksa (narančaste strelice), s nitima izvanstaničnog materijala koji je isprepleten s tkivnim stanicama (crvene strelice). Skupine kokusa raspršene su po površini, često se pridružujući stanicama tkiva i dijelovima membrane. Polimerske ovojnice ili "sweateri" (žuti trokutići), koje obavijaju bakterijske stanice, također su uočene. (D–F) Reprezentativna membrana P prikazuje zreli miješani biofilm s vidljivim slojevima izvanstanične polimerske tvari (zelena trokutić) i nitima izvanstaničnog materijala. Plave strelice označavaju vodene kanale s različitim otvorima, koji omogućuju razmjenu hranjivih i otpadnih tvari unutar biofilma. Membrana P pokazuje manje tkivnih stanica u usporedbi s membranom C, iako je biofilm prisutan na netaknutim površinama i oštećenim regijama membrane.

SEM mikrofotografije pružile su detaljne vizualizacije površinske topografije i karakteristika biofilma membrana Permamem® i Cytoplast™. SEM snimanje otkrilo je viševrsne biofilmove koji su karakterizirani kombinacijom bakterijskih morfologija - štapićastih, spiralnih i nakupina koka - raspoređenih po površinama membrane (Slika 25). Bakterije u biofilmovima mogu pokazivati različite morfološke oblike koji doprinose njihovoj strukturnoj organizaciji i funkciji. Koki su sferično oblikovane bakterije koje se često nakupljaju, tvoreći guste mikrokolonije. Štapićaste su bakterije izdužene i cilindrične, obično se poravnavaju i tvore nitaste strukture unutar biofilмова. Spiralno oblikovane bakterije imaju spiralni ili uvijeni oblik, što pomaže njihovoj pokretljivosti i omogućuje im snalaženje u okruženjima biofilma. Te različite bakterijske morfologije imaju ulogu u održavanju integriteta biofilma i doprinose njegovoj složenosti. Uočene su jedinstvene topografske razlike između dviju membrana. U membranama skupine Cytoplast™ bila je vidljiva gusta mreža izvanstanične matrice, s nitima izvanstanične tvari isprepletenim među stanicama tkiva. Male nakupine koka prijanjale su i na stanice tkiva i na površinu membrane, pri čemu su bakterijske stanice bile enkapsulirane polimernim slojevima ili "džemperima", raspoređenim po matrici (Slika 25 A–C). Membrane skupine Permamem® (Slika 25 D,E) pokazale su, međutim, zrele nakupine biofilma s glatkim izvanstaničnim slojevima polimerne tvari i izrazitim vodenim kanalima različitih promjera. Biofilmovi su uočeni i na netaknutim površinama membrana i na područjima sa strukturnim neravninama. Međutim, prisutnost stanica tkiva na membranama skupine Permamem® bila je znatno niža nego na membranama skupine Cytoplast™.

5. RASPRAVA

U ovom randomiziranom kontroliranom istraživanju (RCT) istražili smo sastav i raznolikost mikrobnog biofilma dviju različitih membrana d-PTFE, P (Permamem®) i C (Cytoplast™), četiri tjedna nakon očuvanja alveole. Pomoću SEM, RT-qPCR, NGS i CFU/ml analiza bakterijske adhezije, kvantifikacije vrsta i mikrobnog raznolikosti, cilj nam je bio utvrditi utječe li izbor membrane na mikrobnu dinamiku.

Predstavljeni RCT ima jedinstven dizajn i prva je studija koja istražuje mikrobnu raznolikost na visokoj molekularnoj razini u kliničkim uvjetima otvorenog cijeljenja s membranama d-PTFE za regeneraciju tkiva. Pristup otvorenog cijeljenja nudi višestruke prednosti, uključujući očuvanje mukogingivalnog ruba, poticanje stvaranja šireg pojasa keratinizirane sluznice nakon cijeljenja i minimiziranje postoperativne nelagode, pri čemu pacijenti prijavljuju smanjenje otekline i boli [158,159]. Sličan dizajn studije nedavno su predstavili Mazzucchi i suradnici [118], koji su analizirali membrane d-PTFE s pomoću SEM-a i testa BioTimer™ četiri tjedna nakon očuvanja alveole, ali njihova analiza nije se proširila na dubinsko istraživanje mikrobnog genoma kao što je to provedeno u našoj studiji. Mazzucchi i sur. izvijestili su da su membrane d-PTFE kolonizirane mikrobiomom s obje strane, ali ukupno bakterijsko opterećenje bilo je nisko, što je omogućilo da proces zacjeljivanja teče bez ikakvih komplikacija, što se slaže s našim nalazima o razdoblju zacjeljivanja bez komplikacija.

Jedna od ključnih prednosti neresorptivnih membrana njihova je dostupnost za upotrebu u otvorenim pristupima zacjeljivanja, koji nude nekoliko prednosti u regenerativnim postupcima koji uključuju alveolarnu kost i sluznicu [160,161]. Međutim, izloženost membrane u tim pristupima može poslužiti kao rezervoar za mikroorganizme, povećavajući rizik od infekcije i potencijalno izazivajući parodontitis, posebno kod pacijenata s povišenim razinama parodontopatogena [162,163]. Nedavna studija Gila i sur. [164] predstavila je novi 3D-printani aparat za procjenu bakterijskog prianjanja i prodiranja u d-PTFE i kolagene membrane. Njihovi nalazi potvrdili su da se prianjanje i prodiranje bakterija značajno razlikuju među različitim vrstama membrana, pokazujući da membrane d-PTFE pokazuju otpornost na prodiranje bakterija uz održavanje prianjanja na površinu, što je važno jer služe kao fizičke barijere tijekom regeneracije tkiva [63].

Arhitektura biofilma odnosi se na strukturnu organizaciju mikroorganizama koji tvore biofilm [165]. Biofilmovi su neujednačena, uređena skupina mikroorganizama koji žive unutar EPS-a koju sama skupina proizvodi [166]. Prijanjaju jedni na druge i postoje na živim ili neživim površinama. Biofilmovi postoje gotovo svugdje, nastanjujući medicinske implantate, živa tkiva, vodovodne kanale, cijevi, bolničke podove, jedinice za preradu hrane i druge biotičke i abiotičke površine [167,168]. Arhitektura biofilma ima značajan utjecaj na njegove biološke funkcije, ekološke uloge i otpornost na vanjske čimbenike. Važna je za zaštitu, korištenje resursa i interakcije mikroba. Stoga je strukturno znanje o biofilmovima veoma važno za razumijevanje strategije njihova preživljavanja i ponašanja [169–172]. Imajući to na umu, SEM rezultati otkrili su raznolikost u sastavu biofilma i površinskim karakteristikama dviju membrana d-PTFE. Viševrsni biofilmovi, koji se sastoje od bakterija u obliku štapića i spirale te nakupina koka, uočeni su na membranama obiju skupina, P i C (slika 24), što odražava složene mikrobne ekosustave tipične za usnu šupljinu [173,174]. Membrane skupine C pokazale su guste izvanstanične matriksne mreže i polimerne ovojnice, što sugerira robustan razvoj biofilma s jakom adhezijom bakterija, posebno koka, i na stanicama tkiva i na površini membrane. S druge strane, membrane skupine P pokazale su zrele nakupine biofilma, karakterizirane na temelju glatkih EPS slojeva i vodenih kanala, ali s manje stanica tkiva koje prijanjaju na membranu. Uočene strukturne razlike u stvaranju biofilma na membranama podudaraju se s nalazima prethodnih studija koje su ispitivale adheziju bakterija na membrane d-PTFE. Istraživanje *in vitro* pokazalo je da varijacije u mikrostrukturama membrana, poput njihove kristalnosti i hrapavosti površine, značajno utječu na prijanjanje bakterija i razvoj biofilma [175]. P je hidrofobna i kruta membrana kojom je teže rukovati, no odlikuje se glatkom unutrašnjom površinom koja potencijalno smanjuje mogućnost vezanja bakterija u usnoj šupljini. S druge strane, C ima hrapavu unutrašnju površinu. Upravo svojstva površine koja dolazi u kontakt s bakterijama presudna su za njihovu adheziju i razvoj biofilma.

Prema istraživanju Begić i suradnika [117], obje membrane imaju identičan kemijski sastav, ali se razlikuju u mikrostrukтури – stupnju kristaliničnosti, veličini i morfologiji kristalita te u površinskoj hrapavosti. Pokazalo se da je nanometarska hrapavost ključan čimbenik u ranoj fazi bakterijske adhezije. Membrana C, s višim stupnjem kristaliničnosti (78,6%), ima manju nanohrapavost, što rezultira većim vezivanjem bakterija u usporedbi s membranom P (34,2% kristaliničnosti). Povećana kristaliničnost, osim na nanohrapavost, utječe i na krutost površine, što dodatno pridonosi razlikama u adheziji bakterija između dviju membrana. Osim toga, na

jednoj strani svake membrane nalaze se mikrometarski topološki artefakti različitih oblika – kuglaste nakupine kod C te nitaste strukture kod P. Utvrđeno je da ti artefakti i površinska hrapavost jednako utječu na sve ispitivane vrste oralnih bakterija, pri čemu su one dosljedno pokazivale jaču adheziju na membrani C. Ti nalazi upućuju na to da mikrostrukturna svojstva membrana d-PTFE imaju važnu ulogu u određivanju razvoja biofilma, što je u skladu s razlikama uočenim između membrana skupine P i C u ovoj studiji. Dobro je poznato da gusti biofilmovi s visokom gustoćom stanica mogu stvoriti zaštitno mikrokružje koje povećava njihovu otpornost na vanjske prijetnje, poput antimikrobnih sredstava i imunoloških odgovora [176,177]. Nasuprot tomu, vodeni kanali u membranama skupine P mogli bi poticati protok hranjivih tvari i uklanjanje otpada, potencijalno izbjegavajući mikrobnu kolonizaciju [178].

Kvantitativnom reakcijom lančane polimeraze u stvarnom vremenu istražili smo bakterijsku dinamiku na membranama d-PTFE tijekom četverotjednog razdoblja zacjeljivanja, istražujući razlike u mikrobnom sastavu između membrana skupine P i C. Analiza RT-qPCR rezultata nije pokazala statistički značajne razlike u relativnoj brojnosti između skupina P i C za testirane bakterijske vrste (*S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *A. Actinomycescomitans* i *V. parvula*). Vrijednosti $2^{\Delta Ct}$ za *V. parvula* bile su najviše među ispitivanim bakterijskim vrstama (Slika 10). Najveća brojnost *V. parvula* zapažena je u obje, P i C, ispitivane skupine što se može i očekivati s obzirom na to da je *V. parvula* gram-negativni, anaerobni kok koji se često nalazi u ljudskoj usnoj šupljini. *V. parvula* ima važnu ulogu u stvaranju zubnog biofilma metabolizirajući laktat koji proizvode druge oralne bakterije, poput *Streptococcus* sp., u slabije kiseline, čime utječe na ukupni pH i mikrobni sastav biofilma [179]. Spomenuto metaboličko križno hranjenje potiče raznolikost mikrobne zajednice i doprinosi sazrijevanju i stabilnosti dentalnih biofilmova [180]. Iako statistički značajna razlika nije utvrđena među skupinama, uočili smo malo veću brojnost *V. parvula* u skupini P. U kontekstu dentalnih biofilmova na membranama skupine P i C to nam sugerira da membrana P predstavlja okružje koje podržava sazrijevanje biofilma i metaboličko križno hranjenje, potencijalno poboljšavajući mikrobnu stabilnost i otpornost. To se poklapa sa zrelim nakupinama biofilma koji je uočen u SEM analizi, što bi moglo dodatno potvrditi ulogu *V. parvula* kao svojevrsnog mosta u razvoju složenih arhitektura biofilma. Također smo uočili malo veću vrijednost $2^{\Delta Ct}$ *S. mutans* u grupi C u odnosu na P. *S. mutans* kao patobiont mogao bi pridonositi izraženijem disbiotičkom potencijalu grupe C [126,181–183].

Ovom studijom praćen je i porast broja bakterija (CFU/ml) na dvije vrste membrana, C i P. Uočen je statistički značajno veći broj bakterija u sve četiri praćene kategorije: obvezne anaerobe, aerobne bakterije, streptokoke i ukupne bakterije na membrani C u odnosu na P. Rezultati pokazuju veću bakterijsku adheziju na površini membrana C, što je rezultat fizikalnih svojstva, dok P pokazuje smanjenu bakterijsku kolonizaciju. Veća mikrobna kolonizacija može uzrokovati povećan rizik nastanka infekcija te komplikacija poput upale, gubitka grafta te produženo vrijeme ozdravljenja. S druge strane, slabija bakterijska kolonizacija na membranama P upućuje na veću otpornost pri formiranju biofilma, što ih čini pogodnijima za pacijente s višim rizikom od infekcija. Dosadašnja istraživanja ističu da su veoma važne površinske karakteristike membrana koje se koriste u kliničkoj praksi. Istraživanja o membranama d-PTFE C i P pokazuju da njihova struktura i površinska energija utječu na interakciju s bakterijama te služe kao efikasna barijera u dentalnoj medicini. Također, potrebno je posebno istaknuti da materijal membrane treba pažljivo birati uzimajući u obzir ne samo biokompatibilnost nego i sposobnost minimiziranja mikrobiološke kontaminacije koja može narušiti ishod terapije [184,185].

Sekvenciranje 16s rRNK i novi bioinformatički alati omogućuju detaljnu analizu i uvid u sastav mikrobioloških kolonizatora na membranama d-PTFE, koje predstavljaju specifičnu nišu za razvoj jedinstvenih mikrobioloških zajednica. Površine različitih tipova membrana očekivano su kolonizirane raznolikim paletama mikroorganizama. Bakterijska adhezija ovisi o različitim mikrostrukturnim karakteristikama svake korištene membrane, C ili P (stupanj kristaliničnosti, nanoskalna hrapavost ili topološki artefakti). Usporedbom ukupnog broja očitanih sekvenci 16s rRNK, veće vrijednosti zabilježene su na membrani C, što sugerira veću stopu prijanjanja i akumulacije bakterija u usporedbi s membranama P. Pri usporedbi raznolikosti vrsta, na membranama P detektirano je 275 vrsta, a na membranama C detektirane su 242 vrste. Smanjena raznolikost vrsta u oralnoj mikrobioti već je prethodno detektirana i opisana kao dio disbioze, te predstavlja poremećaj u ravnoteži mikrobiološke zajednice unutar oralnog mikrobioma [186]. Disbioza može smanjiti broj vrsta koje doprinose zdravoj ravnoteži u specifičnim biofilmovima i potaknuti prekomjerni rast broja patobionta i oralnih patogena, što uzrokuje upalu, parodontitis, gubitak zuba, implantata i kosti.

Grupa P i C također su se razlikovale u prevladavajućim rodovima; u grupi P detektirani su *Streptococcus* (21%), *Haemophilus* (10%), *Fusobacterium* (8%) i *Neisseria* (7%). S druge strane, grupa C pokazala je visoku zastupljenost *Fusobacteriuma* (29%) i *Streptococca* (15%),

te se razlikovala u ostatku dominantnih taksona. Što se tiče detektiranih vrsta, u grupi P dominirali su *Streptococcus mutans* (10%), *Haemophilus parainfluenzae* (10%) i *Moraxella cerebrosus* (8%), a u grupi C prevladavale su vrste roda *Fusobacterium*: *F. animalis* (6%), *F. canifelinum* (6%) i *F. vincentii* (6%). Ti rezultati sugeriraju sporiju tvorbu biofilma na membranama P s većim udjelom *Streptococcus* spp., a viša razina *Fusobacterium* spp. pokazuje razvijeniju zrelost biofilma te prijelaz u deblji anaerobni sloj na membrani C, što može uzrokovati disbiozu [127,149,186–191].

Statistički značajni bakterijski rodovi koji su se razlikovali između skupina membrana P i C bili su *Kingella*, *Corynebacterium*, *Haemophilus* te vrste *Kingella bonacorsii* i *Haemophilus parainfluenzae* na membranama P, što pokazuje povećanu prisutnost rodova povezanih sa zdravim mikrobiomom i vrsta koje su ključne za ograničavanje patogena i patobionta. Suprotno tomu, patogeni rodovi poput *Segatella* i *Fusobacterium* s različitim vrstama pokazali su značajno veću kolonizaciju na membrani C, što pokazuje različite mikrobiološke profile između analiziranih skupina. Analizom ukupnih podataka treba zaključiti da membrane C mogu stvoriti mikrookružje unutar specifičnog područja koje pogoduje mikrobiološkoj zajednici usmjerenoj prema disbiozi. Stvaranje takvog biofilma na membranama C smanjuje broj zdravlju korisnih vrsta bakterija, otvara prostor i olakšava uvjete za dominaciju patobiontskih i patogenih vrsta.

Rijetke bakterije detektirane na membranama P su: *Francisella*, *Reyranella*, *Rhodoplanes* i *Hungatella*. Na membranama C su: *Natronoflexus*, *Tissierella* i *Johnsonella*. Ti rodovi bakterija pripadaju metabolički različitim bakterijama, dajući uvid u složene i ovisne korelacije unutar specifičnog mikrobiološkog istraživanja kao što su biofilmovi stvoreni na membranama P i C. Zanimljivo, rod *Natronoflexus* uglavnom je detektiran na membranama C, što upućuje na razliku u pH-vrijednosti biofilma s vjerojatno alkalnijim uvjetima u određenim fazama stvaranja biofilma. Rodovi *Selenomonas*, *Parvimonas*, *Peptostreptococcus*, *Dialister*, *Fretibacterium*, *Shuttleworthia* i *Solobacterium* imali su konzistentno višu zastupljenost u uzorcima membrana C potvrđujući veću količinu bakterijskih taksona relevantnih u kontekstu parodontitisa, gubitka implantata i kosti. Taj diferencirani obrazac kolonizacije pokazuje moguću ulogu svojstava specifičnih membrana i specifičnog mikrookružja u oblikovanju strukture mikrobiološke zajednice [188–190].

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pokazuju kako su ključni parodontopatogeni mikroorganizmi iz Socranskyjeve klasifikacije u određenoj količini prisutni i na mikrobnom

biofilmu membrana P i C, pogotovo u segmentu crvenog i narančastog kompleksa. Identificiranje bakterijskih rodova poput *Porphyromonas gingivalis* i *Treponema denticola* u sklopu crvenog kompleksa te bakterijskog roda *Fusobacterium* te *Segatella intermedia* i *Segatella nigrescens* u narančastom kompleksu značajni su u patogenezi upalnih promjena te razvoju parodontnih bolesti [149]. Međutim, važno je naglasiti razliku zastupljenosti takvih bakterija ovisno o tipu membrana. S obzirom na to da je narančasti kompleks povezan s naprednijim fazama stvaranja biofilma i disbiozama, dobiveni rezultati ovog istraživanja upućuju na to da je biofilm membrane C značajno bogatiji bakterijama *Fusobacterium* (*F.vincetii*, *F. Canifelinum* te *F.nucleatum*) čija reativna zastupljenost prelazi 5%. Osim toga, rezultati upućuju na tendenciju stvaranja zrelijeg biofilma na membranama C zbog čega je povećan rizik od upalnih procesa i komplikacija u kliničkoj praksi. Suprotno tomu, membrane P imaju znatno manju kolonizaciju patogenih bakterija što upućuje na povoljniji mikrobn profil biofilma u odnosu na membrane C [192].

Unatoč tomu što su bakterije crvenog kompleksa prepoznate kao najučestaliji patogeni u parodontnim lezijama te su povezane s kliničkim pokazateljima kao što su krvarenje i dubina džepa, ovim istraživanjem dokazano je da nisu predstavljale dominantne članove na ispitivanim membranama. Njihova niska zastupljenosti može biti posljedica specifičnih uvjeta u usnoj šupljini tijekom procesa zacjeljivanja ili karakteristika samih membrana koje ograničavaju njihovu kolonizaciju. Taj fenomen može se tumačiti kao pokazatelj da mikrobiološki sastav biofilma na membranama nije potpuno identičan onome u parodontnim džepovima, nego ovisi o ekološkim nišama i fizikalnim svojstvima površina na membranama.

Dominantnost bakterija roda *Fusobacterium* na membranama C ima važnu ulogu u oblikovanju mikrobne zajednice koja može uzrokovati patogeno mikrokružje, koje karakterizira viša gustoća i zreliji anaerobni biofilmovi [193,194]. To ide u prilog dobivenim rezultatima iz naše studije koje upućuju na veću sklonost stvaranju biofilma s potencijalno disbiotičnom mikrobiotom na membranama C, što može ostaviti posljedice na klinički ishod liječenja poput dužeg vremena oporavka te rizika od upalnih komplikacija. S druge strane, membrane P pokazale su povoljniji mikrobiološki profil s manjom zastupljenošću ključnih patogenih rodova i većom raznolikošću, što može biti od kliničke važnosti prilikom izbora materijala za pacijente s povećanim rizikom od infekcija. Ovi nalazi pokazuju da različita mikrostrukturalna i kemijska svojstva membrana značajno utječu na proces bakterijske kolonizacije i razvoj biofilma. Općenito, rezultati pozitivno koreliraju s važnošću precizne

identifikacije i praćenja parodontopatogenih mikroorganizama kao dijela razumijevanja patogeneze i upravljanja parodontalnim i endodontskim lezijama. Ipak, razlikovanje u mikrobnom sastavu između membrana naglašava potrebu za personaliziranim pristupom u odabiru biomaterijala za regeneraciju kako bi se maksimizirala otpornost na patogene i poboljšali klinički ishodi. Sve navedeno upućuje na komplementarnu vrijednost Socranskyjeve klasifikacije u interpretaciji kliničkih nalaza te podcrtava važnost daljnjih istraživanja koja će produbiti razumijevanje utjecaja svojstava različitih biomaterijala na dinamiku mikrobioloških zajednica i njihovih kliničkih posljedica.

Alfa i beta-raznolikost pokazuju da nema statistički značajne razlike između skupina. Beta-raznolikost mjeri ukupne razlike u sastavu mikrobne zajednice između skupina, koristeći metrike poput Bray-Curtisa. S obzirom na to da nema statističke značajne razlike među ispitivanim skupinama u alfa i beta-raznolikosti, to upućuje na to da su na razini cijele zajednice mikrobni profili ispitivanih skupina P i C uglavnom slični. Analizom NGS utvrđeno je suprotno, postoje statistički značajne razlike na taksonomskim razinama roda i vrste. Razlog tomu najvjerojatnije je veličina ispitivane skupine. Istraživanja literature upućuju na to da se alfa i beta-raznolikost počinju pokazivati statističkim značajnima tek u mnogobrojnijim ispitivanim skupinama (iznad 100 uzoraka po ispitivanoj skupini) [155,195]. Povećanje skupine smanjuje utjecaj razlika u oralnom mikrobiomu između pojedinaca u odnosu na izračune raznolikosti. Stoga smo se usredotočili na analizu diferencijalne abundancije (kao što je ALDEx2) koja pojedinačno procjenjuje svaki takson identificirajući specifične taksone čija se relativna abundancija razlikuje između skupina, čak i ako te promjene znatno ne mijenjaju ukupnu strukturu zajednice.

Usporedba rezultata NGS-a i RT-qPCR-a pokazuje razlike u detekciji specifičnih bakterijskih vrsta. Određene bakterije koje su identificirane RT-qPCR-om, poput *A. actinomycetemcomitans*, nisu mogle biti identificirane na taksonomskom nivou vrste metodom NGS sekvenciranja 16S rRNK. Međutim, analiza rezultata NGS-a na višim taksonomskim razinama dokazuje rod *Aggregatibacter*, što sugerira da iako identifikacija na razini vrste nije postignuta, vrsta *A. actinomycetemcomitans* bila je zastupljena u uzorcima. Nekoliko čimbenika moglo bi objasniti te razlike. RT-qPCR je vrlo osjetljiv i sposoban detektirati specifične gene čak i pri niskim koncentracijama, što ga čini učinkovitim za identifikaciju bakterija koje su prisutne u minimalnim količinama [196, 197]. NGS omogućuje sekvenciranje hipervarijabilnih regija uzorka, no ponekad ne osigurava pouzdanu rezoluciju do nižih taksonomskih razina –

vrste osobito kada su one prisutne u vrlo niskim koncentracijama [198]. Štoviše, ako je prag detekcije postavljen previsoko, bakterije koje su prisutne u manjim količinama možda se neće identificirati s pomoću NGS-a [199–201]. Stoga naši rezultati sugeriraju važnost komplementarne analize i korištenja različitih tehnika pri istraživanju oralnog mikrobioma.

Cilj je očuvanja alveolarnog grebena očuvati dovoljan koštani temelj potreban za daljnji protetski tretman [202]. Nakon vađenja zuba primjena tehnika vođene regeneracije kosti (GBR) pokazala se učinkovitom i pouzdanom metodom za sprječavanje gubitka volumena grebena tijekom procesa cijeljenja [36,203]. Autologna kost smatra se „zlatnim standardom“ u augmentaciji. Njezina upotreba može biti povezana s određenim komplikacijama, zbog čega se razvijaju alternativni materijali. U ovom istraživanju ispitivane su alveole s očuvanim koštanim stijenkama, kao i alveole kod kojih je bila prisutna resorpcija bukalne koštane stijenke. Unatoč toj razlici, sve alveole analizirane su zajedno, bez stratifikacije prema vrsti defekta. Posljedično, analiza nije provedena zasebno za pojedine tipove alveola, već su se ispitivale isključivo razlike povezane s primjenom različitih membrana. Stoga dobiveni rezultati odražavaju učinak korištenih membrana neovisno o morfologiji alveolarnog defekta, što predstavlja metodološko ograničenje i upućuje na potrebu za budućim istraživanjima koja bi uključivala detaljniju stratifikaciju prema vrsti defekta.

Za potrebe ovog istraživanja provedena je radiološka analiza alveolarnog grebena i histološka analiza koštanog cilindra nakon biopsije alveolarne kosti. Histomorfometrijskom analizom je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u vrijednostima BV/TV i RB u skupini Permamem (BV/TV = $51,76 \pm 7,29\%$, RB = $25,20 \pm 3,32\%$) u odnosu na skupinu Cytoplast (BV/TV = $52,08 \pm 5,68\%$, RB = $25,43 \pm 3,2\%$). Također, CBCT analizom nisu nađene statističke značajne razlike u širini alveolarnog grebena prije vađenja zuba i nakon vađenja zuba u istim navedenim skupinama. Rezultati su pokazali da neovisno o primjeni različite vrste d-PTFE membrane po završetku postupka očuvanja alveole osigurana je dobra osteokondukcija i osteoindukcija, bez znakova upalne reakcije u tkivu.

6. ZAKLJUČCI

1. Vrsta membrana d-PTFE značajno utječe na sastav i raznolikost mikrobnog biofilma tijekom postupka očuvanja alveole.
2. Membrane Cytoplast™ potiču formiranje gušćeg i zrelijeg biofilma zbog gustih izvanstaničnih matriksa i polimerne ovojnice.
3. Membrane Permamem® oblikuju nakupine biofilma s glatkim slojevima EPS-a i vodenim kanalima što uzrokuje smanjeno prijanjanje stanica tkiva na membranu.
4. Membrane Permamem® stvaraju biofilm obogaćen bakterijskim rodovima i vrstama povezanim s oralnim zdravljem, poput *Streptococcus*, *Corynebacterium* i *Kingella*.
5. Uočena mikrobna raznolikost na membranama Cytoplast™ uz povećanu prisutnost patobionta povezanim s parodontnim bolestima mogao bi smanjiti njezinu učinkovitost u postupku očuvanja alveole.
6. Dodatno, membrana Cytoplast™ i njezina učinkovitost mogu biti smanjene zbog uočene znatne zastupljenosti *Segatella maculosa* i različitih vrsta *Fusobacterium*.
7. Primjenom mješavine goveđeg koštanog biomaterijala i autologne kosti postignuta je optimalna regeneracija koštane alveole bez obzira na korištenu vrstu d-PTFE membrane (Cytoplast™ i Permamem®).

7. LITERATURA

1. Florencio-Silva R, Sasso GRDS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Res. Int.* 2015;2015:1–17.
2. Hart NH, Newton RU, Tan J i sur.. Biological basis of bone strength: anatomy, physiology and measurement. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 2020;20:347–71.
3. Okamoto K, Nakashima T, Shinohara M i sur. Osteoimmunology: The Conceptual Framework Unifying the Immune and Skeletal Systems. *Physiol. Rev.* 2017;97:1295–349.
4. Sanja Zoričić Cvek; Dragica Bobinac, Luka Đudarić i Olga Cvijanović. Pregradnja koštanog sustava. *Med. Flum.* 2015;51(4):482–93.
5. Marny Mohamed A. An Overview of Bone Cells and their Regulating Factors of Differentiation. *Malays J Med Sci* 2008;15:8-12.
6. Buck DW, Dumanian GA. Bone Biology and Physiology: Part I. The Fundamentals. *Plast. Reconstr. Surg.* 2012;129:1314–20.
7. Martinović, Danijela Đ Luka. The basics of bone biology. 2013;50:21–38.
8. Bolamperti S, Villa I, Rubinacci A. Bone remodeling: an operational process ensuring survival and bone mechanical competence. *Bone Res.* 2022;10:48.
9. Rochefort GY, Benhamou C. Osteocytes are not only mechanoreceptive cells. *Int. J. Numer. Methods Biomed. Eng.* 2013;29:1082–8.
10. Aarden EM, Nijweide PJ, Burger EH. Function of osteocytes in bone. *J. Cell. Biochem.* 1994;55:287–99.
11. Marahleh A, Kitaura H, Otori F, Noguchi T, Mizoguchi I. The osteocyte and its osteoclastogenic potential. *Front. Endocrinol.* 2023;14:1121727.

12. Younten SE, Kemp JP, Logan JG i sur. Osteocyte transcriptome mapping identifies a molecular landscape controlling skeletal homeostasis and susceptibility to skeletal disease. *Nat. Commun.* 2021;12:2444.
13. Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS. The Death of Osteocytes via Apoptosis Accompanies Estrogen Withdrawal in Human Bone*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997;82:3128–35.
14. Choi JUA, Kijas AW, Lauko J, Rowan AE. The Mechanosensory Role of Osteocytes and Implications for Bone Health and Disease States. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022;9:770143.
15. Prideaux M, Loveridge N, Pitsillides AA, Farquharson C. Extracellular Matrix Mineralization Promotes E11/gp38 Glycoprotein Expression and Drives Osteocytic Differentiation. *PLoS ONE* 2012;7:e36786.
16. Wein MN, Liang Y, Goransson O i sur. SIKs control osteocyte responses to parathyroid hormone. *Nat. Commun.* 2016;7:13176.
17. Rosenberg N, Rosenberg O, Soudry M. Osteoblasts in Bone Physiology – Mini Review. *Rambam Maimonides Med. J.* 2012;3(2):e0013.
18. Marks SC, Popoff SN. Bone cell biology: The regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am. J. Anat.* 1988;183:1–44.
19. Wang J, Wang L, Zhou Z i sur. Biodegradable Polymer Membranes Applied in Guided Bone/Tissue Regeneration: A Review. *Polymers* 2016;8:115.
20. Orwoll ES. Toward an Expanded Understanding of the Role of the Periosteum in Skeletal Health. *J. Bone Miner. Res.* 2003;18:949–54.
21. Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells* 2020;9:2073.
22. Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM, Jee WS. Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc.* 1989;3:953–60; discussion 960-961.

23. Parfitt AM. The Bone Remodeling Compartment: A Circulatory Function for Bone Lining Cells. *J. Bone Miner. Res.* 2001;16:1583–5.
24. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat. Rev. Genet.* 2003;4:638–49.
25. Chen K, Zhao L, Sun J i sur. Utilizing biodegradable alloys as guided bone regeneration (GBR) membrane: Feasibility and challenges. *Sci. China Mater.* 2022;65:2627–46.
26. Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG. Estrogen and the skeleton. *Trends Endocrinol. Metab.* 2012;23:576–81.
27. Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 2007;40:251–64.
28. Boyce BF, Xing L. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr. Osteoporos. Rep.* 2007;5:98–104.
29. Šromová V, Sobola D, Kaspar P. A Brief Review of Bone Cell Function and Importance. *Cells* 2023;12:2576.
30. Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone Sialoprotein. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1999;10:79–98.
31. Hunter GK, Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993;90:8562–5.
32. Järveläinen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R. Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* 2009;61:198–223.
33. Midura RJ, Midura SB, Su X, Gorski JP. Separation of newly formed bone from older compact bone reveals clear compositional differences in bone matrix. *Bone* 2011;49:1365–74.
34. Halper J, Kjaer M. Basic Components of Connective Tissues and Extracellular Matrix: Elastin, Fibrillin, Fibulins, Fibrinogen, Fibronectin, Laminin, Tenascins and Thrombospondins. *Adv Exp Med Biol* 2014;802:31–47.

35. Couchman JR, Pataki CA. An Introduction to Proteoglycans and Their Localization. *J. Histochem. Cytochem.* 2012;60:885–97.
36. Bonewald LF. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *BoneKEY-Osteovision* 2006;3:7–15.
37. Brockhausen I, Schutzbach J, Kuhns W. Glycoproteins and Their Relationship to Human Disease. *Cells Tissues Organs* 1998;161:36–78.
38. T. A, C. J. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur. Spine J.* 2001;10:S96–101.
39. Stammnitz S, Klimczak A. Mesenchymal Stem Cells, Bioactive Factors, and Scaffolds in Bone Repair: From Research Perspectives to Clinical Practice. *Cells* 2021;10:1925.
40. Schell H, Duda GN, Peters A i sur. The haematoma and its role in bone healing. *J. Exp. Orthop.* 2017;4:5.
41. Einhorn TA. The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing: *Clin. Orthop.* 1998;355S:S7–21.
42. Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury* 2005;36:S5–7.
43. Walmsley GG, Ransom RC, Zielins ER i sur. Stem Cells in Bone Regeneration. *Stem Cell Rev. Rep.* 2016;12:524–9.
44. Khan RS, Aslam M, Ucer C, Wright S. Success of Xenografts in Alveolar Ridge Preservation Based on Histomorphometric Outcomes. *Dent. J.* 2023;11:215.
45. Araujo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J. Clin. Periodontol.* 2005;32:212–8.
46. Horowitz R, Holtzclaw D, Rosen PS. A review on alveolar ridge preservation following tooth extraction. *J. Evid.-Based Dent. Pract.* 2012;12:149–60.
47. Stumbras A, Kuliesius P, Januzis G, Juodzbaly G. Alveolar Ridge Preservation after Tooth Extraction Using Different Bone Graft Materials and Autologous Platelet Concentrates: a Systematic Review. *J. Oral Maxillofac. Res.* 2019.;10(1):e2.

48. Tan WL, Wong TLT, Wong MCM, Lang NP. A systematic review of post-extraction alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans. *Clin. Oral Implants Res.* 2012;23 Suppl 5:1–21.
49. Trombelli L, Farina R, Marzola A i sur. Modeling and remodeling of human extraction sockets. *J. Clin. Periodontol.* 2008;35:630–9.
50. Chappuis V, Engel O, Reyes M i sur. Ridge alterations post-extraction in the esthetic zone: a 3D analysis with CBCT. *J. Dent. Res.* 2013;92:195S-201S.
51. Clavero J, Lundgren S. Ramus or Chin Grafts for Maxillary Sinus Inlay and Local Onlay Augmentation: Comparison of Donor Site Morbidity and Complications. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 2003;5:154–60.
52. Nevins M, Mellonig JT, Clem DS, Reiser GM, Buser DA. Implants in regenerated bone: long-term survival. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* 1998;18:34–45.
53. Froum S, Cho S, Rosenberg E, Rohrer M, Tarnow D. Histological Comparison of Healing Extraction Sockets Implanted With Bioactive Glass or Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft: A Pilot Study. *J. Periodontol.* 2002;73:94–102.
54. Iasella JM, Greenwell H, Miller RL i sur. Ridge Preservation with Freeze-Dried Bone Allograft and a Collagen Membrane Compared to Extraction Alone for Implant Site Development: A Clinical and Histologic Study in Humans. *J. Periodontol.* 2003;74:990–9.
55. Avila M, Ojcius DM, Yilmaz Ö. The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest. *DNA Cell Biol.* 2009;28:405–11.
56. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 2005;36:1392–404.
57. Avila-Ortiz G, Elangovan S, Kramer KWO, Blanchette D, Dawson DV. Effect of alveolar ridge preservation after tooth extraction: a systematic review and meta-analysis. *J. Dent. Res.* 2014;93:950–8.

58. Kalsi AS, Kalsi JS, Bassi S. Alveolar ridge preservation: why, when and how. *Br. Dent. J.* 2019;227:264–74.
59. Barone A, Aldini NN, Fini M i sur. Xenograft versus extraction alone for ridge preservation after tooth removal: a clinical and histomorphometric study. *J. Periodontol.* 2008;79:1370–7.
60. Sano T, Kuraji R, Miyashita Y i sur. Biomaterials for Alveolar Ridge Preservation as a Preoperative Procedure for Implant Treatment: History and Current Evidence. *Bioengineering* 2023;10:1376.
61. Kim YK, Ku JK. Guided bone regeneration. *J. Korean Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 2020;46:361–6.
62. Solakoglu Ö, Heydecke G, Amiri N, Anitua E. The use of plasma rich in growth factors (PRGF) in guided tissue regeneration and guided bone regeneration. A review of histological, immunohistochemical, histomorphometrical, radiological and clinical results in humans. *Ann. Anat. - Anat. Anz.* 2020;231:151528.
63. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur. J. Oral Sci.* 2017;125:315–37.
64. Meloni SM, Jovanovic SA, Urban I i sur. Horizontal ridge augmentation using GBR with a native collagen membrane and 1:1 ratio of particulate xenograft and autologous bone: A 3-year after final loading prospective clinical study. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 2019;21:669–77.
65. Cucchi A, Vignudelli E, Fiorino A, Pellegrino G, Corinaldesi G. Vertical ridge augmentation (VRA) with Ti-reinforced d-PTFE membranes or Ti meshes and collagen membranes: 1-year results of a randomized clinical trial. *Clin. Oral Implants Res.* 2021;32:1–14.
66. Alqahtani A, Moorehead R, Asencio IO. Guided Tissue and Bone Regeneration Membranes: A Review of Biomaterials and Techniques for Periodontal Treatments. *Polymers* 2023;15:3355.
67. Misch CM. Autogenous Bone: Is It Still the Gold Standard? *Implant Dent.* 2010;19:361.

68. Pikos MA. Block Autografts for Localized Ridge Augmentation: Part II. The Posterior Mandible. *Implant Dent.* 2000;9:67–75.
69. Bernardi S, Macchiarelli G, Bianchi S. Autologous Materials in Regenerative Dentistry: Harvested Bone, Platelet Concentrates and Dentin Derivates. *Molecules* 2020;25:5330.
70. Schmidt AH. Autologous bone graft: Is it still the gold standard? *Injury* 2021;52:S18–22.
71. Roberts TT, Rosenbaum AJ. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: The bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis* 2012;8:114–24.
72. Ferraz MP. Bone Grafts in Dental Medicine: An Overview of Autografts, Allografts and Synthetic Materials. *Materials* 2023;16:4117.
73. Galindo-Moreno P, Ávila G, Fernández-Barbero JE i sur. Clinical and histologic comparison of two different composite grafts for sinus augmentation: a pilot clinical trial. *Clin. Oral Implants Res.* 2008;19:755–9.
74. Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Rossi F, Perale G. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *J. Clin. Periodontol.* 2019;46:92–102.
75. Kolk A, Handschel J, Drescher W i sur. Current trends and future perspectives of bone substitute materials – From space holders to innovative biomaterials. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* 2012;40:706–18.
76. Katz J, Mukherjee N, Cobb RR, Bursac P, York-Ely A. Incorporation and Immunogenicity of Cleaned Bovine Bone in a Sheep Model. *J. Biomater. Appl.* 2009;24:159–74.
77. Perić Kačarević Z, Kavehei F, Houshmand A i sur. Purification processes of xenogeneic bone substitutes and their impact on tissue reactions and regeneration. *Int. J. Artif. Organs* 2018;41:789–800.
78. Cho JS, Kim H, Um S, Rhee S. Preparation of a novel anorganic bovine bone xenograft with enhanced bioactivity and osteoconductivity. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2013;101B:855–69.

79. Torres J, Tamimi F, Alkhraisat MH i sur. Platelet-rich plasma may prevent titanium-mesh exposure in alveolar ridge augmentation with anorganic bovine bone. *J. Clin. Periodontol.* 2010;37:943–51.
80. Polymeri A, Anssari-Moin D, Van Der Horst J i sur. Surgical treatment of peri-implantitis defects with two different xenograft granules: A randomized clinical pilot study. *Clin. Oral Implants Res.* 2020;31:1047–60.
81. Jensen SS, Broggini N, Hjørtting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and β -tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin. Oral Implants Res.* 2006;17:237–43.
82. Lindhe J, Cecchinato D, Donati M, Tomasi C, Liljenberg B. Ridge preservation with the use of deproteinized bovine bone mineral. *Clin. Oral Implants Res.* 2014;25:786–90.
83. Berberi A, Samarani A, Nader N i sur. Physicochemical Characteristics of Bone Substitutes Used in Oral Surgery in Comparison to Autogenous Bone. *BioMed Res. Int.* 2014;2014:1–9.
84. Oguić M, Čandrić M, Tomas M i sur. Osteogenic Potential of Autologous Dentin Graft Compared with Bovine Xenograft Mixed with Autologous Bone in the Esthetic Zone: Radiographic, Histologic and Immunohistochemical Evaluation. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24:6440.
85. Schmitt CM, Doering H, Schmidt T i sur. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann® BoneCeramic, Bio-Oss®, Puros®, and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. *Clin. Oral Implants Res.* 2013;24:576–85.
86. Ratnayake JTB, Mucalo M, Dias GJ. Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends: Substituted HA for Bone Regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2017;105:1285–99.
87. Ratnayake JT, Ross ED, Dias GJ i sur. Preparation, characterisation and in-vitro biocompatibility study of a bone graft developed from waste bovine teeth for bone regeneration. *Mater. Today Commun.* 2020;22:100732.

88. Kumar P, Vinitha B, Fathima G. Bone grafts in dentistry. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2013;5:125.
89. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J. Surg.* 2001;71:354–61.
90. Kakar A, Rao BHS, Hegde S i sur. Ridge preservation using an in situ hardening biphasic calcium phosphate (β -TCP/HA) bone graft substitute—a clinical, radiological, and histological study. *Int. J. Implant Dent.* 2017;3:25.
91. Nair PNR, Luder HU, Maspero FA, Fischer JH, Schug J. Biocompatibility of b-Tricalcium Phosphate Root Replicas in Porcine Tooth Extraction Sockets - A Correlative Histological, Ultrastructural, and X-ray Microanalytical Pilot Study. *J. Biomater. Appl.* 2006;20:307–24.
92. Schlundt C, Schell H, Goodman SB i sur. Immune modulation as a therapeutic strategy in bone regeneration. *J. Exp. Orthop.* 2015;2:1.
93. Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the Inflammatory Response for Enhanced Bone Tissue Regeneration. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2008;14:179–86.
94. Gerber H. Angiogenesis and Bone Growth. *Trends Cardiovasc. Med.* 2000;10:223–8.
95. Ho-Shui-Ling A, Bolander J, Rustom LE i sur. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials* 2018;180:143–62.
96. Baht GS, Vi L, Alman BA. The Role of the Immune Cells in Fracture Healing. *Curr. Osteoporos. Rep.* 2018;16:138–45.
97. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury* 2011;42:551–5.
98. Sasaki JI, Abe GL, Li A i sur. Barrier membranes for tissue regeneration in dentistry. *Biomater. Investig. Dent.* 2021;8:54–63.

99. Kormas I, Pedercini A, Alassy H, Wolff LF. The Use of Biocompatible Membranes in Oral Surgery: The Past, Present & Future Directions. A Narrative Review. *Membranes* 2022;12:841.
100. Caballe-Serrano J, Munar-Frau A, Ortiz-Puigpelat O i sur. On the search of the ideal barrier membrane for guided bone regeneration. *J. Clin. Exp. Dent.* 2018;0–0.
101. Kumari CBN, Ramakrishnan T, Devadoss P i sur. Use of Collagen Membrane in the Treatment of Periodontal Defects Distal to Mandibular Second Molars Following Surgical Removal of Impacted Mandibular Third Molars: A Comparative Clinical Study. *Biology* 2021;10:1348.
102. Ren Y, Fan L, Alkildani S i sur. Barrier Membranes for Guided Bone Regeneration (GBR): A Focus on Recent Advances in Collagen Membranes. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23:14987.
103. Rider P, Kačarević ŽP, Elad A i sur. Analysis of a Pure Magnesium Membrane Degradation Process and Its Functionality When Used in a Guided Bone Regeneration Model in Beagle Dogs. *Materials* 2022;15:3106.
104. Hoornaert A, d'Arros C, Heymann MF, Layrolle P. Biocompatibility, resorption and biofunctionality of a new synthetic biodegradable membrane for guided bone regeneration. *Biomed. Mater.* 2016;11:045012.
105. Wang Z, Liang R, Jiang X i sur. Electrospun PLGA/PCL/OCP nanofiber membranes promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs). *Mater. Sci. Eng. C* 2019;104:109796.
106. Karfeld-Sulzer LS, Ghayor C, Siegenthaler B, Gjoksi B, Pohjonen TH, Weber FE. Comparative study of NMP-preloaded and dip-loaded membranes for guided bone regeneration of rabbit cranial defects: NMP-loaded membranes for guided bone regeneration in rabbits. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2017;11:425–33.
107. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 1982;9:290–6.

108. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennström J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration Case reports. *J. Clin. Periodontol.* 1986;13:604–16.
109. Hämmerle CHF, Araújo MG, Simion M, Osteology Consensus Group 2011. Evidence-based knowledge on the biology and treatment of extraction sockets. *Clin. Oral Implants Res.* 2012;23 Suppl 5:80–2.
110. Carbonell JM, Martín IS, Santos A i sur. High-density polytetrafluoroethylene membranes in guided bone and tissue regeneration procedures: a literature review. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2014;43:75–84.
111. Limitations and options using resorbable versus nonresorbable membranes for successful guided bone regeneration. *Quintessence Int.* 2017;48:131–47.
112. Zelikman H, Slutzkey G, Rosner O i sur. Bacterial Growth on Three Non-Resorbable Polytetrafluoroethylene (PTFE) Membranes-An In Vitro Study. *Mater. Basel Switz.* 2022;15:5705.
113. Turri A, Čirgić E, Shah FA i sur. Early plaque formation on PTFE membranes with expanded or dense surface structures applied in the oral cavity of human volunteers. *Clin. Exp. Dent. Res.* 2021;7:137–46.
114. Trobos M, Juhlin A, Shah FA i sur. *In vitro* evaluation of barrier function against oral bacteria of dense and expanded polytetrafluoroethylene (PTFE) membranes for guided bone regeneration. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 2018;20:738–48.
115. Zhang M, Zhou Z, Yun J i sur. Effect of Different Membranes on Vertical Bone Regeneration: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *BioMed Res. Int.* 2022;2022:1–16.
116. Kasaj A, Reichert C, Götz H i sur. In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. *Head Face Med.* 2008;4:22.

117. Begić G, Petković Didović M, Lučić Blagojević S i sur. Adhesion of Oral Bacteria to Commercial d-PTFE Membranes: Polymer Microstructure Makes a Difference. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23:2983.
118. Mazzucchi G, Lollobrigida M, Laurito D i sur. Microbiological and FE-SEM Assessment of d-PTFE Membrane Exposed to Oral Environment after Alveolar Socket Preservation Managed with Granular nc-HA. *J. Contemp. Dent. Pract.* 2020;21:404–9.
119. Han YW. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Curr. Opin. Microbiol.* 2015;23:141–7.
120. Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C. Role of *Fusobacterium nucleatum* and Coaggregation in Anaerobe Survival in Planktonic and Biofilm Oral Microbial Communities during Aeration. *Infect. Immun.* 1998;66:4729–32.
121. Al-Asfour A, Karched M, Qasim SSB, Zafiropoulos G. Adhesion of *Candida albicans* on PTFE membranes used in guided bone regeneration. *Clin. Exp. Dent. Res.* 2024;10:e902.
122. Saadaoui M, Singh P, Al Khodor S. Oral microbiome and pregnancy: A bidirectional relationship. *J. Reprod. Immunol.* 2021;145:103293.
123. Dewhirst FE, Chen T, Izard J i sur. The Human Oral Microbiome. *J. Bacteriol.* 2010;192:5002–17.
124. Kreth J, Koo H, Diaz PI. The functional oral microbiome: Biofilm environment, polymicrobial interactions, and community dynamics. *Mol. Oral Microbiol.* 2022;37:165–6.
125. Avila M, Ojcius DM, Yilmaz Ö. The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest. *DNA Cell Biol.* 2009;28:405–11.
126. Begić G, Badovinac IJ, Karleuša L i sur. *Streptococcus salivarius* as an Important Factor in Dental Biofilm Homeostasis: Influence on *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Mixed Biofilm. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24:7249.

127. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS i sur. Communication among Oral Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002;66:486–505.
128. Marsh PD. Role of the Oral Microflora in Health. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2000;12:130–7.
129. Huse SM, Ye Y, Zhou Y, Fodor AA. A Core Human Microbiome as Viewed through 16S rRNA Sequence Clusters. *PLoS ONE* 2012;7:e34242.
130. Beck J, Holloway JD, Schwanghart W. Undersampling and the measurement of beta diversity. *Methods Ecol. Evol.* 2013;4:370–82.
131. Willis AD. Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. *Front. Microbiol.* 2019;10:2407.
132. Anderson MJ, Crist TO, Chase JM i sur. Navigating the multiple meanings of β diversity: a roadmap for the practicing ecologist: Roadmap for beta diversity. *Ecol. Lett.* 2011;14:19–28.
133. Bertolini M, Costa R, Barão V i sur. Oral Microorganisms and Biofilms: New Insights to Defeat the Main Etiologic Factor of Oral Diseases. *Microorganisms* 2022;10:2413.
134. De Campos Kajimoto N, De Paiva Buischi Y, Mohamadzadeh M, Loomer P. The Oral Microbiome of Peri-Implant Health and Disease: A Narrative Review. *Dent. J.* 2024;12:299.
135. Dieckow S, Szafranski SP, Grischke J i sur. Structure and composition of early biofilms formed on dental implants are complex, diverse, subject-specific and dynamic. *Npj Biofilms Microbiomes* 2024;10:155.
136. Kreve S, Reis ACD. Bacterial adhesion to biomaterials: What regulates this attachment? A review. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* 2021;57:85–96.
137. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Trends Microbiol.* 2018;26:229–42.

138. Mark Welch JL, Rossetti BJ, Rieken CW, Dewhirst FE, Borisy GG. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016; 113(6):E791 - E800.
139. Caldara M, Belgiovine C, Secchi E, Rusconi R. Environmental, Microbiological, and Immunological Features of Bacterial Biofilms Associated with Implanted Medical Devices. *Clin. Microbiol. Rev.* 2022;35:e00221-20.
140. Lima BP, Shi W, Lux R. Identification and characterization of a novel *Fusobacterium nucleatum* adhesin involved in physical interaction and biofilm formation with *Streptococcus gordonii*. *MicrobiologyOpen* 2017;6:e00444.
141. Li X, Liu Y, Yang X, Li C, Song Z. The Oral Microbiota: Community Composition, Influencing Factors, Pathogenesis, and Interventions. *Front. Microbiol.* 2022;13:895537.
142. Zhou L, Zhang Y, Ge Y, Zhu X, Pan J. Regulatory Mechanisms and Promising Applications of Quorum Sensing-Inhibiting Agents in Control of Bacterial Biofilm Formation. *Front. Microbiol.* 2020;11:589640.
143. Gedif Meseret A. Oral Biofilm and Its Impact on Oral Health, Psychological and Social Interaction. *Int. J. Oral Dent. Health* 2021;7:127.
144. Talib EQ, Taha GI, Ali DM i sur. Microbial boundaries in peri-implantitis: a review of pathogen-related advances. *Folia Med. (Plovdiv)* 2024;66:763–9.
145. Cheng X, Zhou X, Liu C, Xu X. Oral Osteomicrobiology: The Role of Oral Microbiota in Alveolar Bone Homeostasis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021;11:751503.
146. Kadirvelu L, Sivaramalingam SS, Jothivel D i sur. A review on antimicrobial strategies in mitigating biofilm-associated infections on medical implants. *Curr. Res. Microb. Sci.* 2024;6:100231.
147. Hu W, Chen S, Zou X i sur. Oral microbiome, periodontal disease and systemic bone-related diseases in the era of homeostatic medicine. *J. Adv. Res.* 2025;73:443–58.
148. Altiparmak N, Akdeniz SS, Akcay YE, Bayram B, Araz K. Experimental assessment of histological and biological properties of the induced membrane and the membrane formed

- around the d-PTFE membrane: A pilot study. *J. Stomatol. Oral Maxillofac. Surg.* 2020;121:140–5.
149. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* 1998;25:134–44.
 150. Gambin DJ, Vitali FC, De Carli JP i sur. Prevalence of red and orange microbial complexes in endodontic-periodontal lesions: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Oral Investig.* 2021;25:6533–46.
 151. Čandrlić M, Tomas M, Karl M i sur. Comparison of Injectable Biphasic Calcium Phosphate and a Bovine Xenograft in Socket Preservation: Qualitative and Quantitative Histologic Study in Humans. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23:2539.
 152. Tomas M, Karl M, Čandrlić M i sur. A Histologic, Histomorphometric, and Immunohistochemical Evaluation of Anorganic Bovine Bone and Injectable Biphasic Calcium Phosphate in Humans: A Randomized Clinical Trial. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24:5539.
 153. Iorio-Siciliano V, Ramaglia L, Blasi A i sur. Dimensional changes following alveolar ridge preservation in the posterior area using bovine-derived xenografts and collagen membrane compared to spontaneous healing: a 6-month randomized controlled clinical trial. *Clin. Oral Investig.* 2020;24:1013–23.
 154. Schmitt CM, Doering H, Schmidt T i sur. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann® BoneCeramic, Bio-Oss®, Puros®, and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. *Clin. Oral Implants Res.* 2013;24:576–85.
 155. Kers JG, Saccenti E. The Power of Microbiome Studies: Some Considerations on Which Alpha and Beta Metrics to Use and How to Report Results. *Front. Microbiol.* 2022;12:796025.
 156. Lu Y, Zhou G, Ewald J i sur. MicrobiomeAnalyst 2.0: comprehensive statistical, functional and integrative analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res.* 2023;51:W310–8.

157. Chong J, Liu P, Zhou G, Xia J. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nat. Protoc.* 2020;15:799–821.
158. Ionescu A, Dodi A, Petcu LC, Nicolescu MI. Open Healing: A Minimally Invasive Protocol with Flapless Ridge Preservation in Implant Patients. *Biology* 2022;11:142.
159. Zafiropoulos GG, Kačarević Z, Qasim S, Trajkovski B. Open-Healing Socket Preservation with a Novel Dense Polytetrafluoroethylene (dPTFE) Membrane: A Retrospective Clinical Study. *Medicina (Mex.)* 2020;56:216.
160. Yang Z, Wu C, Shi H i sur. Advances in Barrier Membranes for Guided Bone Regeneration Techniques. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022;10:921576.
161. Udeabor SE, Heselich A, Al-Maawi S i sur. Current Knowledge on the Healing of the Extraction Socket: A Narrative Review. *Bioengineering* 2023;10:1145.
162. Ling L, Hung S, Lee C, Chen Y, Wu K. The influence of membrane exposure on the outcomes of guided tissue regeneration: clinical and microbiological aspects. *J. Periodontal Res.* 2003;38:57–63.
163. De Sanctis M, Zucchelli G, Clauser C. Bacterial colonization of barrier material and periodontal regeneration. *J. Clin. Periodontol.* 1996;23:1039–46.
164. Gil ACK, Merino EAD, Costa DP i sur. A Novel Device for the Evaluation of In Vitro Bacterial Colonization in Membranes for Guided Tissue and Bone Regeneration. *Dent. J.* 2024;12:202.
165. Gupta P, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Arch. Microbiol.* 2016;198:1–15.
166. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S i sur. Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. Med. Assoc.* 2018;81:7–11.
167. Muhammad MH, Idris AL, Fan X i sur. Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. *Front. Microbiol.* 2020;11:928.
168. Donlan RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 2002;8:881–90.

169. Yang L, Liu Y, Wu H i sur. Current understanding of multi-species biofilms. *Int. J. Oral Sci.* 2011;3:74–81.
170. Agarwal S, Curtin J, Duffy B, Jaiswal S. Biodegradable magnesium alloys for orthopaedic applications: A review on corrosion, biocompatibility and surface modifications. *Mater. Sci. Eng. C* 2016;68:948–63.
171. Khatoon Z, McTiernan CD, Suuronen EJ, Mah TF, Alarcon EI. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon* 2018;4:e01067.
172. Fleming D, Rumbaugh K. The Consequences of Biofilm Dispersal on the Host. *Sci. Rep.* 2018;8:10738.
173. Zhang Y, Wang X, Li H i sur. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed. Pharmacother.* 2018;99:883–93.
174. Mosaddad SA, Tahmasebi E, Yazdanian A i sur. Oral microbial biofilms: an update. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2019;38:2005–19.
175. Begić G, Petković Didović M, Lučić Blagojević S i sur. Adhesion of Oral Bacteria to Commercial d-PTFE Membranes: Polymer Microstructure Makes a Difference. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23:2983.
176. Simões M, Pereira MO, Vieira MJ. Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. *Water Res.* 2005;39:5142–52.
177. Mah TFC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001;9:34–9.
178. Parsek MR, Singh PK. Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 2003;57:677–701.
179. Zhou P, Manoil D, Belibasakis GN, Kotsakis GA. *Veillonellae*: Beyond Bridging Species in Oral Biofilm Ecology. *Front. Oral Health* 2021;2:774115.

180. Luo A, Wang F, Sun D, Liu X, Xin B. Formation, Development, and Cross-Species Interactions in Biofilms. *Front. Microbiol.* 2022;12:757327.
181. Henderson B, Ward JM, Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A* periodontopathogen?: *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Periodontol.* 2000 2010;54:78–105.
182. Forssten SD, Björklund M, Ouwehand AC. *Streptococcus mutans*, Caries and Simulation Models. *Nutrients* 2010;2:290–8.
183. Kaci G, Goudercourt D, Dennin V i sur. Anti-Inflammatory Properties of *Streptococcus salivarius*, a Commensal Bacterium of the Oral Cavity and Digestive Tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014;80:928–34.
184. Van Houte J, Green DB. Relationship Between the Concentration of Bacteria in Saliva and the Colonization of Teeth in Humans. *Infect. Immun.* 1974;9:624–30.
185. Zymovets V, Rakhimova O, Schmidt A i sur. Inhibition of infection-associated oral bacteria adhesion by probiotics: In vitro and in vivo models. *iScience* 2025;28:112412.
186. Krishnan K, Chen T, Paster B. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Dis.* 2017;23:276–86.
187. Aruni AW, Mishra A, Dou Y i sur. *Filifactor alocis* – a new emerging periodontal pathogen. *Microbes Infect.* 2015;17:517–30.
188. Rams TE, Feik D, Listgarten MA, Slots J. *Peptostreptococcus micros* in human periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* 1992;7:1–6.
189. Colombo APV, Boches SK, Cotton SL i sur. Comparisons of Subgingival Microbial Profiles of Refractory Periodontitis, Severe Periodontitis, and Periodontal Health Using the Human Oral Microbe Identification Microarray. *J. Periodontol.* 2009;80:1421–32.
190. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA i sur. New Bacterial Species Associated with Chronic Periodontitis. *J. Dent. Res.* 2003;82:338–44.

191. Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH i sur. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J.* 2012;6:1176–85.
192. Tadjoedin FM, Masulili SLC, Rizal MI i sur. The Red and Orange Complex Subgingival Microbiome of Cognitive Impairment and Cognitively Normal Elderly with Periodontitis. *Geriatrics* 2022;7:12.
193. Chen Y, Huang Z, Tang Z i sur. More Than Just a Periodontal Pathogen –the Research Progress on *Fusobacterium nucleatum*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022;12:815318.
194. Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996;9:55–71.
195. Ferdous T, Jiang L, Dinu I i sur. The rise to power of the microbiome: power and sample size calculation for microbiome studies. *Mucosal Immunol.* 2022;15:1060–70.
196. Settem RP, El-Hassan AT, Honma K, Stafford GP, Sharma A. *Fusobacterium nucleatum* and *Tannerella forsythia* Induce Synergistic Alveolar Bone Loss in a Mouse Periodontitis Model. *Infect. Immun.* 2012;80:2436–43.
197. Boutaga K, Van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J. Clin. Periodontol.* 2006;33:427–33.
198. Maljkovic Berry I, Melendrez MC, Bishop-Lilly KA i sur. Next Generation Sequencing and Bioinformatics Methodologies for Infectious Disease Research and Public Health: Approaches, Applications, and Considerations for Development of Laboratory Capacity. *J. Infect. Dis.* 2019; 286:S292–S307.
199. Van Dijk LR, Walker BJ, Straub TJ i sur. StrainGE: a toolkit to track and characterize low-abundance strains in complex microbial communities. *Genome Biol.* 2022;23:74.
200. Fiévet A, Bernard V, Tenreiro H i sur. ART-DeCo: easy tool for detection and characterization of cross-contamination of DNA samples in diagnostic next-generation sequencing analysis. *Eur. J. Hum. Genet.* 2019;27:792–800.

201. Rosenbaum J, Usyk M, Chen Z i sur. Evaluation of Oral Cavity DNA Extraction Methods on Bacterial and Fungal Microbiota. *Sci. Rep.* 2019;9:1531.
202. Francis-West P, Ladher R, Barlow A, Graveson A. Signalling interactions during facial development. *Mech. Dev.* 1998;75:3–28.
203. Kamioka H, Sugawara Y, Honjo T, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T. Terminal Differentiation of Osteoblasts to Osteocytes Is Accompanied by Dramatic Changes in the Distribution of Actin-Binding Proteins. *J. Bone Miner. Res.* 2004;19:471–8.
204. Jambhekar S, Kernen F, Bidra AS. Clinical and histologic outcomes of socket grafting after flapless tooth extraction: A systematic review of randomized controlled clinical trials. *J. Prosthet. Dent.* 2015;113:371–82.

ILUSTRACIJE

Popis slika

Slika 1. Shematski presjek kroz Haversov osteon građen od 5 koštanih lamela	4
Slika 2. Međusobna povezanost stanica u koštanom tkivu citoplazmatskim izdancima	5
Slika 3. Shematski prikaz osteoklasta u Howshipovoj lakuni	7
Slika 4. Shematski prikaz molekule kolagena tipa I i kristala hidroksiapatita	10
Slika 5. Prikaz stvaranja biofilma u usnoj šupljini	29
Slika 6. Prikaz mikrobijalnih kompleksa prema Sigmundu Socranskyju	34
Slika 7. Kliničke faze kirurškog postupka	40
Slika 8. Protokol izolacije bakterijskog DNK iz membrana s pomoću NucleoSpin Tissue	43
Slika 9. Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova koštanih uzoraka dobivenih iz grebena alveolarne kosti primjenom membrane Cytoplast™ nakon augmentacije s BX+AB (A) te primjenom membrane Permamem® nakon augmentacije s BX+AB (B). (Biomaterijal (BM); novostvorena kost (NK). Hematoxylin-eosin, povećanje 100X.)	53
Slika 10. Rezultati RT-qPCR-a	54
Slika 11. Grafički prikaz rezultata broja bakterija (CFU/ml)	56
Slika 12. Reprezentativni prikaz porasta streptokoka CFU/ml na hranjivoj podlozi (autorski rad)	58
Slika 13. Reprezentativni prikaz porasta obveznih anaeroba CFU/ml na hranjivoj podlozi (autorski rad)	59
Slika 14. Reprezentativni prikaz porasta aeroba CFU/ml na hranjivoj podlozi (autorski rad)	60
Slika 15. Sastav mikrobioma na razini koljena (phylum)	62
Slika 16. Heat tree analiza, a) $p < 0,05$ b) $p < 0,01$ c) $p < 0,001$	64
Slika 17. Grafički prikaz beta-raznolikosti	69
Slika 18. Grafički prikaz rezultata alfa-raznolikosti	70
Slika 19. Najzastupljenije bakterije na razinama: a) rod, b) vrsta	73
Slika 20. Rijetko zastupljene bakterije na razinama: a) rod, b) vrsta	75
Slika 21. Bakterije zapažene samo u pojedinoj grupi na razini roda	77
Slika 22. Odabrane bakterije povezane s oralnim zdravljem	78
Slika 23. Vrste narančastog i crvenog kompleksa	80

Slika 24. Reprezentativne slike pretražne elektronske mikroskopije biofilma formiranog na membranama iz grupe (Cytoplast™; C) (A–C) i (Permamem®; P) (D–F) pri različitim uvećanjima: 800× (A, D), 2000× (B, E) i 5000× (C, F)

82

Popis tablica

Tablica 1. Prikaz zdravog oralnog mikroba	27
Tablica 2. Sekvence početnice i probe	45
Tablica 3. Prikaz rezultata koštane histomorfometrije	51
Tablica 4. Prikaza rezultata CBCT mjerenja dimenzija alveolarnog grebena	52
Tablica 5. Rezultati PCR-a	55
Tablica 6. Rezultati broja bakterija (CFU/ml)	57
Tablica 7. Brojčane vrijenosti <i>heat tree</i> analize	67
Tablica 8. Rezultati analize ALDEx2 (analiza diferencijalne abundancije uzimajući u obzir varijaciju uzorkovanja): a) na razini roda, b) na razini vrste	71

Popis pokrata

PTH – paratireoidni hormon, parathormon (engl. *parathyroid hormone*)

BMU – osnovna morfološka i funkcionalna jedinica kosti (engl. *basic multicellular unit*)

OPG – osteoprotegrin (engl. *osteoprotegerin*)

RANKL – aktivator receptora nuklearnog činitelja κ B ligand (engl. *receptor activator of nuclear factor RANKL - κ B ligand*)

TGF- β – transformirajući činitelj rasta tip β (engl. *transforming growth factor β*)

HAP/HA – hidroksiapatit (engl. *hydroxyapatite*)

MSC – mezenhimalne stanice (engl. *mesenchymal stem cells*)

BMP – koštani morfogenetski protein (engl. *bone morphogenetic protein*)

TNF- α - faktor tumorske nekroze α (engl. *tumor necrosis factor α*)

VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)

IL-17 – interleukin 17 (engl. *interleukin 17*)

GBR – vođena regeneracija kosti (engl. *guided bone regeneration*)

GTR – vođena regeneracija tkiva (engl. *guided tissue regeneration*)

IL-1 – interleukin 1 (engl. *interleukin 1*)

IL-6 – interleukin 6 (engl. *interleukin 6*)

IL-11 – interleukin 11 (engl. *interleukin 11*)

IL-18 – interleukin 18 (engl. *interleukin 18*)

TGF- β 1 – transformirajući faktor rasta β 1 (engl. *transforming growth factor- β 1*)

PDGF – faktor rasta podrijetlom od trombocita (engl. *platelet-derived growth factor*)

BMP-2 – koštani morfogenetski protein 2 (engl. *bone morphogenetic protein*)

PLA - poli-2-hidroksipropanska kiselina (engl. *polyglycolic acid*)

PGA – poliglikolna kiselina (engl. *polyglycolic acid*)

PCL – polikaprolakton (engl. *polycaprolactone*)

PTFE – politetrafluoretilen (engl. *polytetrafluorethylene*)

e-PTFE – ekspandirana politetrafluoretilenske membrane (engl. *expanded polytetrafluorethylene membrane*)

d-PTFE – gusta politetrafluoretilenska membrana (engl. *dense polytetrafluoroethylene membrane*)

SFE – slobodna energija površine (engl. *surface free energy*)

RT-qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *real-time quantitative*)

QS – detekcija kvoruma (engl. *quorum sensing*)

EPS – izvanstanični polimerni matriks (engl. *extracellular matrix*)

CBCT – kompjuterizirana tomografija s konusnim snopom (engl. *cone beam computed tomography*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

SEM – skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. *scanning electron microscopy*)

NGS – sekvencioniranje nove generacije (engl. *next-generation sequencing technology*)

OTU – operativne taksonomske jedinice (engl. *Operational Taxonomic Units*)

ASV – varijanta amplikona sekvence (engl. *amplicon sequence variant*)

ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Barbara Franović

Datum i mjesto rođenja: 12. listopada 1995. u Rijeci

Adresa: Ferenci 11b, Viškovo 51216, Hrvatska

Mail adresa: barbara.franovic@uniri.hr

Obrazovanje:

- Osnovna škola Čavle (10. 9. 2001. – 18. 6. 2010.)
- Osnovna glazbena škola „Ivan Matetić Ronjgov“, Rijeka (1. 9. 2004. – 3. 7. 2008.)
- SSS – Prva sušačka hrvatska gimnazija u Rijeci (6. 9. 2010. – 16. 5. 2014.)
- Preddiplomski sveučilišni studij Sanitarno inženjerstvo, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci (6. 10. 2014. – 17. 7. 2018.)

Tema završnog rada: Utjecaj klorogenične kiseline na izražaj NF-K β u akutnom kolitisu

- Diplomski studij Sanitarno inženjerstvo (1.10. 2018. – 16.07. 2020.)

Tema diplomskog rada: Promjene izražaja dipeptidil-peptidaze 8 i 9 u kolitisu

- Dante – škola stranih jezika, Rijeka (5. 10. 2020. – trenutačno)
- Doktorska škola – Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci (područje biomedicine)

Radno iskustvo

- **Volontiranje (COVID-19 CALL CENTAR) (12. 11. 2020. – 23. 5. 2021.)**
Nastavni Zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije i Sveučilište u Rijeci
Odgovaranje na upit građana vezanih uz COVID-19, javljanje na telefon te pružanje općih informacija te upućivanje na adekvatne službe unutar zdravstvenog sustava.
- **Pripravnički staž (24. 5. 2021. – 23. 5. 2022.)**
Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije

Pripravnički staž odradila sam na Epidemiološkom odjelu.

(Odsjek za hig. epidemiološki nadzor i uzorkovanje – OHENU)

Sudjelovala sam u:

- ispitivanju higijenskih uvjeta u objektima koji posluju s hranom i objektima pod sanitarnim nadzorom na zahtjev stranke ili nadležne inspekcije
- uzorkovanju briseva/otisaka opreme, pribora, radnih površina i ruku zaposlenika na mikrobiološku ispravnost
- uzorkovanju uzoraka hrane na zdravstvenu ispravnost sukladno HACCP planovima objekata
- uzorkovanju uzoraka vode za ljudsku potrošnju u objektima u poslovanju s hranom sukladno HACCP planovima objekata
- higijensko-epidemiološkom izvidu objekta te pisanju izvješća o obavljenom higijensko-epidemiološkom izvidu u objektu sa stručnim savjetima o zdravstvenoj ispravnosti hrane, predmeta opće uporabe i higijenskim uvjetima u objektu
- edukaciji – osposobljavanja za rad po načelima HACCP-a zaposlenika koji rade s bezglutenskom hranu i u njezinoj proizvodnji.
- kontroli trajne primjene načela HACCP-a, dobre higijenske prakse (DHP) i dobre proizvođačke prakse (DPP) – audit
- sudjelovala sam u organizacijskom, koordinacijskom timu za cijepljenje protiv COVID-19 što uključuje pripremu, razređenje te čuvanje cjepiva.

● **Asistentica na Zavodu za anatomiju, Medicinski fakultet u Rijeci (10. 10. 2022. – trenutačno)**

Suradnica u suradničkom zvanju te asistentica na projektu HRZZ "Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti" na Zavodu za anatomiju Medicinskog fakulteta u Rijeci, radi istraživanja na projektu "Usporedba dentina, ksenogenog biomaterijala i autologne kosti".

Nagrade i diplome:

- 1. Dječiji festival "Volim glasovir" – 2. 3. 2005. – osvojena I. nagrada A kategorije
- 5. Školsko natjecanje "Volim glasovir" – 8. 10. 2006. – osvojena II. nagrada A kategorija
- 6. Školsko natjecanje "Volim glasovir" – 27. 2. 2008. - osvojena II. nagrada C kategorije
- Priznanje o usvojenom znanju iz engleskog jezika u govoru, čitanju, slušanju i pisanju na razini B1-1
- Položen stručni ispit – odobrenje za samostalni rad
Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske (7. 6. 2025.)

Sudjelovanje na kongresima:

- Projekt „Čiste ručice“ (2018. – 2019.); Medicinski fakultet u Rijeci
Sudjelovanje u radionici koja se bavi edukacijom djece predškolske i školske dobi o mikroorganizmima, pravilnoj higijeni ruku te o načinu pranja
- 2. Studentski kongres zaštite zdravlja – Sanitas (2019.); Medicinski fakultet u Rijeci
- 2nd Biomedicine and Health PhD Students Congress (16. 5. 2024. – 18. 5. 2024.);
Medicinski fakultet u Rijeci
Aktivno izlaganje poster-prezentacije pod naslovom:
"Identification of different bacterial species from the dental biofilm on high-density polytetrafluoroethylene membranes"
- 15th International Symposium of Clinical and Applied Anatomy; ISCAA 2024 (27. 6. 2024. – 30. 6. 2024.); Swansea, Wales

Aktivno sudjelovanje u izlaganju poster-prezentacija pod naslovima:

1. "Osteogenic and inflammatory response of the alveolar bone during alveolar socket preservation using a high- density polytetrafluorethylene membrane (d-PTFE)"
2. "How does hyperbaric oxygen treatment affect in regenerating m. Masseter of rat?"

- EuroPerio11 (14. 5. 2025. – 17. 5. 2025.); Vienna, Austria
Aktivno izlaganje poster-prezentacije pod naslovom
„PCR Analysis of Dental Biofilm Bacterial Species on High-Density
Polytetrafluoroethylene (d-PTFE) Membranes“
- Hrvatski parodontološki dani (25. 9. 2025. – 27. 9. 2025.)
Aktivno izlaganje poster-prezentacije pod naslovom:
„Biofilm diversity and bone healing with d-PTFE membranes in socket preservation“

Sudjelovanje na projektima i stručnom usavršavanju:

- Znanstveno usavršavanje u Centru za crijevni mikrobiom u Zagrebu
Uspješno sam završila trojmjesečnu hibridnu praksu u Centru za crijevni mikrobiom, Zagreb. Tijekom tog perioda sudjelovala sam u važnim aspektima istraživačkog projekta “Glikom i mikrobiom kao biljezi utjecaja prehrane na zdravlje žena reproduktivne dobi“.
- Suradnik na projektu (2023. – 2025.); Medicinski fakultet u Rijeci
Analiza bakterijskih vrsta iz dentalnog biofilma politetrafluoretilenskih membrana velike gustoće

Članstva u strukovnim udruženjima:

- Hrvatska komora zdravstvenih radnika (2025. – trenutačno)

Objavljeni znanstveni radovi:

- Čandrlić M, Jerbić Radetić AT, Omrčen H, Franović B, Batičić L, Gulić T, et al.
Regeneration of Critical Calvarial Bone Defects Using Bovine Xenograft,
Magnesium-Enriched Bovine Xenograft and Autologous Dentin in Rats: Micro-CT,
Gene Expression and Immunohistochemical Analysis. JFB 2024;15:270.
- Franović B, Čandrlić M, Blašković M, Renko I, Komar Milas K, Markova-Car EP, et al.
The Microbial Diversity and Biofilm Characteristics of d-PTFE Membranes Used
for Socket Preservation: A Randomized Controlled Clinical Trial. JFB 2025;16:40.

- Vukelic I, Buljevic S, Baticic L, Barisic K, Franovic B, Detel D. CD26 Deficiency Controls Macrophage Polarization Markers and Signal Transducers during Colitis Development and Resolution. *IJMS* 2022;23:5506.
- Čandrlić, Marija; Franović, Barbara; Blašković, Marko; Perić Kačarević, Željka; Cvijanović Pelozo, Olga Impact of dental biofilm on bone healing after socket preservation using two non-resorbable membranes: study design and preliminary findings // *Acta stomatologica Croatica*, 59, 1, 2025. str. 103-103
- Buljević, Sunčica ; Vukelić, Iva ; Batičić, Lara ; Barišić, Karmela ; Franović, Barbara ; Detel, Dijana CD26 deficiency modulates macrophage polarization via targeting of STAT proteins in a mouse model of ulcerative colitis // *From science to knowledge*. 2022. str. 71-71
- Vitezić, B.M.; Franović, B.; Renko, I.; Kuiš, D.; Begić, G.; Blašković, M.; Gabrić, D.; Nikolić, M.; Vranić, T.Š.; Veljanovska, D.; et al. Microbiome Profiling of Biofilms Formed on d-PTFE Membranes Used in Guided Bone Regeneration. *Microorganisms* **2025**, *13*, 2478.

Jezične vještine:

Materinski jezik: hrvatski jezik

Engleski jezik (slušanje: B1, čitanje: B1, pisanje: B1)

Njemački jezik (slušanje: B1, čitanje: B1, pisanje: B1)