

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Matko Oguić

USPOREDBA REPARACIJSKOG ODGOVORA KOŠTANOG TKIVA
PRI UPOTREBI DENTINA, KSENOGENOG BIOMATERIJALA I
AUTOLOGNE KOSTI

Doktorski rad

Rijeka, 2026.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Matko Oguić

USPOREDBA REPARACIJSKOG ODGOVORA KOŠTANOG TKIVA PRI UPOTREBI
DENTINA, KSENOGENOG BIOMATERIJALA I AUTOLOGNE KOSTI

Doktorski rad

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

Komentor: Prof.dr.sc. Davor Kuiš, dr.med.dent

Rijeka, 2026.

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF MEDICINE

Matko Oguić

COMPARISON OF BONE TISSUE REPAIR RESPONSE USING DENTIN, XENOGENIC
BIOMATERIAL, AND AUTOLOGOUS BONE

Doctoral thesis

Mentor: Olga Cvijanović Pelozo, Full professor, PhD

Co-mentor: Davor Kuiš, Full professor, PhD

Rijeka, 2026.

III

Mentor: Prof. dr. sc. Olga Cvijanović Pelosa, dr.med

Komentor: Prof.dr.sc. Davor Kuiš, dr.med.dent

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

prof. dr. sc. _____

prof. dr. sc. _____

prof. dr. sc. _____

Rad ima 114 listova, 32 slike, 7 tablica i 219 literaturnih navoda.

UDK: _____

PREDGOVOR

Ova doktorska disertacija najvećim je dijelom izrađena na Zavodu za anatomiju u suradnji sa Zavodom za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, kao i u Laboratoriju za mineralizirana tkiva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Dio istraživanja proveden je u Poliklinici Rident, a preostali dio u sklopu znanstveno - istraživačkih aktivnosti na Medicinskom fakultetu u Rijeci.

Istraživanje je provedeno u okviru znanstveno - istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost (IP-2020-02-7875), pod nazivom „Usporedba reparacijskog odgovora koštanog tkiva upotrebom dentina, ksenogenog biomaterijala i autologne kosti“, čiji je glavni istraživač prof. dr. sc. Olga Cvijanović Pelosa, dr. med.

ZAHVALA

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svojim roditeljima čija su ljubav, razumijevanje i neprestana potpora bili temelj svakog mog uspjeha.

SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Glavni cilj bio je analizirati razlike u upalnom, osteoinduktivnom i protektivnom odgovoru koštanog tkiva nakon primjene autolognog dentina (AD), goveđeg ksenogenog biomaterijala Cerabone® (GK) i njegove mješavine s autolognom kosti (GK+AK) u postupku očuvanja alveole.

Materijali i metode: U istraživanje su uključeni pacijenti podvrgnuti vađenju zuba i očuvanju alveole s jednim od triju navedenih biomaterijala. Dimenzije alveolarnog grebena mjerene su kompjuteriziranom tomografijom konusnim snopom (CBCT) prije vađenja zuba i nakon šest mjeseci cijeljenja. Uzorci koštanog tkiva uzeti su trepan svrdlom u toku preparacije ležišta za implantat. Dobiveni uzorci analizirani su mikro-CT-om, histomorfometrijom, kvalitativnom histologijom, imunohistokemijom (TNF- α , COX-2, VEGF, HO-1, TGF β -1, BMP-4, BMP-7, SMAD-1/5/8, SMAD-2/3) te imunofluorescencijom (M1 i M2 makrofagi i MNGC). Rezultati su analizirani prikladnim statističkim testovima, pri čemu je $P < 0,05$ smatrano statistički značajnim.

Rezultati: CBCT analiza pokazala je očuvanje volumena alveolarnog grebena u svim skupinama bez statistički značajnih razlika. Mikro-CT i histomorfometrija potvrdili su stvaranje nove kosti u sve tri skupine, s najvećim udjelom u skupini AD ($20,15 \pm 5,1$ %), dok su skupine GK i GK+AK pokazale slične, ali nešto niže vrijednosti. Imunohistokemijska analiza otkrila je značajno višu ekspresiju TNF- α i BMP-4 u skupinama GK i GK+AK u usporedbi s AD, što ukazuje na jači upalni i osteoinduktivni odgovor izazvan ksenogenim materijalom. S druge strane, ekspresija TGF β -1 i HO-1 bila je viša u skupini AD, što sugerira protektivni i regenerativni učinak dentina. Imunofluorescentna analiza pokazala je da je u skupini GK zabilježen najveći postotak M1/M1MNGC fenotipa, dok je u skupini AD prevladavao M2/M2MNGC fenotip, što odražava povoljniji imunomodulatorni profil dentina.

Zaključci: Autologni dentin pokazao je usporediva osteokonduktivna i osteoinduktivna svojstva u odnosu na GK i GK+AK, uz dodatnu prednost protektivnog i imunomodulatornog djelovanja. Dobiveni rezultati potvrđuju dentin kao vrijedan, biološki kompatibilan i klinički praktičan biomaterijal u postupcima očuvanja alveole.

Ključne riječi: autologni dentin; ksenogeni biomaterijal; imunohistokemija; imunofluorescencija; mikro-CT; očuvanje alveole; regeneracija kosti

SUMMARY

Objectives: The primary aim was to analyze differences in the inflammatory, osteoinductive, and protective responses of bone tissue following the application of autologous dentin (AD), the bovine xenogeneic biomaterial Cerabone[®] (GK), and its mixture with autologous bone (GK+AK) in alveolar ridge preservation.

Materials and Methods: Patients undergoing tooth extraction and alveolar ridge preservation with one of the three biomaterials were included. Alveolar ridge dimensions were measured using cone-beam computed tomography (CBCT) before extraction and after six months of healing. Bone tissue samples were harvested using a trephine bur during implant site preparation. The specimens were analyzed by micro-CT, histomorphometry, qualitative histology, immunohistochemistry (TNF- α , COX-2, VEGF, HO-1, TGF β -1, BMP-4, BMP-7, SMAD-1/5/8, SMAD-2/3), and immunofluorescence (M1 and M2 macrophages and MNGCs). Data were analyzed using appropriate statistical tests, with $P < 0.05$ considered statistically significant.

Results: CBCT analysis showed preservation of alveolar ridge volume in all groups without statistically significant differences. Micro-CT and histomorphometry confirmed new bone formation in all three groups, with the highest proportion in the AD group ($20.15 \pm 5.1\%$), while GK and GK+AK groups showed comparable but slightly lower values. Immunohistochemical analysis revealed significantly higher expression of TNF- α and BMP-4 in GK and GK+AK compared to AD, indicating a stronger inflammatory and osteoinductive response triggered by the xenogeneic material. Conversely, TGF β -1 and HO-1 expression was higher in the AD group, suggesting a protective and regenerative effect of dentin. Immunofluorescence analysis showed the highest percentage of the M1/M1MNGC phenotype in the GK group, whereas the AD group exhibited a predominance of the M2/M2MNGC phenotype, reflecting a more favorable immunomodulatory profile of dentin.

Conclusions: Autologous dentin demonstrated osteoconductive and osteoinductive properties comparable to GK and GK+AK, with the additional advantage of protective and immunomodulatory effects. These findings confirm dentin as a valuable, biologically compatible, and clinically practical biomaterial for alveolar ridge preservation.

Keywords: alveolar ridge preservation; autologous dentin; bone regeneration; immunohistochemistry; immunofluorescence; micro-CT; xenogeneic biomaterial

SADRŽAJ

SADRŽAJ	VIII
1 UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1 Koštano tkivo	1
1.2 Stanice koštanog sustava	1
1.2.1 Osteociti	1
1.2.2 Osteoklasti.....	3
1.2.3 Osteoblasti.....	5
1.3 Međustanična tvar koštanog tkiva	6
1.3.1 Anorganski (mineralni) sadržaj koštanog matriksa.....	6
1.3.2 Organski sadržaj koštanog matriksa.....	6
1.4 Rast i razvoj kosti	9
1.5 Kraniofacijalni kostur	10
1.5.1 Alveolarna kost i zubni organ	10
1.6 Mehanizmi atrofije i gubitka volumena kosti alveolarnog grebena	11
1.6.1 Cijeljenje alveole nakon ekstrakcije zuba	11
1.7 Uloga pojedinih čimbenika u kaskadi transkripcijskih faktora	14
1.7.1 Uloga VEGF	14
1.7.2 Uloga hemoksigenaze 1	15
1.7.3 Uloga TNF – α	16
1.7.4 Uloga ciklooksigenaze – 2 (COX-2).....	16
1.7.5 Uloga Osterix-a i Runx2	17
1.7.6 Uloga Koštanih morfogogenetskih proteina i SMAD signalnog puta	18
1.8 Od molekularnih mehanizama do kliničke primjene	19
1.9 Vođena regeneracija kosti (engl. Guided Bone regeneration; GBR).	20
1.9.1 Membrane u vođenoj regeneraciji kosti	21

1.9.2	Koštani nadomjesni biomaterijali.....	23
2	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	30
3	MATERIJALI I METODE RADA.....	31
3.1	Protokol istraživanja.....	34
3.2	Metode istraživanja.....	38
3.2.1	Kompjuterizirana tomografija s konusnim snopom (engl. <i>Cone beam computed tomography, CBCT</i>)	38
3.2.2	Mikro-kompjuterizirana tomografija (mikro-CT).....	39
3.2.3	Histološka bojenja	39
3.2.4	Koštana histomorfometrija	40
3.2.5	Imunohistokemijska metoda	41
3.2.6	Metoda dvostruke imunofluorescencije	42
3.3	Statistička obrada.....	43
4	REZULTATI.....	44
4.1	Rezultati kompjuterizirane tomografije s konusnim snopom (engl. <i>Cone beam computed tomography, CBCT</i>)	44
4.2	Rezultati koštane histomorfometrije	44
4.3	Rezultati Mikro-kompjuterizirane tomografije (mikro-CT).....	48
4.4	Rezultati imunohistokemijske analize.....	51
4.4.1	Imunohistokemijska analiza izražaja BMP-7.....	51
4.4.2	Imunohistokemijska analiza izražaja BMP -4.....	52
4.4.3	Imunohistokemijska analiza izražaja SMAD -1/5/8	53
4.4.4	Imunohistokemijska analiza izražaja TNF- α	54
4.4.5	Imunohistokemijska analiza izražaja VEGF	55
4.4.6	Imunohistokemijska analiza izražaja HO - 1	56
4.4.7	Imunohistokemijska analiza izražaja TGF β -1.....	57
4.4.8	Imunohistokemijska analiza izražaja SMAD-2/3	58
4.4.9	Imunohistokemijska analiza izražaja COX-2.....	59
4.5	Intenzitet imunohistokemijske ekspresije.....	60

4.6	Rezultati imunofluorescentnog obilježavanja	63
4.6.1	Rezultati imunofluorescentog obilježavanja za M1 makrofage i M1 MNGC stanice	63
4.6.2	Rezultati imunofluorescentog obilježavanja za M2 makrofage i M2 MNGC stanice	67
5	RASPRAVA	71
6	ZAKLJUČCI.....	82
7	LITERATURA.....	83
7.1	Popis slika.....	100
7.2	Popis tablica	103
7.3	Popis grafova	104
7.4	Popis pokrata	105
7.5	Životopis.....	107

1 UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1 Koštano tkivo

Koštano tkivo mineralizirano je potporno tkivo koje osigurava strukturnu podršku, održava metaboličku homeostazu minerala i faktora rasta, te je mjesto hematopoeze [1].

Ono se sastoji od stanica i međustanične tvari koja čini čak 90% njegova ukupnog volumena. Tijekom života, koštano se tkivo kontinuirano remodelira koncentriranom aktivnošću koštanih stanica, a pod kontrolom brojnih lokalnih i sistemskih faktora koji doprinose koštanoj homeostazi [2].

1.2 Stanice koštanog sustava

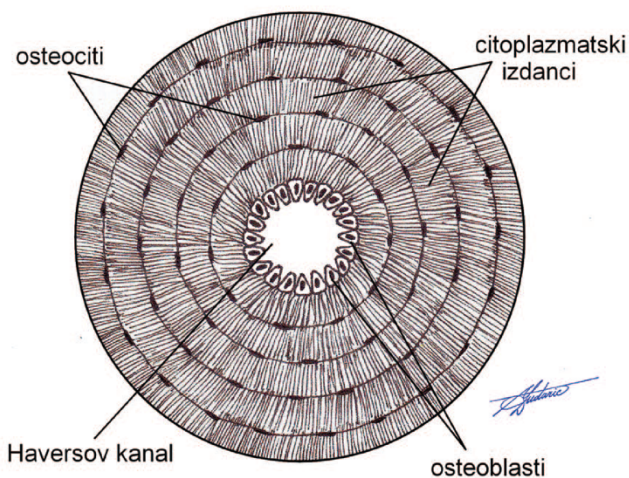
Koštano tkivo čine četiri tipa stanica koje čine oko 10% ukupnog volumena kosti: osteociti, osteoblasti i pokrovne „lining“ stanice koje su mezenhimalnog podrijetla te osteoklasti koji su hematopoetskog podrijetla monocitno – makrofagne stanične linije [3].

1.2.1 Osteociti

Najbrojnije stanice koštanog sustava - osteociti terminalno su diferencirane stanice koje nastaju ukopavanjem osteoblasta u koštani matriks koji su potonji odložili u međustaničnu tvar [4].

Citoplazma osteocita boji se slabo bazofilno, a jezgra se teško uočava kod odraslih mehanizama. Mitotička aktivnost se rijetko detektira.[5,6].

Trup osteocita nalazi se u koštanoj šupljini međustanične tvari, a pedesetak izdanaka citoplazme pojedinog osteocita nastavlja se radijalno u različitim pravcima, od čega neki izdanci kroz koštane kanaliće dopiru i do površine kosti. (Slika 1).



Slika 1: Prikazan je shematski presjek Haversova osteona koji se sastoji od pet koštanih lamela, znatno uvećano. Osteociti su međusobno umreženi brojnim citoplazmatskim izdancima. Preuzeto iz Đudarić i sur. [4]

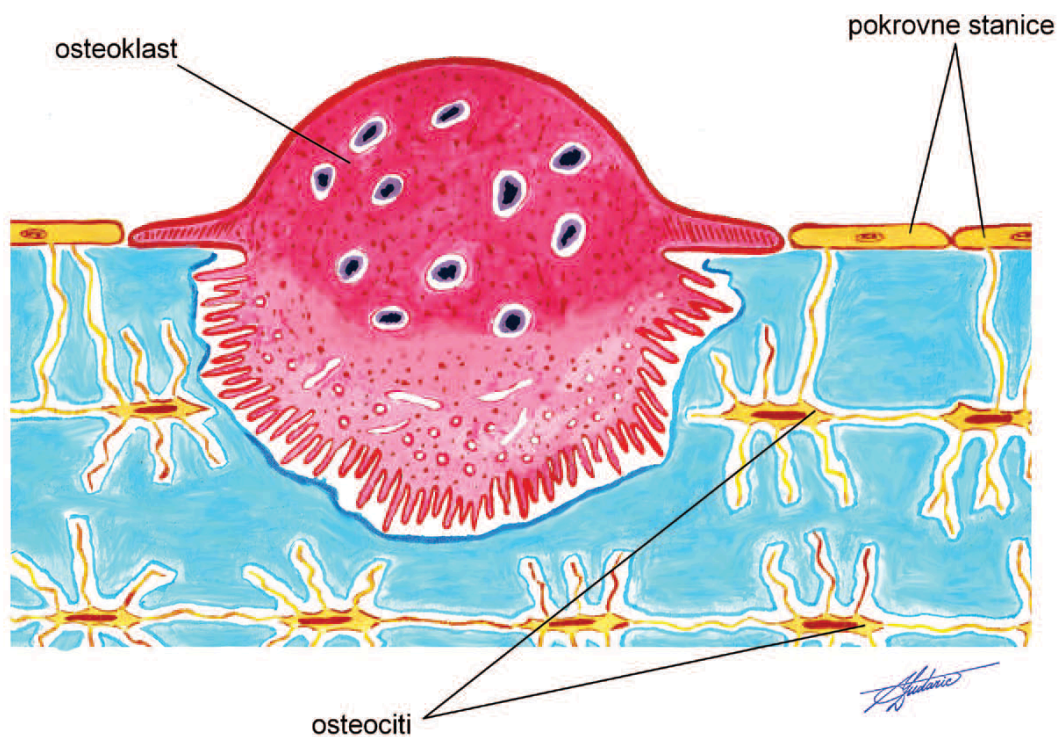
Stanice koštanog tkiva međusobno su dobro umrežene. Osteociti su povezani s osteogenim stanicama periosta, endoosta te osteoblastima i osteoklastima koštane gredice. Mreža koštanih kanalića s citoplazmatskim izdancima povezanim sa šupljinama koje sadrže tijelo osteocita osnova su mehanoreceptivne funkcije osteocita – tijesni spojevi između krajeva izdanaka stanica koštanog tkiva omogućuju prijenos mehanoreceptivnih signala među stanicama [7]. Zahvaljujući mogućnosti registracije mehaničkih promjena u koštanom tkivu, osteociti reguliraju aktivnost osteoblasta i osteoklasta tijekom remodeliranja kosti [8,9].

Kao metabolički aktivne stanice koštanog sustava, osteociti izražavaju određene metaboličke markere: osteokalcin, osteopontin i osteonektin [4]. Ovisno o starosti stanice, mlađi osteociti izražavaju molekulu E11/gp38 koja sudjeluje u formiranju citoplazmatksih izdanaka, dok stariji osteociti izražavaju molekulu Sost/sclerostin [10].

U odnosu na ostale stanice koštanog sustava, osteociti izražavaju i receptor za PTH (engl. Parathyroid hormone; PTH) – značajan u unutar staničnom prijenosu signala [11].

1.2.2 Osteoklasti

Osteoklasti su višejezgrene stanice koje potječu od monocitno-makrofagnog sustava stanica hematopoetske loze [12]. Njihova citoplazma pokazuje acidofilno bojenje, a stanična površina im je proširena citoplazmatskim naborima. Proširena citoplazmatska membrana olakšava oslobađanje vodikovih iona i proteolitičkih enzima koji razgrađuju koštani matriks, omogućujući osteoklastima da izvrše svoju primarnu ulogu - uništavanje koštanog matriksa staničnom fagocitozom u različitim zdravim i patološkim uvjetima [13].

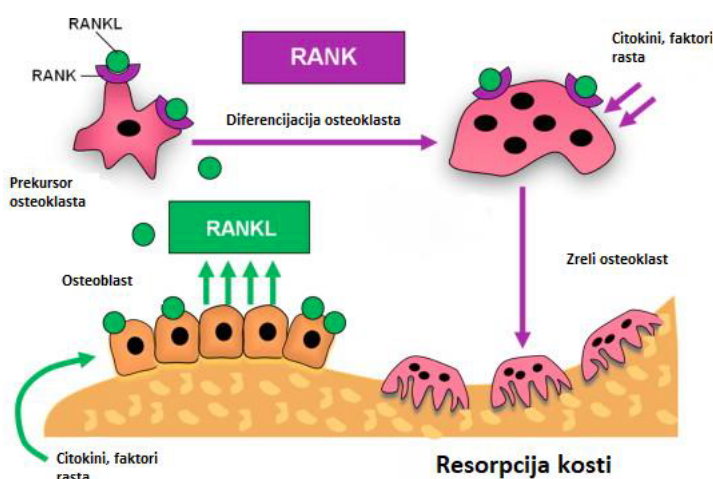


Slika 2: Shematski prikaz osteoklasta u Howshipovoj lakuni. Preuzeto iz Đudarić i sur. [4]

Identificirana su dva različita puta diferencijacije osteoklasta. Prvi je ovisan o citokinima prisutnima tijekom upale i traume čime se objašnjava gubitak koštanog tkiva tijekom patoloških procesa. Drugi način diferencijacije osteoklasta je ovisan o interakciji s osteoblastima i objašnjava povezanost između formiranja i resorpcije kosti tijekom fiziološke koštane remodelacije [14,15].

Ključni citokini i faktori rasta koji upravljaju diferencijacijom osteoklasta uključuju receptor aktivator nuklearnog činitelja κ B (engl. receptor activator of nuclear factor κ B; RANK), receptora aktivator nuklearnog činitelja κ B ligand (engl. receptor activator of nuclear factor κ B ligand; RANKL), osteoprotegrin (OPG), i makrofagni činitelj stimulacije kolonija (engl. macrophage colony-stimulating factor; M-CSF) [16].

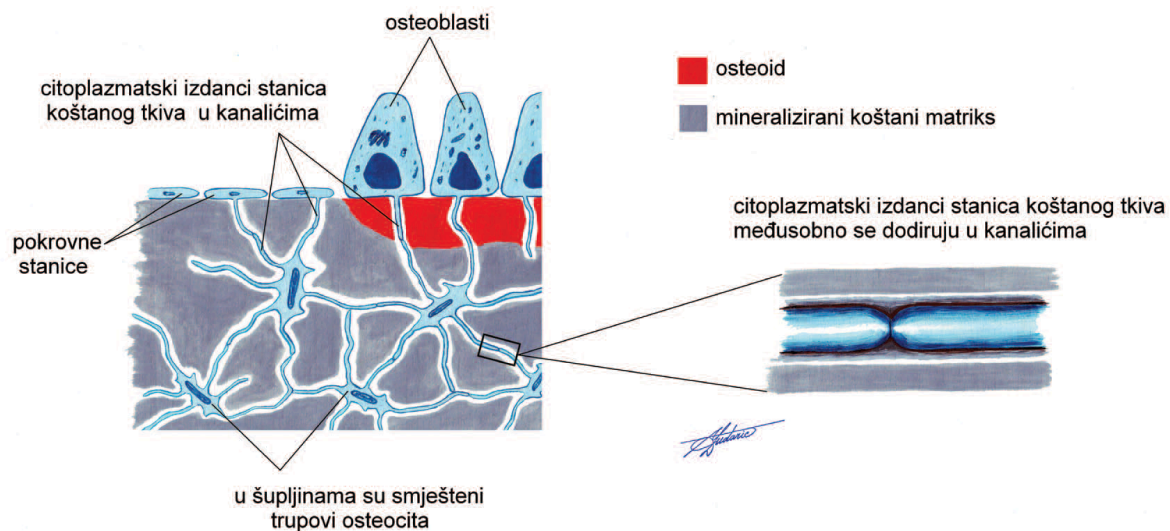
U nekim upalnim stanjima, makrofagi i limfociti izlučuju citokine IL-1 (engl. interleukin 1; IL-1) i TNF- α (engl. Tumor Necrosis Factor α ; TNF- α) koji pojačavaju aktivnost osteoklasta i posljedičnu resorpciju kosti [17,18]. U drugom putu diferencijacije, resorptivna funkcija osteoklasta ovisi o aktivnosti osteoblasta i regulirana je njome. Pokazalo se da osteoblasti proizvode homotrimerni RANKL, koji se veže na RANK receptor na membrani preosteoklasta. Njihovo vezanje potiče razvoj preosteoklasta u osteoklaste i pojačava resorptivnu membranu osteoklasta (Slika 3). Osteoblasti i osteogene stanice sintetiziraju OPG, koji djeluje tako što inhibira interakciju između RANK-a i RANKL-a [19]. Mehanizam koji regulira volumen kosti koju resorbiraju osteoklasti, kao i proces kojim prestaje resorpcija kosti nakon što se iscrpi određeni volumen, ostaje nejasan. Poznato je da osteoklasti fagocitiraju apoptotičke osteocite koji su početni signal u stimulaciji lokalnog remodeliranja. Eliminacija ovih osteocita rezultira prestankom signala remodeliranja. [4].



Slika 3: RANKL/RANK sustav diferencijacije osteoklasta. Preuzeto i prilagođeno prema [20]

1.2.3 Osteoblasti

Osteoblasti su velike, kuboidne stanice unutar koštanog tkiva odgovorne za proizvodnju, taloženje i mineralizaciju koštanog matriksa. Proizvodnja koštane tvari započinje stvaranjem kolagena tipa I, temeljnog strukturnog proteina kosti, koji povećava njezinu čvrstoću i elastičnost. [4]. Osteoblasti su smješteni u jednom redu duž površine koštane gredice. Njihova jezgra jajolikog je oblika, a citoplazma ima obilni hrapavi endoplazmatski retikulum i izražen Golgijev aparat. [21]. Njihovi citoplazmatski izdanci infiltriraju svježe formirani osteoid i dodiruju citoplazmatske izdanke osteocita. (slika 4).



Slika 4: Međusobna povezanost stanica u koštanom tkivu citoplazmatskim izdancima. Preuzeto iz Đudarić i sur. [4]

Osteoblasti su stanice mezenhimalnog podrijetla, nastale od pluripotentnih mezenhimalnih stanica. U zrelih organizmima ove se stanice nalaze u periostu, endoostu, perihondriju, krvi i sinovijalnoj membrani. Osteoblasti pokazuju značajnu interakciju s drugim stanicama unutar koštanog tkiva. Kao što je prethodno navedeno, oni moduliraju aktivnost osteoklasta i humoralno (RANK-RANKL) i izravnim kontaktom. Osteociti potječu od osteoblasta kao terminalno razvijene stanice unutar koštanog tkiva. Istraživanja pokazuju da se osteociti i pokrovne stanice mogu dediferencirati u osteoblaste primjenom PTH-a u staničnoj kulturi [22]. Osterix i runt-povezan transkripcijski činitelj 2 (engl. runt-related transcription factor 2; Runx2) dva su činitelja koja imaju značajnu ulogu u diferencijaciji osteoblasta, te ih se smatra glavnim genskim markerima osteoblastne aktivnosti. Oba su uključena u aktivaciji transkripcije gena diferencijacije osteoblasta (alkalna fosfataza, osteokalcin, osteopontin). Ekspresija Runx2 u

osteoblastima reguliraju, između ostalih čimbenika, koštani morfogenetski proteini (engl. bone morphogenetic proteins; BMPs). Njihova primjena na preosteoblastne stanične linije rezultira pojačanom aktivnošću alkalne fosfataze, osteopontina, osteokalcina i drugih markera osteoblastne aktivnosti [4,23]. Diferencijaciju osteoblasta mogu inducirati BMP-2, BMP-4 i BMP-7 [22,24]. Specifične markere zrelih osteoblasta čine osteokalcin, koštani sijaloprotein, receptori za PTH, integrini, inzulinu sličan činitelj rasta (engl. insulin like growth factor; IGF) i drugi.

Osteoblasti, zajedno s drugim stanicama koštanog tkiva, temeljna su morfološka i funkcionalna jedinica (engl. basic multicellular unit; BMU) koja regulira homeostaze koštanog tkiva [25].

1.3 Međustanična tvar koštanog tkiva

Međustanična tvar koštanog tkiva pretežno se sastoji od anorganskih komponenti (60 – 70%), zatim organskih komponenti (30-40%) i vode.

1.3.1 Anorganski (mineralni) sadržaj koštanog matriksa

Anorganska komponenta odgovorna je za tvrdoću kosti, a 95% njezina sastava čini kalcij fosfat u obliku kristala hidroksiapatita (lat. Crystallum hydroxyapatiti; HAP). Ostatak čine karbonatne, fluoridne, kloridne i citratne soli natrija, magnezija i drugih metala. Stanice odgovorne za mineralizaciju međustanične tvari jesu osteoblasti [4]. Hidroksiapatit (HAP) kompleksna je sol s kalcijem kao središnjim ionom. Primarna nukleacija proces je povećanja dimenzija kristala HAP, te je regulirana koštanim sijaloproteinima, a njihova ekspresija odgovara područjima nove mineralizacije koštanog tkiva [26]. Geni koštanih sijaloproteina ekspimiraju se u ranim osteoblastima aktiviranim hormonima i citokinima koji potiču osteoprodukciju. Sekundarna nukleacija predstavlja stvaranje agregata HAP. Regije koštanog tkiva s manjim kristalima hidroksiapatita mlađe su od onih s većim kristalima. [4].

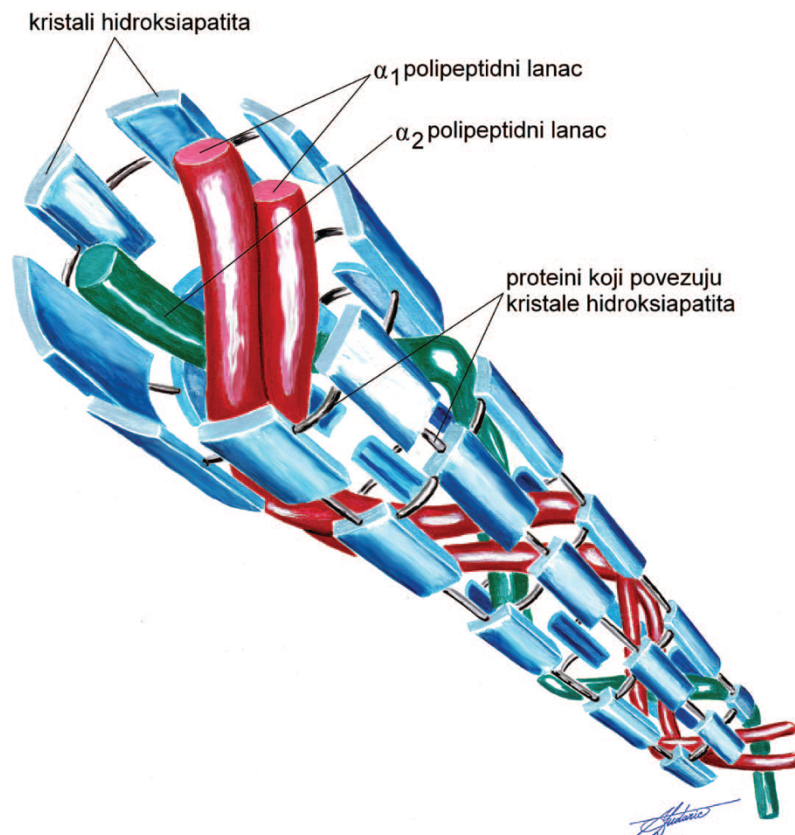
1.3.2 Organski sadržaj koštanog matriksa

U organskom sadržaju koštanog matriksa 90% sadržaja čini protein kolagen. Ostalih 10% čine glikoproteini, proteoglikani elastin, mikrofibrilarni proteini i male peptidne signalne molekule [27]. Upravo su potonje lokalni faktori rasta i diferencijacije koji djeluju između stanica, a među njima su za metabolizam kosti izuzetno važni koštani morfogenetski proteini (BMP). Danas su poznate i brojne druge interakcije među organskim sastojcima koštanog matriksa koje

reguliraju biološke pojave u koštanom tkivu – diferencijacija i proliferacija stanica, apoptoza, modeliranje i remodeliranje [4].

S obzirom na biokemijsku strukturu i trodimenzionalni oblik, organski sadržaj koštanog matriksa dijelimo na kolagen i nekolagene proteine [28].

Kolagen tip I najzastupljeniji je kolagen koštanog tkiva te je nositelj njegovih biomehaničkih svojstava.



Slika 5: Prikaz u shematskom obliku molekule kolagena tipa I i kristala hidroksiapatita. Preuzeto iz Đudarić i sur. [4]

Osteoblasti sintetiziraju prokolagen, preteču kolagena tipa I. Unutar koštane matrice, on se enzimski pretvara u tropokolagen, koji se potom razgrađuje na molekule kolagena koje se agregiraju u kolageno vlakance. Kovalentne veze spajaju kolagena vlakanca stvarajući kolagena vlakna.

U pojedinim koštanim lamelama, kolagena su vlakna međusobno gotovo paralelna, a u susjednima su postavljena pod određenim kutom, u pravilu pravim. Kolagen pokazuje znatnu čvrstoću i elastičnost, što mu omogućuje učinkovito podnošenje vlačnih i tlačnih sila, no nedostaje mu otpornost na savijanje. Rigidnost mu daju kristali HAP smješteni između vlakanca i paralelno s njima. Ovakva organizacija organskog i anorganskog sadržaja koštanog

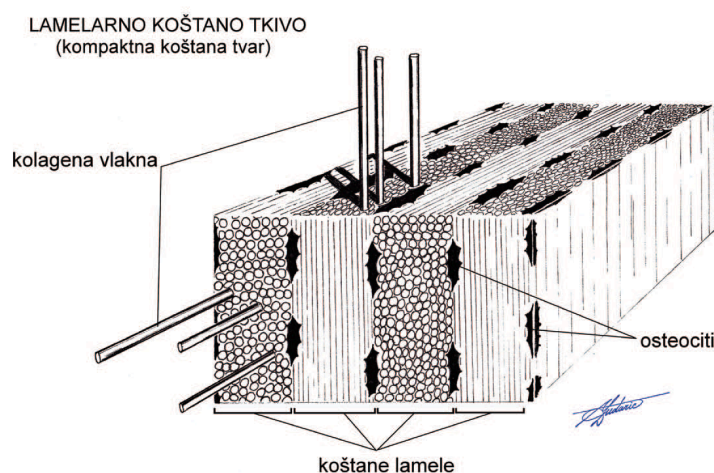
matriksa osigurava optimalna biomehanička svojstva koštanog sustava – čvrstoću i elastičnost [4].

Proteoglikani su makromolekule za koje se smatra da su važne u mehanoreceptorskoj funkciji osteocita kao transduktori mehaničkih podražaja kroz koštane kanaliće. Najzastupljeniji su biglikan i dokorin [29].

Glikoproteini imaju višestruke funkcije: kontroliraju staničnu proliferaciju i interakciju, te posreduju u mineralizaciji matriksa. Značajniji su osteonektin, trombospondin, fibronektin, osteoadherin, sijaloprotein i drugi.

S obzirom na pravilnost rasporeda organskog i anorganskog sadržaja te stupnju zrelosti, razlikuju se dvije vrste koštanog tkiva: zrelo i nezrelo koštano tkivo.

Nezrelo koštano tkivo karakterizira neujednačena unutarnja struktura. Sastoji se od kolagenih vlakana različite debljine i orijentacije. Sadrži veći broj stanica od zrele kosti. Ovaj specifični oblik koštanog tkiva prisutan je tijekom embrionalnog razvoja, kao i nakon prijeloma i u drugim reparacijskim mehanizmima. Kod odraslih osoba, ova vrsta koštanog tkiva prisutna je u cementu zuba, šavovima lubanje i područjima pričvršćivanja mišićnih tetiva na kost. Zrelo koštano tkivo pokazuje sustavnu organizaciju kolagenih vlakana, grupiranih u lamele koje su ili paralelne jedna s drugom ili koncentrično organizirane oko vaskularnog sustava. Koštane lamele uključuju šupljine koje zauzimaju tijela osteocita, a koje su spojene kanalima koji smještaju njihove citoplazmatske procese, olakšavajući staničnu komunikaciju [4].



Slika 6: Zrelo koštano tkivo s prikazanim rasporedom kolagenih vlakana u pojedinoj lameli. Preuzeto iz Đudarić i sur. [4]

1.4 Rast i razvoj kosti

Proces kojima nastaje koštano tkivo nazivamo osteogeneza ili morfogeneza. Tijekom embrionalnog razvoja, koštano tkivo nastaje iz embrionalnog vezivnog tkiva. Diferencijacija osteogenih stanica u osteoblaste tijekom stvaranja koštanog tkiva zahtijeva stimulaciju faktora rasta (principi osteoindukcije). Osteoblasti i koštano tkivo koje oni proizvode zahtijevaju prikladnu podlogu (princip osteokondukcije) - poroznu strukturu koja olakšava trodimenzionalnu infiltraciju koštanog tkiva s površine u unutrašnjost.

Osteogeneza obuhvaća dva procesa: stvaranje (osteoprodukcija) i resorpciju (osteoresorpcija) koštanog tkiva. Oba procesa odvijaju se istovremeno jer funkcioniraju koordinirano kako bi uspostavili i održali homeostazu koštanog tkiva.

Ravnoteža ova dva procesa je promjenjiva i vidljiva je i u zdravim i u patološkim procesima. Principi osteoprodukcije prevladavaju tijekom embrionalnog rasta i razvoja, karakterizirani povećanjem mase koštanog tkiva. Morfologija i dimenzije kostiju (anatomska norma) uspostavljaju se tijekom faze formiranja, karakterizirane smanjenjem intenziteta osteoprodukcije. Skeletni sustav prolazi kroz preoblikovanje kostiju (engl. bone remodeling) tijekom cijelog života kako bi optimalno održao svoju ulogu primarnog potpornog sustava.

Organizacija i struktura skeletnog sustava u razvoju određene su nizom sustavnih i kontroliranih procesa poznatih kao osifikacija. Osifikacija se odvija putem dva mehanizma: endohondralne i intramembranske osifikacije. Intramembranskom osifikacijom razvijaju se pločaste kosti krova lubanje, neke kosti visceralnog dijela lubanje i dio ključne kosti [4]

1.5 Kraniofacijalni kostur

Kranio – facijalni kostur formiran je iz stanica neuralne kreste koja potječu iz ektodermalnog tkiva. Formiranje mandibule i maksile regulira skupina stanica koje pokreću specifični transkripcijski faktori kodirani non-Hox genima i signalnim molekulama [30].

Neurokranijalne kosti, uključujući mandibulu (osim kondila) i maksilu formirane su intramembranoznom osifikacijom.

1.5.1 Alveolarna kost i zubni organ

Intramembranska osifikacija kao što je već opisano započinje zgušnjavanjem mezenhima u dobro prokrvljenim područjima koje nazivamo centrima osifikacije ili regionalnim centrima rasta. Mandibularna kost na primjer ima nekoliko mjesta rasta (angularno, simfizno, kondilno, itd.) [31]. Pločaste kosti lubanje spajaju se jedna s drugom kontinuiranim spojevima vezivnog tkiva (sindezmozama) [4]. Za razliku od pločastih kostiju lubanje, maksilarna i mandibularna kost se ne spajaju međusobno, već su interakciji preko specifičnog područja kosti maksile i mandibule koje nazivamo dento-alveolarnim kompleksom. U tom kontekstu, alveolarna kost (alveolarni nastavak, alveolarni greben) koja podupire zube gornje i donje čeljusti i nalazi se na kosti maksile, odnosno mandibule mora se smatrati posebnim entitetom, a ne dijelom tih kostiju. Jedna od glavnih razlika leži u centru rasta. Mjesto početka rasta i razvoja alveolarne kosti je zubni organ, te njegovo formiranje zapravo omogućuje stvaranje, rast i razvoj alveolarne kosti. To je jedinstvena situacija u kojoj jedan organ – zub, igra ulogu regionalnog centra rasta za susjedno koštano tkivo. Zbog toga alveolarna kost i zubni organ čine dento-alveolarni kompleks. Parodontni ligament također je dio ovoga kompleksa, stoga tvori entitet koji bi se trebao identificirati kao takav i nazvati ga odontološki funkcionalni entitet (engl. odontologic functional entity; OFE) [32]. OFE se može definirati kao biološki kontinuum triju anatomskih elemenata – zuba, kosti i parodontnog ligamenta koji su neovisni, ali embriološki i fiziološki povezani [33]. Brojne mutacije transkripcijskih faktora uključenih u razvoj dento-alveolarnog kompleksa pokazale su da rano blokiranje razvoja zuba dovodi do nedostatka volumena alveolarne kosti (npr. anodoncija ili ageneza više zubi). To se u potpunosti uklapa u teoriju da zubni zametak predstavlja regionalni centar rasta odgovoran za razvoj alveolarne kosti [34].

Zubi i alveolarna kosti mogu se smatrati spojnim područjem između dviju koštanih jedinica (maksile i mandibule) koje imaju vlastita mjesta rasta. Oblik i volumen maksile i mandibule

definirani su genetskim čimbenicima podvrgnutim epigenetskoj modulaciji mišićnim naprežanjem različitih orofacijalnih mišića s jedne strane i okluzalnim odnosom uspostavljenim između dentoalveolarnog nastavka gornje i donje čeljusti.

Periostalni rast

Osim unutrašnjih mjesta rasta, oblik kostiju definiran je i vanjskim rastom koji predstavljaju periostalne ovojnice. U usporedbi s unutrašnjim mjestima rasta koji određuju unutarnji volumen kostiju, periostalne površine definiraju vanjsku morfologiju kosti. Za razliku od unutrašnjih mjesta rasta, periostalne površine su dostupne i mogu igrati ulogu „terapeutskih površina“ na koje je moguće djelovati u svrhu izgradnje kosti alveolarnog grebena [31].

1.6 Mehanizmi atrofije i gubitka volumena kosti alveolarnog grebena

Nedovoljan volumen kosti na određenom mjestu alveolarnog grebena može se pripisati mnogim razlozima, koji se mogu podijeliti u dvije skupine: 1. Genetski i epigenetski čimbenici koji rezultiraju nedovoljnim volumenom kosti i 2. Lokalni etiološki čimbenici koji doprinose resorpciji kosti alveolarnog grebena. [35,36].

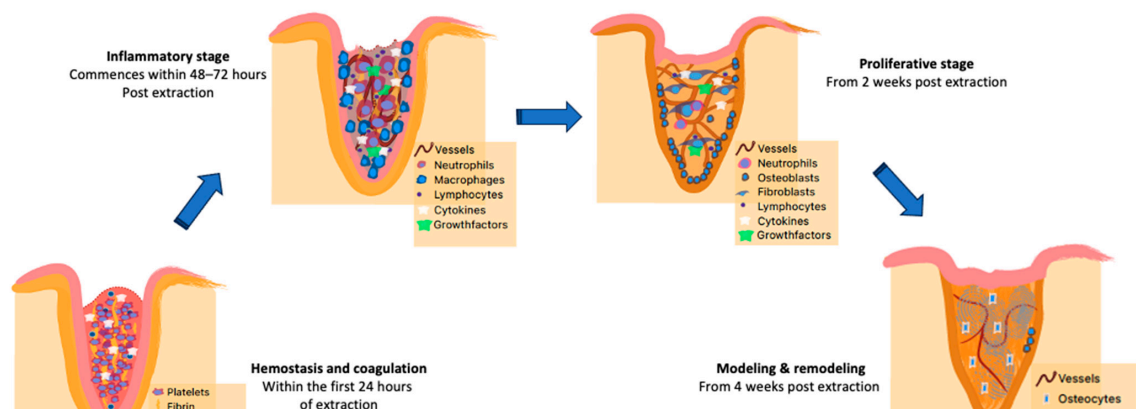
1.6.1 Cijeljenje alveole nakon ekstrakcije zuba

Najčešći uzrok gubitka volumena alveolarne kosti je ekstrakcija zuba.

Cijeljenje alveolarne kosti nakon ekstrakcije značajan je predmet znanstvenih istraživanja tijekom godina s obzirom da je ekstrakcija zuba jedan od najčešćih zahvata koji se izvode u dentalnoj medicini i dobro je opisana.

Poznato je da nakon ekstrakcije alveolarni nastavak prolazi niz promjena koji rezultiraju smanjenjem dimenzija alveolarnog grebena što može imati nepovoljan učinak na dentalnu implantaciju [37].

Brojne se promjene dešavaju na molekularnoj razini. Kaskada reakcija koja se odvija nakon ekstrakcije zuba može se opisati kroz četiri faze: faza formiranja ugruška, faza upale, proliferativna faza formacije te na kraju faza remodelacije [38]



Slika 7: Shematski prikaz cijeljenja alveole nakon ekstrakcije. Preuzeto i prilagođeno prema [38]

Trauma zuba nakon ekstrakcije rezultira poremećajem kontinuiteta tkiva i opskrbe metaboličkim tvarima. Stvara se krvni ugrušak, plazma se koagulira, a trombociti se izlažu ekstravaskularnom okruženju [39]. Ugrušak privlači polimorfonuklearne neutrofile na mjesto ozljede unutar prvih 24 sata. Oni oslobađaju niz kemokina i citokina, uključujući TNF-alfa, IL-1, IL-6, IL-11 i IL-18, koji se lokaliziraju na mjestu traume i potiču akutnu upalu, angiogenezu i agregaciju mezenhimalnih stanica [40]. Trombociti u ovoj fazi proizvode transformirajući faktor rasta $\beta 1$ (engl. transforming growth factor $\beta 1$; TGF- $\beta 1$) i faktor rasta podrijetlom od trombocita (engl. platelet-derived growth factor; PDGF) [41]. Istodobno, regrutirane osteoprogenitorne stanice sintetiziraju koštani morfogenetski protein 2 (engl. bone morphogenetic protein, BMP-2) koji u kombinaciji s drugim čimbenicima stimulira lokalno regrutiranje i osteogenu diferencijaciju mezenhimatskih stanica [41,42].

Razgradnja ugruška, uz neovaskularizaciju i kemotaktičke učinke citokina, olakšava infiltraciju novih stanica i razvoj granulacijskog tkiva koje zauzima alveolu [43]. Istovremeno, inducirana je diferencijacija osteoklasta kako bi oni omogućili resorpciju zaostalih sekvestara kosti i tako omogućili fiziološko spajanje alveole [44]. Važnu ulogu u ovom procesu imaju makrofagi koji se diferenciraju u dva fenotipa – proinflamatorni M1 i antiinflamatorni M2 makrofazi [45]. Ova dva tipa makrofaga djeluju zajedno kako bi započeli i završili imunološki odgovor u kaskadi reakcija koje rezultiraju cijeljenjem kosti. M1 makrofazi iniciraju upalni odgovor i izlučuju faktore koji stimuliraju početak angiogeneze. Postepeno, M1 makrofazi bivaju zamijenjeni M2 makrofazima koji potiču cijeljenje i staničnu proliferaciju te sazrijevanje krvnih žila na mjestu cijeljenja. Antiinflamatorni – M2 makrofazi imaju sposobnost lučenja upalnih i progenitornih medijatora poput TNF-alfa, faktora rasta fibroblasta (engl. fibroblast growth factor, FGF), te koštane morfogenetske proteine [39,46,47].

Prisutne mezenhimatske stanice razvijaju se u hondroците i osteoblaste, te sintetiziraju izvanstanični matriks tvoreći tako meki kalus koji premošćuje odvojene koštane fragmente [48]. Procesom enhondralne osifikacije meki kalus transformira se u tvrdi kalus s mineraliziranim matriksom kojeg proizvode osteoblasti. Ovo je praćeno smanjenjem razine upalnih citokina te porastom ekspresije transkripcijskog faktora Runx2 i Osterix-a (engl. transcriptional factor Sp7 – Osterix, Osx) kao najvažnijih transkripcijskih faktora u diferencijaciji osteoblasta. U toj fazi došlo je do stvaranje primarne kosti. Tako formirana primarna kost postupno se zamjenjuje lamelarnom (sekundarnom) kosti u kojoj osteociti prolaze kroz apoptozu te dolazi do ponovne uspostave normalne fiziologije nastanka kosti [43,49]. Da bi postala funkcionalna, takva kost zatim prolazi kroz proces koštane remodelacije [50].

Proliferacija osteoblasta doseže vrhunac između 7. i 10. dana, praćena ekspresijom osteokalcina (engl. osteocalcin; OC). Dva tjedna nakon ekstrakcije događa se ključni trenutak neovaskularizacije, nakon čega slijedi ekspresija vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. *vascular endothelial growth factor; VEGF*).

Signalne molekule koje reguliraju resorpciju koštanog matriksa te proizvodnju nove kosti putem osteoblasta nastalih iz mezenhimalnih matičnih stanica uključuju TNF-alfa, RANKL i koštane morfogenetske proteine [51]. Osteogeneza je najsnažnija između 14. i 21. dana, što se podudara sa sekundarnim porastom ekspresije proinflammatoryh citokina - TNF-alfa, IL-1 i IL-6 - povezanih s pregradnjom kosti. Između 21. i 35. dana, nezrela kost prolazi kroz transformaciju u zrelu, mineraliziranu kost, što je praćeno smanjenjem ekspresije TGF-β1 i povećanjem ekspresije sklerostina (engl. sclerostin, SOST). Posebnu ulogu u ovoj kaskadi reakcija signalnih puteva zauzimaju koštani morfogenetski proteini [52,53]. Koštani morfogenetski proteini pripadaju super obitelji transformirajućeg činitelja rasta tip beta i uključeni su u prijenosu unutar staničnih signalnih puteva fosforilacijom SMAD 1/5/8 [54,55].

1.7 Uloga pojedinih čimbenika u kaskadi transkripcijskih faktora

1.7.1 Uloga VEGF

Vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, *VEGF*) ključni je regulator angiogeneze tijekom embrionalnog razvoja i postnatalnog rasta. VEGF pojačava proliferaciju endotelnih stanica, te njihovu migraciju i preživljavanje [56].

VEGF je prvo otkriven kao Tumor vaskularni faktor permeabilnosti (engl. tumor Vascular Permeability Factor) 1983. godine [57], a finalno je opisan i karakteriziran 1989. godine [58]. Angiogeneza i osteogeneza dva su usko povezana procesa koja kontroliraju rast i razvoj kosti. Nekoliko je studija pokazalo da je VEGF esencijalan medijator tijekom procesa angiogeneze [56,59,60].

Istraživanje Carmelieta, Ferreire, Breiera i sur iz 1996. godine [61] pokazalo je da nedostatak samo jednog alela za VEGF uzrokuje smrt embrija uslijed defektne angiogeneze i formacije velikih krvnih žila.

Osim uloge u angiogenezi, VEGF je bitan čimbenik u procesima koštanog razvoja, pa je tako uključen u procese diferencijacije osteoblasta i hondrocita, te regrutiranje osteoklasta.

Dokazano je da osteoblasti izražavaju VEGF receptore [62]. Ekspresija VEGF i njihovih receptora u diferencijaciji osteoblasta dokazana je *in vitro* [62] i *in vivo* [63]. Istraživanje Deckersa i sur. iz 2000. godine [62] pokazalo je da je VEGF izražen u niskim koncentracijama na početku diferencijacije osteoblasta, te zatim njegova koncentracija snažno raste prema kraju diferencijacije, dok vrhunac doseže tijekom procesa mineralizacije kosti.

VEGF je važan faktor i u preživljavanju hondrocita. Istraživanje Zelzera i sur. iz 2004. pokazalo je da su hondrociti podvrgnuti masivnoj staničnoj smrti u miševa s nedostatkom VEGF u hondrocitima [64].

Dokazan je utjecaj VEGF na osteoklaste. Istraživanje Nakagawe i sur. Sugerira da je VEGF uključen u regrutiranje i diferencijaciju osteoklasta, te pojačanje osteoklastične aktivnosti u kulturi zrelih zečjih osteoklasta [65].

Kako je već navedeno, VEGF je bitan čimbenik neovaskularizacije koja posljedično povećava količinu mezenhimalnih stanica u perivaskularnom vezivnom tkivu. Dokazano je da VEGF

potiče vaskularne endotelne stanice na oslobađanje faktora rasta koji potom utječu na diferencijaciju mezenhimalnih stanica prema osteogenezi [66].

1.7.2 Uloga hemoksigenaze 1

Mehanizmi kojima hemoksigenaza 1 (engl. Heme oxygenase 1, HO-1) posreduje u protuupalnim učincima nisu do kraja istraženi. Ono što je poznato je da je HO-1 je odgovorna za oksidativno cijepanje hemske skupine što posljedično dovodi do stvaranje ugljičnog monoksida i biliverdina koji mogu imati bitnu ulogu u suzbijanju upalne reakcije [67].

Pretjerano taloženje željeza okidač je za gubitak koštane mase na što upućuje i činjenica da bolesnici s hemokromatozom imaju nisku koštanu masu. Istraživanje Zwerine i sur. ukazuju na izravnu vezu HO-1 i resorpcije kosti – indukcija HO-1 inhibira osteoklastogenezu in vitro i in vivo, a aktivnost HO-1 čini se da regulira upalnu destrukciju kosti svojim utjecajem na osteoklastogenezu [68].

Dokazana je i važnost HO-1 u interakciji s osteoblastima i makrofazima, pa tako HO-1 svojim produktima regulira aktivaciju i proliferaciju makrofaga, a s druge strane, porast HO-1 amplificira i diferencijaciju osteoblasta [69,70]

1.7.3 Uloga TNF – α

Prisutnost proupalnih citokina kao što je faktor nekroze tumora α (engl. Tumor Necrosis Factor α ; TNF- α) ključna je za početak cijeljenja kosti, budući da igra ulogu u diferencijaciji osteoprogenitorskih stanica u preosteoblaste [49]. Štoviše, TNF- α zajedno s RANKL igra bitnu ulogu u pregradnji kostiju i pokazalo se da je njihova ekspresija u korelaciji s dinamikom koštane pregradnje. Naime, TNF- α može neizravno stimulirati diferencijaciju osteoklasta sam ili putem RANK signalizacije [71,72]. U uvjetima homeostaze kostiju, resorpcija kosti je najvažniji preduvjet za formiranje kosti.

Skupa s RANKL-om, TNF- α promovira koštanu resorpciju, ali sam za sebe ne inducira diferencijaciju osteoklasta [17,73]. Studija Algate i sur. [72] pokazala je da TNF- α inhibicijom ekspresije Osterix-a i Runx2 može suprimirati diferencijaciju osteoblasta.

1.7.4 Uloga ciklooksigenaze – 2 (COX-2)

Prostaglandini (PG) su obitelj citokina sa širokim rasponom bioloških i patoloških funkcija poput održavanja homeostaze i posredovanja u upalnoj reakciji. Ciklooksigenaza (engl. Cyclooxygenase; COX) je enzim odgovoran za pretvaranje arahidonske kiseline u PGE₂. Najmanje dvije izoforme COX-a su razjašnjenje: COX-1 koji je odgovoran za proizvodnju PG s homeostatskim funkcijama u tkivima i COX-2 koje je odgovoran za proizvodnju PG uključenih u upalu. Upalni medijatori poput IL-1, TNF- α poznati su stimulatori ekspresije COX-2 [74].

COX-2 nije normalno detektibilna u većini tkiva, ali je inducirana u proinflamatornim i mitogenim podražajima [75].

Relativna uloga ovih enzima u pregradnji kosti opisana je u istraživanju [76] na miševima s genetski deficijentnom ekspresijom COX-1 ili COX-2. Miševi kojima nedostaje COX-2, ali ne i ekspresija COX-1, pokazuju smanjenu resorpciju kosti kao odgovor na PTH ili 1,25-hidroksil vitamin D₃.

Osim resorpcije kosti, COX-2 također može imati ulogu i u formiranju kosti. Povećano stvaranje lamelarne kosti kao odgovor na mehaničko naprezanje posredovano je COX-2 [77,78]. Zhang i suradnici demonstrirali su utjecaj COX-2 na kontrolu Osx-a, potrebnog za razvoj osteoblasta i proizvodnju kostiju. [79].

1.7.5 Uloga Osterix-a i Runx2

Osterix (engl. transcriptional factor Sp7 – Osterix, Osx) poznat kao i Sp7, transkripcijski je faktor specifičan za osteoblaste koji pripada SP obitelji, te ga je prvi put otkrio Nakashima i sur. 2002. godine [80].

Osx je specifično izražen u osteoblastima i osteocitima ali ga se ne nalazi u osteoklasta [81]. Potvrđeno je da je Osx uključen u diferencijaciju, maturaciju i aktivnost osteoblasta [82]. Inaktivacija Osx-a u miševa postnatalno je rezultirala zaustavljanjem diferencijacije osteoblasta i stvaranja nove kosti, što govori u prilog da Osx ima važnu ulogu u postnatalnom rastu koštanog tkiva [83]. Poznato je da Osx inducira ekspresiju nekoliko gena koji su nužni za osteoblaste tijekom formacije kosti: osteonektin, osteopontin, osteokalcin i koštani sijaloprotein [84].

Baek i Kim te Klein-Nulend i sur. pokazali su da je Osx uključen i u maturaciju i funkciju osteocita [85,86]. Ekspresija Osx-a potiče prekursorske stanice da se razvijaju u zrele, funkcionalne osteoblaste, koji se na kraju transformiraju u osteocite tijekom proizvodnje kosti [14,80,83,87–90]. Iako nije izražen u osteoklasta, Osx ima određene indirektne učinke na njih. Citokini poput IL-8 i Paratireoidni hormon povezani proteina (engl. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP)) mogu uzrokovati koštanu destrukciju povećavajući diferencijaciju i aktivnost osteoklasta, a dokazano je da su IL-8 i PTHrP povećani prekomjernom ekspresijom Osx [91].

Dva su glavna signalna puta koja induciraju ekspresiju Osx gena – Runx2 ovisni i Runx2 neovisni put [82].

Runx2 ovisni put povezan je s koštanim morfogogenetskim proteinima. BMP2 ovdje ima ključnu ulogu jer uzorkuje diferencijaciju mezenhimatskih stanica u Runx2+ i Osx+ stanice. Ekspresija Osx-a nije direktno vezana uz BMP, već je dokazano da BMP2 aktivira Runx2 preko SMAD signalnog puta, a Runx2 potom regulira ekspresiju Osx [92–94].

Runx2 je protein koji inducira diferencijaciju u multipotentnih mezenhimatskih stanica u nezrele osteoblaste, pokazuje visoke vrijednosti u istima, a kako se oni razvijaju u zrele osteoblaste vrijednost Runx2 opada. Unatoč činjenici da Runx2 i Osx kontroliraju koštanu formaciju, istraživanja na Osx deficijentnih miševa razlikuju se od onoga u Runx2 deficijentnih miševa što indicira da imaju različitu ulogu u procesu formacije kosti [80].

1.7.6 Uloga Koštanih morfogenetskih proteina i SMAD signalnog puta

Koštani morfogenetski proteini (engl. bone morphogenetic proteins; BMP) dio su super obitelji transformirajućeg faktora rasta β (engl. Transforming Growth factor β , TGF- β) koji su uključeni u organogenezu, skeletogenezu, osteogenezu te staničnu diferencijaciju i apoptozu regulacijom ekspresije ciljnih gena. U posredovanju njihovog učinka središnju ulogu unutar stanice imaju SMAD citoplazmatski proteini. SMAD je bitan u transdukciji signala iz citoplazme do jezgre stanice gdje regulira transkripciju ciljnih gena izravno ili uz pomoć drugih faktora transkripcije [95].

BMP svoj biološki učinak ostvaruje preko dvije vrste transmembranskih receptora: BMP tip I (BMPRI) i receptora tipa II (BMPRII) [96,97]. Nakon vezanja na receptore dolazi do aktivacije receptorski reguliranog SMAD (R-Smad) i to Smad1, Smad5 i Smad8 [98–100]. TGF- β aktivira Smad2 i Smad3. Sve dok se BMP ili TGF- β ne vežu na svoje receptore, SMAD signalni put ostaje neaktivan. Po vezivanju BMP i TGF- β na receptore, aktivira se R-Smad koji tvori heterokompleks sa Smad4 koji se još naziva i Co-Smad (engl. Common – partner Smad), te se taj kompleks potom translocira u jezgru i dalje regulira transkripciju specifičnih gena [95].

Poznata je uloga BMP-a u diferencijaciji osteoblasta iz mezenhimalnih stanica [101,102]. Diferencijaciju osteoblasta mogu potaknuti BMP-2, BMP-4 i BMP-7 [22,24]. Blokada Smad signalnog puta inhibira BMP uzrokovanu diferencijaciju mezenhimalnih stanica [103,104]. Prekomjerna ekspresija Smad1/Smad4 ili Smad5/Smad4 signalnog puta dovoljna je za pokretanje diferencijacije osteoblasta [105]. Ova zapažanja pokazuju da BMP regulirani Smad 1/5/ i vjerojatno Smad8 igraju ključnu ulogu u diferencijaciji mezenhimatskih stanica u osteoblaste [95].

1.8 Od molekularnih mehanizama do kliničke primjene

Spoznaje o staničnim i molekularnim mehanizmima remodelacije kosti, uključujući ulogu stanica koštanog tkiva i signalnih puteva čine temelj razumijevanja procesa regeneracije koštanog tkiva. Ovi mehanizmi izravno su povezani s kliničkim ishodima cijeljenja alveole nakon ekstrakcije zuba, a upravo je razumijevanje tih bioloških procesa omogućilo razvoj suvremenih kliničkih strategija usmjerenih na očuvanje dimenzija alveolarnog grebena i poticanje osteogeneze pomoću različitih biomaterijala.

Osim brojnih promjena na molekularnoj razini, ekstrakcija zuba rezultira brojnim kliničkim manifestacijama koje rezultiraju koštanom resorpcijom na mjestu vađenja.

Iako je resorpcija kosti nakon ekstrakcije zuba dugotrajan proces, statistički se najveći gubitak događa u prvom mjesecu nakon vađenja zuba te je utvrđen horizontalni gubitak alveolarne kosti od 29% do 63% i vertikalni gubitak alveolarne kosti od 11% do 22%, u prvih šest mjeseci nakon vađenja zuba [106]. Istraživanje Chappuais i sur. upućuje na činjenicu da s dimenzijama bukalne stijenke alveole od 1mm i uže, dva mjeseca nakon ekstrakcije zuba dolazi do gubitka visine iste u iznosu od 7,5 mm, a ako je debljina bukalne stijenke deblja od 1 mm, gubitak vertikalne dimenzije iste iznosi 1,1 mm. Sve navedene promjene dimenzija za sobom ostavljaju posljedice kao što su promijenjena morfologija alveolarnog grebena, atrofija i potpuni nestanak kosti alveolarnog grebena što u konačnici dovodi do otežane mogućnosti protetske ili implanto-protetske rehabilitacije pacijenta [107]. Kako bi se ublažile spomenute dimenzionalne promjene alveolarnog grebena, preporučljivo je napraviti određene augmentacijske postupke sa svrhom uspostavljanja skeleta koji će olakšati razvoj nove kosti.

Očuvanje alveolarnog grebena je postupak pomoću kojeg se želi minimizirati resorpcija kosti nakon ekstrakcije zuba za budući protetski tretman ili ugradnju dentalnog implantata [108]. Prvi put je opisano 1982. godine, a sinonimi su joj očuvanje ili augmentacija alveole [109]. Očuvanje koštane mase alveolarnog grebena moguće je postići kirurškim postupcima koji omogućavaju reparaciju koštanog tkiva zubne alveole, po principima osteogeneze, osteoindukcije i osteokondukcije [49].

U preglednom radu Darbya i sur. [110] sistematizirane su tehnike augmentacije alveolarnog grebena nakon ekstrakcije zuba te je identificirano nekoliko različitih tehnika. Prva opisana, a ujedno i najčešće korištena je vođena regeneracija kosti (engl. Guided Bone regeneration, GBR). GBR uključuje upotrebu materijala za nadomjestak kosti i membrane uz kompletno ili djelomično šivanje rane. Druga opisana metoda uključuje korištenje materijala za nadomjestak kosti, ali ne i membranu. U ovom se slučaju rana primarno šiva koronarnim pomicanjem ili

rotacijom mukoperiostalnog režnja. Treća opisana tehnika podrazumijeva samo aplikaciju membrane za GBR bez upotrebe zamjenskog koštanog materijala, a rana se djelomično ili potpuno zatvara mekim tkivom.

1.9 Vođena regeneracija kosti (engl. Guided Bone regeneration; GBR).

Očuvanje dimenzija alveolarnog grebena nakon ekstrakcije zuba po principima GBR-a pokazalo se pouzdanom tehnikom s predvidljivim rezultatima koji omogućavaju korekciju horizontalnih i vertikalnih mekotkivnih i koštanih defekata [108,111].

Principe vođene regeneracije tkiva 1998. godine opisali su Dahlin i sur. [112]. Hipoteza ovog istraživanja bazirana je na činjenici da različite stanice u tkivu dopijevaju u različito vrijeme na mjesto defekta tijekom procesa cijeljenja kosti. U istraživanju su primijenili fizičku barijeru – membranu koja je sprječavala fibroblaste da migriraju prema mjestu defekta, a istovremeno omogućila sporoproliferirajućim stanicama s osteogenetskim potencijalom da ispune mjesto defekta. Seibert i Nzman [113,114] prvi su uz membranu koristili koštani nadomjesni materijal koji je dao dodatnu volumnu stabilnost defektu i spriječio kolaps membrane u sam defekt.

Kako bi GBR bio uspješan, potrebno je zadovoljiti nekoliko principa. Jedan od bitnih čimbenika jest postizanje primarnog zatvaranja rane, čime se osigurava kontinuitet i nesmetan tijek procesa cijeljenja. Potom je bitna angiogeneza koja je nužna radi opskrbe krvlju i nediferenciranim mezenhimatskim stanicama. Bitno je održati i volumnu stabilnost defekta kako bi se osiguralo dovoljno mjesta za rast kosti i stabilnost biomaterijala što je ključno za pravilno formiranje krvnog ugruška i cijeljenje bez upale [115].

Uz poštivanje svih bioloških principa, vrlo je važno poznavati dentalne biomaterijale koji se koriste u vođenoj regeneraciji kosti.

Biomaterijali u koštanoj regeneraciji podijeljeni su u dvije skupine: zamjenski koštani materijali te membrane za vođenu regeneraciju kosti.

Poseban entitet u vođenoj regeneraciji kosti predstavlja autologna kost [116–120]

1.9.1 Membrane u vođenoj regeneraciji kosti

Iako ne postoji idealna membrana za GBR, svaka koja se koristi trebala bi ispuniti 5 kriterija:

1. biokompatibilnost – membrana u kontaktu sa susjednim tkivima treba poticati zacjeljivanje na mjestu defekta
2. održavanje mjesta (engl. space maintaining) – membrana se ne smije urušiti na mjestu defekta, odnosno mora omogućiti održavanje dovoljno mjesta za uspješno stvaranje kosti;
3. stanična okluzivnost (engl. cell occlusiveness) – idealna membrana treba spriječiti infiltraciju mekih tkiva u područje regeneracije, a istovremeno treba omogućiti prolaz kisika, staničnih tekućina te bioaktivnih tvari koje potiču stanični rast da dospiju na mjesto defekta;
4. jednostavno rukovanje – membrane trebaju biti stabilne, ne smiju biti presavitljive ili prekrute;
5. bioaktivacija (engl. bioactivation friendly) – iako trenutno nije nužna karakteristika za idealnu membranu, ovo se svojstvo smatra važnim smjerom budućeg razvoja membrana s ciljem da membrane aktivno sudjeluju u procesima regeneracije tkiva [121].

Najosnovnija klasifikacija membrana u vođenoj regeneraciji kosti dijeli ih na resorptivne i neresorptivne.

Prvu generaciju činile su neresorptivne membrane koje su ispunjavale svojstvo biokompatibilnosti i održavanja volumena, ali zbog nemogućnosti resorpcije zahtijevale su sekundarni kirurški zahvat jer je membranu nakon regeneracije defekta bilo potrebno ukloniti [122]. Istraživanja su pokazala da je korištenje ovih membrana povezano s većom učestalošću dehiscijencije rane [119]. Od neresorptivnih membrana najviše se koriste politetrafluoretilenske membrane (engl. polytetrafluorethylene: PTFE) ili ekspanzirane politetrafluoretilenske membrane (engl. expanded polytetrafluorethylene; ePTFE) [122]

PTFE je sintetski fluoropolimer koji posjeduje biološki inertna svojstva koja može zahvaliti jakim kovalentnim vezama između ugljika i fluora. Ne postoji enzim u ljudskom organizmu koji može pokidati te kovalentne veze i zbog toga PTFE spada u skupinu neresorptivnih membrana. Osim što ne podliježe strukturnoj promjeni u tkivu domaćina, ne izaziva ni imunološku reakciju domaćina [123]. Kako bi se poboljšala mehanička svojstva, PTFE se ekspanzira pod akceleracijom te se dobiva e-PTFE membrana s ojačanim mehaničkim svojstvima. S procesom rastezanja ne mijenja se kemijska struktura molekule, već se utječe na strukturni raspored atoma u kristalnoj rešetki. To dovodi do povećanja pora te ojačanih mehaničkih svojstava. Budući da se radi o neresorptivnoj membrani, potreban je dodatni operativni zahvat nakon 6 do 8 mjeseci prilikom kojeg se odstranjuju membrana i pinovi [124].

Novija verzija ove membrane je d-PTFE (engl. dense polytetrafluoroethylene; d-PTFE) koja ima molekule veće gustoće [122,125].

U skupinu resorptivnih membrana spadaju kolagene membrane na kojima će biti veći naglasak s obzirom da su korištene u istraživanju ovog doktorskog rada.

Danas su kolagene membrane najčešće korištena skupina membrana u vođenoj regeneraciji kosti.

Kolagen je prirodni sastojak ljudskog organizma, prisutan u vezivnom tkivu gdje pruža strukturnu potporu i sudjeluje kao ključna komponenta u komunikacijskim procesima između stanica [126]. Kolagene membrane izazivaju minimalan imunološki odgovor domaćina, dobro se integriraju u okolno tkivo, resorbiraju se te ne zahtijevaju dodatni kirurški zahvat. One su životinjskog podrijetla, najčešće dobivene iz dermisa ili perikarda svinja ili goveda.

Neka istraživanja sugeriraju da kolagene membrane pokazuju bolje cijeljenje rane te učinkovitiju koštanu regeneraciju u usporedbi s PTFE membranama [127].

Kolagenske membrane pokazale su se kao vrlo prilagodljivi materijali jednostavani za upotrebu. Tijekom resorpcije ovih membrana, ne dolazi do izazivanja imunološke reakcije domaćina, već se membrana integrira u režanj. Prema autorima, takav proces dovodi do veće debljine pričvrstne sluznice i poboljšanog ishoda augmentacije [124].

Istraživanje Soldatos i sur. [128] pokazalo je kako ekspozicija membrane ima najznačajniji utjecaj na konačni klinički ishod kod oba tipa membrana. Stoga se, radi postizanja optimalnih rezultata, preporučuje primarno zatvaranje rana.

1.9.2 Koštani nadomjesni biomaterijali

Osim membrana u vođenoj regeneraciji kosti, bitnu ulogu imaju koštani nadomjesni biomaterijali.

U dentalnoj implantologiji danas se primjenjuju prirodni i sintetski biomaterijali. Prirodni biomaterijali dijele se na autologne (autograft); homologne (alograft) i heterologne (ksenograft).

Autologna kost

Autogena kost, autograft ili autologni koštani transplantat smatra se zlatnim standardom u kliničkoj praksi za augmentaciju kosti, budući da predstavlja jedini koštani zamjenski materijal koji posjeduje sva osnovna biološka svojstva kosti – osteogenezu, osteoindukciju i osteokondukciju [129,130]. Posebno je važan osteogenetski učinak autologne kosti, jer je ona jedini koštani nadomjesni materijal koji sadrži žive stanice – osteoblaste, odgovorne za stvaranje nove kosti [131]. Budući da je je donor ujedno i primatelj, imunološka reakcija na ovaj biomaterijal praktički je nemoguća, pa je ovaj nadomjestak u potpunosti biokompatibilan. Nekoliko je nedostataka povezano s autolognom kosti. Zbog potrebe za donorskom regijom potrebno je dodatno kirurško mjesto s koje će se uzeti autologna kost. Donorske regije mogu biti intraoralne poput ramusa mandibule, tubera maksile, simfize mandibule i sl. ili mogu biti ekstraoralni poput kalvarije, criste iliace i sl. [132,133]. Pokazalo se da je uzimanje autologne kosti s ramusa mandibule praćeno s manje komplikacija u odnosu na druge intraoralne regije [134]. Drugi važan problem autologne kosti je njegova brza resorpcija. Autologna kost tijekom cijeljenja i remodelacije pokazuje sklonost gubitka volumena i do 60% [135]. Nekoliko faktora može utjecati na smanjenje resorpcije autologne kosti. Jedan od njih jest kombinacija spužvaste i kortikalne autologne kosti. Spužvasta kost najčešće se koristi kao nadomjesni materijal s obzirom da sadrži osteoprogenitorne stanice i osteoblaste, a zahvaljujući velikoj površini svojih trabekula, spognioza omogućuje stvaranje osteoinduktivnog okruženja i potiče revaskularizaciju na mjestu transplantacije. Kortikalna kost s druge strane ne sadržava osteoblaste i osteoprogenitorne stanice, ali pruža strukturno-mehaničku potporu i potiče regeneraciju osteokondukcijom. Stoga kako bi se povećao potencijal cijeljenja, koristi se kombinacija kortikalne i spužvaste autologne kosti [136,137].

Drugi faktor koji može utjecati na smanjenje resorpcije autologne kosti jest njeno kombiniranje s ksenograftom i membranom za vođenu regeneraciju kosti što može rezultirati smanjenjem resorpcije autografta za 50% [138].

Ksenograft

Ksenograft je nadomjestak za kost dobiven od životinjskih vrsta poput goveda, svinja, konja. Prije upotrebe takva kost mora proći mehanički i kemijski postupak pročišćavanja kako bi se uklonile organske komponente i na kraju dobile granule hidroksiapatita. Ksenografti su biokompatibilni, hidrofilni i imaju osteokonduktivna svojstva. Proces okoštavanja nakon uporabe ksenotransplantata dovode do kolonizacije stanica primatelja na isti, što rezultira stvaranjem koštanog matriksa. Teoretski, ksenografti goveda predstavljaju rizik od prijenosa prionskih infekcija na primatelja, što je jedan od nedostataka ovog biomaterijala. Istraživanja pokazuju da je rizik od prijenosa bolesti zanemariv, no određena sumnja i dalje postoji. Ksenografti su dostupni u obliku koštanih blokova ili granula. Nedostatak je što ksenogeni koštani blok može puknuti prilikom fiksacije, što loše utječe na kirurški zahvat i cijeljenje kosti. Ksenografti se koriste u sljedećim kirurškim postupcima: očuvanje alveolarnog grebena, povećanje dna maksilarnog sinusa i pri vođenoj regeneraciji kosti. Uz to, zbog svojih prednosti u pogledu mehaničkih svojstava i otpornosti na resorpciju, često se kombiniraju s autogenom kosti kako bi se postigla stabilnost koštanog volumena [139–142].

Osim poznavanja podrijetla, ključno je razumjeti fizikalna i kemijska svojstva biomaterijala. Naime, biomaterijal koji se prebrzo resorbira može nestati prije nego što se osteogene stanice nasele putem osteokondukcije i potaknu *de novo* stvaranje kosti. S druge strane, biomaterijal koji se ne resorbira može ometati primarnu osteogenezu i sazrijevanje kosti, što može dovesti do kronične upale i posljedične inkapsulacije biomaterijala [143,144].

Goveđi koštani biomaterijal Cerabone® (Botiss Biomaterials, Njemačka) danas je jedan od najčešće korištenih materijala u postupcima očuvanja alveolarnog grebena. Proizveden je iz trabekularne kosti goveda na način da je fizikalnim i kemijskim postupcima uklonjena organska komponenta kosti s osteoinduktivnim molekulama, imunosne stanice i patogeni (prioni, bakterije, virusi). Rezidualni ekstracelularni matriks predstavlja kalcijev hidroksiapatit [139]. U postupcima purifikacije, ksenogena kost izložena je visokoj temperaturi (>1200 °C) što pridonosi karakterističnim fizikalnim svojstvima Cerabona®. Uspoređujući Cerabone® s druga dva često istraživana ksenogena biomaterijala (Bio-Oss®(Geistlich Pharma AG, Švicarska) i

THE Graft[®] (Purgo Biologics Inc., Korea)) svjetlosno-elektronska mikroskopska analiza pokazala je da sva tri biomaterijala imaju granuliranu strukturu (promjera 0,15-1 mm), te pokazuju poroznost (mikropore i makropore). Visoka poroznost je ključna u osteokondukciji. Makropore (promjer >100 µm) omogućuju bolji prodor krvnih žila te potiču formiranje i reorganizaciju novonastalog koštanog tkiva, dok mikropore olakšavaju prodiranje tjelesnih tekućina, transport iona i prianjanje osteoblasta. Biomaterijal Cerabone[®] pokazuje najmanju poroznost u usporedbi s druga dva ksenogena biomaterijala, ali ima najveći prosječan promjer mikro i makropora (0,46 µm). Sukladno navedenim činjenicama može se pretpostaviti da ima manju sposobnost adherencije osteoblasta [145].

Na taj se način Cerabone[®] značajno razlikuje od izvornih fizikalnih karakteristika trabekularne kosti koju je zadržao Bio-Oss[®]. Nadalje, utvrđeno je da Cerabone[®] sadrži veće kristale hidroksiapatita u usporedbi s THE Graft[®] i Bio-Oss[®], čime se svrstava u skupinu biomaterijala slabije razgradivosti [139,145]. Prema prekliničkim *in vivo* analizama koje su procjenjivale reparacijski kapacitet kosti nakon primjene Cerabona[®], zabilježen je porast količine novostvorene kosti u sljedećim rasponima: 0-40% u razdoblju od 21-28 dana; 14-78% u razdoblju od 42-84 dana i 21-30% za 168. dan [146–149]. U usporedbi s rezultatima koštane histomorfometrije i obujma kosti nakon primjene Bio-Ossa[®], utvrđen je veći obujam novostvorene kosti kod uzoraka gdje je bio primijenjen Cerabone[®]. Međutim, ovaj zaključak treba tumačiti s oprezom, budući da postojeća literatura sadrži znatno veći broj publiciranih studija koje analiziraju osteokonduktivna svojstva Bio-Ossa[®], u odnosu na one koje su analizirale Cerabone[®] [139].

Klinička istraživanja koja analiziraju postotak rezidualnog Cerabona[®] metodom koštane histomorfometrije relativno su rijetka, kao i studije koje uspoređuju Cerabone[®] s drugim ksenogenim biomaterijalima. U tom se kontekstu ističe klinička studija u kojoj su Cerabone[®] i Bio-Oss[®] uspoređeni u postupku bilateralne nadogradnje maksilarnog sinusa. Rezultati su pokazali veći postotak rezidualnog Cerabona[®] u odnosu na Bio-Oss[®], što se pripisuje sporijoj razgradnji Cerabona[®] [150].

Autologni dentin

U novije vrijeme sve se češće koristi autologni dentin u postupku očuvanja alveolarnog grebena.

Prvi dokumentirani dokaz osteoinduktivnog potencijala demineraliziranog dentinskog matriksa pružili su Yeomans i Urist 1967. godine kada su dokazali prisustvo koštanih morfogenetskih proteina u dentinu [151]. Koštani morfogenetski proteini pripadaju obitelji transformirajućeg faktora rasta β -1 (engl. transforming growth factor β , TGF- β 1) i jedine su signalne molekule koje mogu samostalno inducirati de novo formaciju kosti na ortotopičnim i heterotopičnim mjestima, a upravo njihova prisutnost u dentinu ga primarno razlikuje u odnosu na ksenogene biomaterijale koji u svom sastavu ne sadržavaju proteine [152,153]. Tek je 2003. godine Murata prvi put klinički primijenio dentin kao augmentacijski materijal u postupku augmentacije maksilarnog sinusa kod ljudi. Od 2008. godine njegova se klinička primjena značajno proširila, ponajprije zahvaljujući razvoju uređaja koji omogućuju jednostavniju i učinkovitiju upotrebu dentina u kliničkoj praksi [154].

Uz koštane morfogenetske proteine, dentin u svom sastavu ima kolagen tipa I i tipa III kao i druge brojne faktore rasta koji uključuju inzulinu sličan faktor rasta 2 (engl. Insulin like growth factor, IGF-II) i TGF β -1. Većina proteina koštanog matriksa poput osteopontina (engl. osteopontin, OPN), osteokalcina (engl. osteocalcin, OCN), koštanog sijaloproteina (engl. bone sialoprotein, BSP), osterixa, i transkripcijskog faktora-2 povezanog s runt-om (engl. runt-related transcription factor-2, Runx-2) također su identificirani u dentinu, što ga dodatno čini efektivnim koštanim nadomjesnim materijalom [155,156].

Istraživanja provedena na životinjskim eksperimentalnim modelima pokazala su da dentin posjeduje osteoinduktivna i osteokonduktivna svojstva. Utvrđeno je da se demineralizirani dentinski matriks u potpunosti inkorporira u novonastalu kost te se postupno resorbira tijekom procesa koštane remodelacije [157]. Istraživanja na životinjskom eksperimentalnom modelu Kima i Lee-a također su dokazala osteokonduktivni kapacitet demineraliziranog dentinskog matriksa koji je pripisan mineralima prisutnim u dentinu poput hidroskiapatita (engl. hydroxyapatite, HA) i trikalcijfosfata (engl. tricalcium phosphate, TCP) [158,159].

Najnovija klinička studija kojom se samo histomorfometrijski analiziralo koštano tkivo nakon primjene autolognog dentina upućuje na 85% novostvorene kosti i 25% rezidualnog dentina, nakon 7 mjeseci vođene regeneracije kosti [160]. U retrospektivnoj studiji na 58 ekstrakcijskih alveola, Pohl i sur. klinički i radiološki dokazali su uspjeh očuvanja volumena alveolarnog grebena upotrebom autolognog dentina kao augmentacijskog materijala [161]. Kliničke studije

koje uspoređuju demineralizirani dentinski matriks s ksenogenim biomaterijalima još su uvijek rijetke. Pang i suradnici [162] uspoređivali su ishod očuvanja alveole korištenjem BioOss®-a i dentina, te su rezultati pokazali da nije bilo statistički značajne razlike u očuvanju volumena koštanog tkiva između ova dva materijala.

Istraživanje Oguića i sur. [163] dokazalo je ekspresiju upalnih i osteoinduktivnih faktora koštanog tkiva i to TNF- α i BMP-4 nakon primjene autolognog dentina.

Imunohistokemijskim ispitivanjem u tom istraživanju utvrđena je TNF- α i BMP-4 imunopozitivnost u području oko čestica biomaterijala i području novostvorene kosti četiri mjeseca nakon očuvanja alveolarnog grebena u skupini autolognog dentina i ksenografta u kombinaciji s autolognom kosti, što je potvrđeno kvantitativnim rezultatima. Ovi rezultati pokazali su osteoinduktivni potencijal u obje skupine. Imunopozitivnost u skupini ADG je od dodatnog značaja jer je dentin tretiran etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA), što dokazuje da dentin i nakon tog postupka može zadržati svoju osteoinduktivnost. Zanimljivo je da je TNF- α i BMP-4 imunopozitivnost oko čestica biomaterijala i u području novostvorene kosti bila značajno viša u skupini ksenografta i autologne kosti u usporedbi sa skupinom autolognog dentina. Ovo otkriće može biti povezano s prisutnošću goveđeg ksenografta, što može izazvati jači imunološki odgovor, što je uobičajena reakcija na sve vrste koštanih nadomjestaka i ključna je za cijeljenje kostiju

Na integraciju biomaterijala, njihovu razgradnju i vaskularizaciju utječu upalni citokini iz invazivnih upalnih stanica. Iz perspektive molekulske biologije, odnos između interakcije domaćina i primijenjenog biomaterijala može se potvrditi aktivacijom imunskog odgovora o čemu u konačnici ovisi potpuno zacjeljivanje koštanog tkiva.

Tijekom cijeljenja kosti jako su važni uvjeti mikro okoliša te njima uvjetovane interakcije između stanica-upalnog odgovora i stanica koštane remodelacije. U tom kontekstu se u novije vrijeme istražuje uloga makrofaga, jer su to stanice koje prve dolaze u kontakt s implantiranim biomaterijalom [164]. Mišljenje je da makrofazi imaju specifičnu ulogu u koštanoj homeostazi jer izlučuju citokine specifične za M1 pro-upalni fenotip, koji je prisutan u ranoj fazi cijeljenja, kao i za M2 anti-upalni fenotip čiji se citokini pojavljuje u završnoj fazi cijeljenja i pridonose reparaciji koštanog tkiva. Multinuklearne orijaške stanice (engl. *Multinuclear Giant Cells*, *MNGCs*) koje se povezuju s odgovorom na biomaterijal (engl. *Biomaterial-associated Multinuclear Giant Cells*, *BMGC*) jesu treći tip stanica koje mogu pokazivati pro-upalni fenotip - M1 multinuklearne orijaške stanice (engl. *M1 Multinuclear Giant Cells*, *M1MNGCs*) ili anti-upalni fenotip – M2 multinuklearne orijaške stanice (engl. *M2 Multinuclear Giant Cells*, *M2MNGCs*), koji je istovjetan makrofazima, a ovisan je o kemijskim i fizikalnim svojstvima

biomaterijala [164–166]. Istraživanja na životinjskom modelu subkutane implantacije upućuju da ksenogeni biomaterijali uzrokuju upalnu reakciju ovisnu o makrofazima. U slučaju Bio-Ossa® raste broj MNGC stanica u početnim fazama cijeljenja, a broj im se postepeno smanjuje prema 60. danu, a vaskularizacija implantacijskog ležišta je zabilježena već 3. dan nakon implantacije i kontinuirano se nastavlja u kasnijim fazama cijeljenja. Kod primjene Cerabone® je pokazano da se MNGC javljaju 10. dan nakon implantacije, i broj im raste do 60. dana. Slično je s vaskularizacijom implantacijskog ležišta koja je za razliku od Bio-Ossa® vrlo niska u prvim danima implantacije i povećava se prema 60. danu [166,167]. Osim što fizikalna svojstva Cerabona® ukazuju na smanjeni osteokonduktivni potencijal, smatra se da njegov kemijski sastav, koji uključuje kalcij gadolinij oksid fosfat, može pridonijeti produženoj upalnoj reakciji tijekom vođene regeneracije kosti (GBR). Pretpostavlja se da prisustvo gadolinija potiče pojačanu ekspresiju citokina, kao što su IL-4 (engl. *interleukin-4*), IL-6 (engl. *interleukin-6*) i IL-13 (engl. *interleukin-13*) kao i vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. *vascular endothelial growth factor, VEGF*). Budući da su navedeni citokini glavni induktori fuzije makrofaga u MNGCs, njihova povećana ekspresija može se indirektno povezati s većim brojem MNGC stanica opaženih nakon implantacije Cerabona®. Postavlja se pitanje uloge MNGC stanica u kasnim fazama cijeljenja kosti. Uz hipotezu da se prisustvo MNGC može objasniti kao „reakcija stranog tijela“ (engl. *„foreign body reaction“*), nalazi histološke analize humanih uzoraka kosti upućuju da prisustvo MNGCs ne utječe na koštanu kvalitetu čak i 80 mjeseci nakon vađenja zuba. Većina orijaških stanica koje se nalaze na površini biomaterijala jesu osteoklasti čija je uloga resorpcija biomaterijala koji se potom zamjenjuje s nativnom kosti. Međutim, novija istraživanja pokazuju da određeni ksenogeni biomaterijali, poput Cerabona®, nisu podložni razgradnji osteoklastima te ne izazivaju reakciju stranog tijela. Moguće je da ksenogeni biomaterijal koji omogućuje perzistenciju MNGC stanica ima ulogu u očuvanju koštanog tkiva u implantacijskom ležištu putem kontinuirane ekspresije molekula poput VEGF i HO-1 koje potiču cijeljenje kosti [139].

Znanstveni doprinos istraživanja

Dosadašnja istraživanja bavila su se samo histološkom analizom uzorka kosti nakon primjene autolognog dentina, te je zato važno provesti detaljne imunohistokemijske analize kako bi se na osnovu intenziteta imunohistokemijskog odgovora bolje razumjelo upalni, protektivni i osteoinduktivni odgovor koštanog tkiva i usporedio s istim odgovorom nakon primjene ksenogenog biomaterijala i njegove mješavine s autolognom kosti.

U sklopu istraživanja ovog doktorskog rada prvi su puta publicirani podaci o ekspresiji upalnih i osteoinduktivnih faktora koštanog tkiva nakon primjena AD-a.

Kako bi se razjasnila uloga MNGC stanica potrebno je odrediti njihov fenotip (M1MNGC i M2MNGC) te kvantificirati njihov broj u koštanom tkivu nakon završetka očuvanja alveole. Ovim istraživanjem po prvi puta se analizirala ekspresija MNGC staničnog fenotipa u koštanom uzorku s autolognim dentinom. Bolje razumijevanje uloge M1MNGC i M2MNGC u koštanom tkivu nakon primjene autolognog dentina i ksenogenog biomaterijala te njegove mješavine s autolognom kosti važno je kako bi se znalo koji od navedenih biomaterijala generira najbolji reparacijski odgovor u koštanom tkivu.

U kliničkom kontekstu, važnost ovog istraživanja je u tome što će se uspoređivanjem ishoda očuvanja alveole uporabom AD, GK i njegove mješavine s AK pokušati odgovoriti na pitanje koji je od potonjih biomaterijala najučinkovitiji u tom postupku .

2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj je analizirati razlike u upalnom, osteoinduktivnom i protektivnom odgovoru koštanog tkiva nakon primjene autolognog dentina, govedeg koštanog biomaterijala Cerabone® i njegove mješavine s autolognom kosti.

Specifični ciljevi su:

1. Izračunati vrijednosti dimenzija alveolarnog grebena prije vađenja zuba i po završetku šestomjesečnog cijeljenja nakon očuvanja alveole kompjuteriziranom tomografijom konusnim snopom (engl. *Cone Beam Computed Tomography, CBCT*).
2. Izračunati vrijednosti 3D parametara pomoću mikro-CT-a i 2D parametara koštanom histomorfometrijom iz uzoraka koštanog tkiva.
3. Analizirati imunohistokemijsku ekspresiju upalnih čimbenika – faktora tumorske nekroze alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha, TNF- α*) i ciklooksigenaze-2 (engl. *cyclooxygenase-2, COX-2*), protektivnih čimbenika - VEGF, HO-1 i osteoinduktivnih čimbenika TGF β -1, BMP - 4 i BMP -7 i njihovih unutar staničnih glasničkih molekula (SMAD -2/-4 i SMAD -1/-5/-8) u uzorcima koštanog tkiva.
4. Identificirati M1 makrofage i M1MNGC stanice kao i M2 makrofage i M2MNGC stanice metodom dvostruke imunofluorescencije.

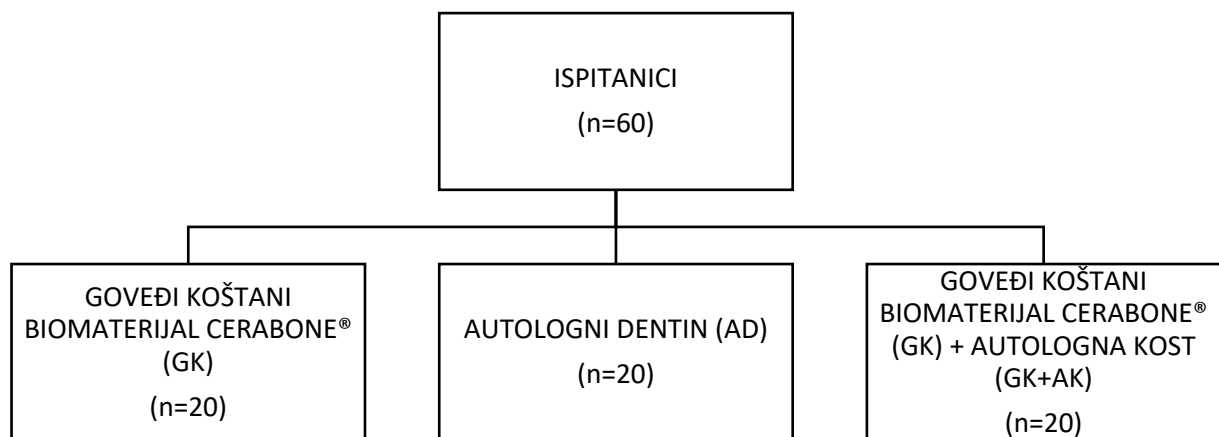
HIPOTEZA

Pretpostavljam da će se analizom dimenzija alveolarnog grebena, mikro-CT i histomorfometrijskom analizom koštanog tkiva te analizom ekspresije upalnih, angiogenih i osteoinduktivnih čimbenika, utvrditi koji je od primijenjenih biomaterijala (Cerabone®, Cerabone® s autolognom kosti i dentin) optimalan u postupku očuvanja alveole. Nadalje, pretpostavljam da će se metodom imunofluorescencije na uzorcima koštanog tkiva različitih biomaterijala, razjasniti uloga M1 makrofaga i M1MNGC stanica te M2 makrofaga i M2MNGC stanica.

3 MATERIJALI I METODE RADA

Istraživanje je provedeno u Dentalnoj poliklinici Rident i na Zavodu za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Mikro-CT snimanje provedeno je u Laboratoriju za mineralizirana tkiva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ovo istraživanje uključuje standardni kirurški protokol koji prethodi dentalnoj implantaciji. U istraživanje je bilo uključeno 60 ispitanika oba spola, koji su stariji od 18 godina, a kod kojih postoji indikacija za vađenjem zuba te kojima je zbog ugradnje dentalnog implantata indicirano očuvanje koštane mase alveolarnog grebena. Gornja dobna granica za odabir ispitanika je 65 godina. Postupak očuvanja alveole proveden je primjenom tri vrste biomaterijala, te su shodno tome ispitanici podijeljeni u 3 skupine po 20 ispitanika: Skupina 1. (goveđi koštani biomaterijal Cerabone[®], N = 20; Skupina 2. (autologni dentin), N=20; Skupina 3. (goveđi koštani biomaterijal Cerabone[®] s autolognom kosti) N= 20.



Slika 8: Podjela ispitanika

Broj ispitanika je utvrđen na osnovu dostupnih podataka iz literature i broja ispitanika koji su uključeni u slična istraživanja:

Sadeghi R, Babaei M i sur. A Randomized controlled evaluation of alveolar ridge preservation following tooth extraction using deproteinized bovine bone mineral and demineralized freeze-dried bone allograft. *Dent Res J* 2016;13(2):151-9.

Wood RA, Mealey Brian L. Histologic comparison of healing after tooth extraction with ridge preservation using mineralized versus demineralized freeze-dried bone allograft. *J Periodontol* 2012;83(3):329-36

Eskow AJ, Mealey BL. Evaluation of healing following tooth extraction with ridge preservation using cortical versus cancellous freeze-dried bone allograft. *J Periodontol* 2014;85(4):514-24

Demetter RS, Calahan BG i sur. Histologic Evaluation of Wound Healing After Ridge Preservation with Cortical, Cancellous and Combined Cortico-Cancellous Freeze-Dried Bone Allograft: A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Periodontol* 2017;88(9):860-868

Odabir materijala kojim će se raditi očuvanje alveole ovisio je o stanju zuba predviđenom za ekstrakciju. Autologni dentin korišten je kod zuba koji po vađenju imaju dovoljno očuvane zubne strukture koja nije endodontski liječena ili destruirana karijesnom lezijom, te se je takva zubna struktura procesuirala u uređaju Smart Dentin Grinder (KometaBio Inc., Cresskill, NJ, USA) kako bi se dobio autologni dentin spreman za upotrebu. Zubi koji su bili predviđeni za vađenje, a u sebi sadržavali endodontsko punjenje ili je zubna struktura previše destruirana karijesnim lezijama po vađenju su bili odbačeni, a alveole su se napunile kombinacijom goveđeg koštanog biomaterijala Cerabone® i autolognom kosti na pozicijama ugradnje implantata ili samo goveđim koštanim biomaterijalom Cerabone® između pozicija ugradnje implantata.

Autologni dentin spreman za upotrebu u očuvanju alveole pripremljen je pomoću uređaja Smart Dentin Grinder (KometaBio Inc., Cresskill, NJ, USA) prema uputama proizvođača. Ekstrahirani zubi temeljito su mehanički očišćeni brzo rotirajućim čeličnim svrdlima. Svi ispuni, zubni kamenac, parodontni ligament i dijelovi cakline uklonjeni su prije korištenja u uređaju. Čisti, pripremljeni zubi ispuhani su zrakom i takvi su se postavili u sterilnu posudicu u uređaju za usitnjavanje dentina. Po usitnjavanju, u posudici se dobio autologni dentin u granulama veličine 300-1200 µm. Takav usitnjeni dentin potom se 5 minuta ispirao u Dentin Cleanser® tekućini (KometaBio Inc., Cresskill, NJ, USA) kako bi se odstranili svi organski ostatci i bakterije, a potom se dehidrirao sterilnom gazom. U tako pripremljeni autologni dentin aplicirana je etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA) 10%tna otopina u vremenskom trajanju

od 2 minute, te se nakon toga dentin isprao s Dulbecco's Phosphate Buffered Saline® otopinom (KometaBio Inc., Cresskill, NJ, USA) i osušio.

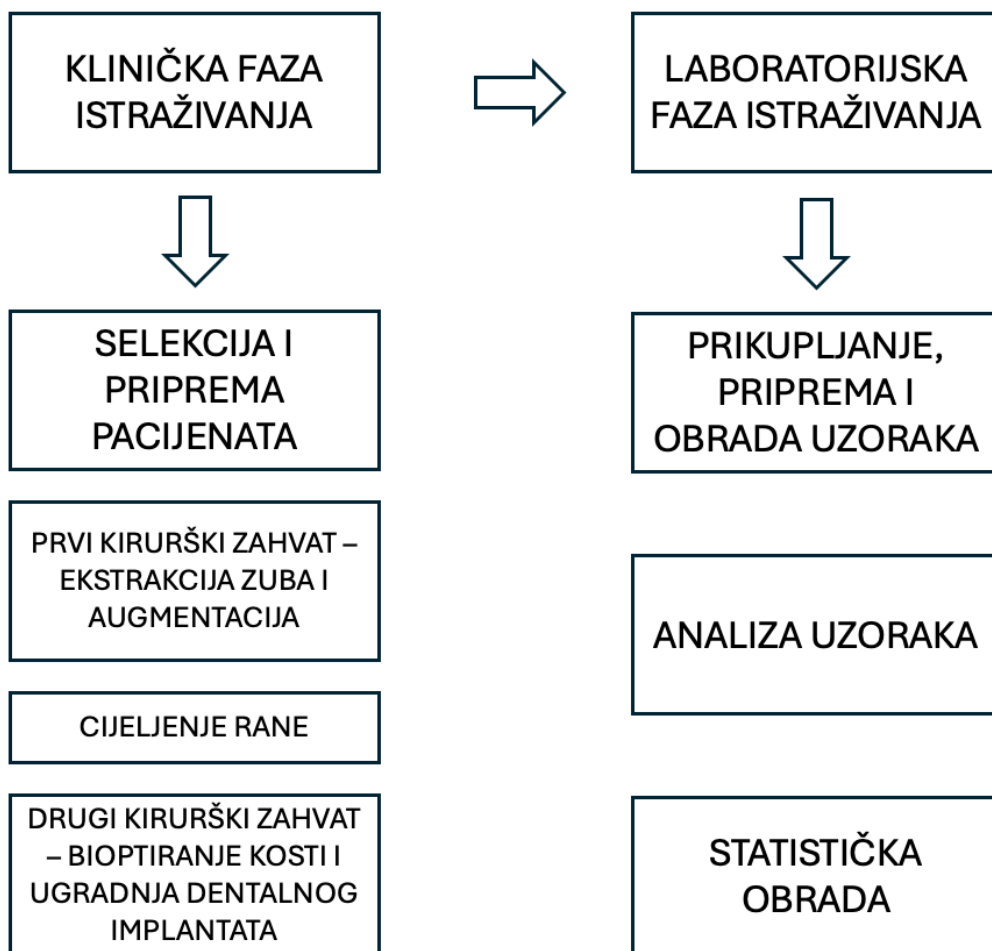
U ovom istraživanju neće biti kontrolne skupine, jer iskustvo dobre kliničke prakse i brojnih istraživanja pokazalo je da se alveola ne pušta da cijeli bez očuvanja s obzirom da se zna da je neminovna posljedica atrofija alveolarnog grebena.

Isključni kriteriji za sudjelovanje u istraživanju jesu:

- 1) Pacijenti zračeni u području glave i vrata
- 2) Pacijenti na intravenskoj ili peroralnoj terapiji s bisfosfonatima
- 3) Trudnice i dojilje
- 4) Pacijenti s neliječenom parodontnom bolesti
- 5) Pacijenti s nekontroliranim dijabetesom melitusom
- 6) Pacijenti na imunosupresivnoj terapiji
- 7) Pacijenti na dugotrajnoj terapiji s kortikosteriodima
- 8) Pacijenti s defektom oralne koštane stijenke
- 9) Pacijenti koji puše više od 10 cigareta dnevno
- 10) Pacijenti sa zaraznim bolestima (HIV, hepatitis)

3.1 Protokol istraživanja

Nakon što je utvrđena indikacija za vađenje zuba, a prije samoga vađenja, svim ispitanicima učinjena je pretraga pomoću CBCT uređaja (A 300 Morita, Kyoto, Japan), kako bi se odredile dimenzije alveolarnog grebena. Dobivena slika analizirana je pomoću Dixel programa za obradu slike (Morita, Kyoto, Japan).



Slika 9: Shematski prikaz tijeka kliničke i laboratorijske faze istraživanja

Sat vremena prije kirurškog zahvata pacijenti su dobili odgovarajuću antibiotsku terapiju (875 mg penicilin + 125 mg klavulanska kiselina / 600 mg klindamicin u slučaju alergija). Regija u kojoj se nalazi zub kao i regija iz koje se uzimalo autologno koštano tkivo, anestetizirana je lokalnim anestetikom Ubistesin forte (3M, Neuss, Njemačka). Nakon atraumatskog vađenja zuba kod kojeg nije bilo komplikacija, izljučio se upalni sadržaj unutar alveole te se provjerio integritet koštanih stijenki pomoću sonde (15 UNC Color- Coded, Hu-Friedy, Chicago, SAD). Uz pomoću kirurškog ekskavatora Curette Lucas 2,5 mm (Helmut Zepf, Seitingen-Oberflacht, Njemačka) kroz uleknuce izvađenoga zuba odignut je reznj mekog tkiva pune debljine iznad bukalne i oralne koštane stijenke.

Autologna kost prikupljena je iz područja grane čeljusne kosti pomoću strugača za kost (Safescraper Twist Meta, Reggio Emilia, Italija). Mjesto gdje je sluznica zarezana sašiveno je prekinutim šavovima s jednovlaknastim koncem (Daclon 5.0, SMI, St. Vith, Belgija).

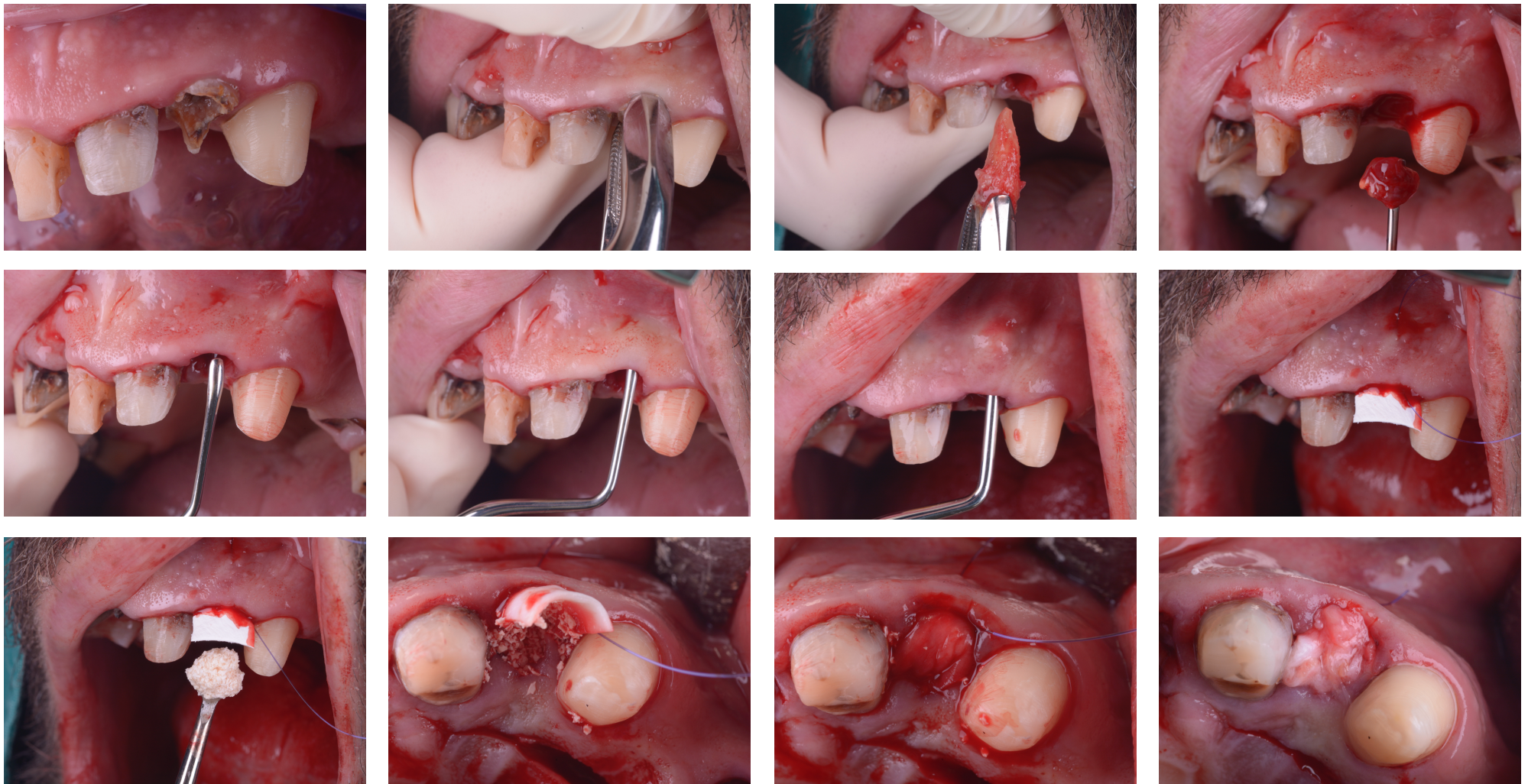
Nakon što se utvrdilo da alveola iz koje je izvađen zub ima očuvane sve koštane stijenke, prvo se postavio koštani nadomjestak unutar alveole, a zatim resorptivna kolagena membrana (Biogide, Geistlich Pharma, Wolhusen, Švicarska).

Šupljina zubne alveole ispunila se mješavinom goveđeg koštanog biomaterijala Cerabone® i autologne kosti na način da su dno i središnji dio alveole ispunjeni s autolognom kosti, a preostali dio alveole s mješavinom goveđeg koštanog biomaterijala Cerabone® i autologne kosti u omjeru 50:50, sve do razine gornjeg ruba bukalne stijenke alveole.

Šupljina zubne ispunila se dentinom.

Šupljina zubne alveola ispunila se goveđim koštanim biomaterijalom Cerabone®.

Membrana se postavila ispod bukalnog i oralnog reznja mekog tkiva, koji su ranije odignuti, a prekrivala je 3-5 mm gornjeg dijela koštane stijenke. Po apliciranju membrane, ista se je prekrila mobilizacijom reznja ili mekotkivnim transplantatom, te je rana bila primarno zašivena uz pomoć razgradivih šavova (Surgicryl rapid 6.0, SMI, St. Vith, Belgija). Pacijentima se savjetovalo daljnje uzimanje antibiotika i analgetika po potrebi, te ispiranje usne šupljine s tekućinama na bazi klorheksidina (Curasept A.D.S. 0.12%, Curaden, Kriens, Švicarska) kroz mjesec dana nakon zahvata.



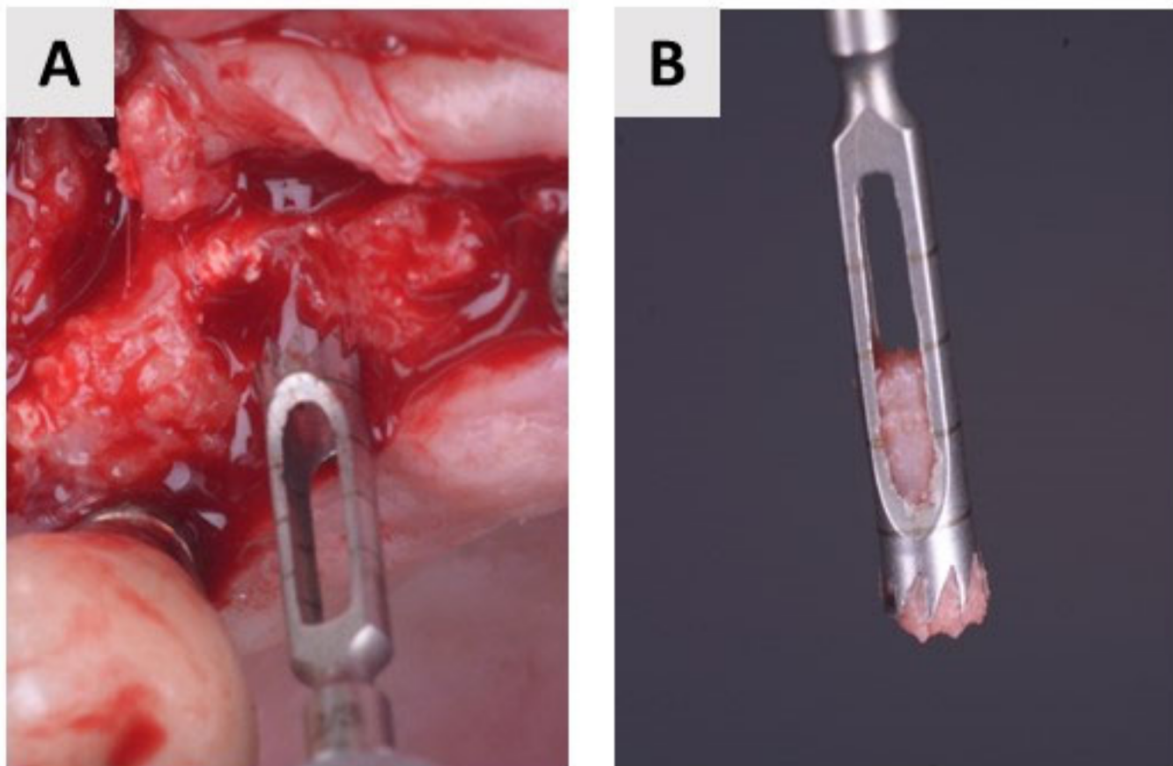
Slika 10: Klinički postupak očuvanja alveole nakon vađenja zuba. *

*Na slici je prikazana augmentacija s Ceraboneom®. Na isti način postupano je s ostalim biomaterijalima.

Nakon 4-6 mjeseci cijeljenja alveolarnog grebena, učinila se nova CBCT pretraga kako bi se procijenile dimenzije alveolarnog grebena prije ugradnje dentalnog implantata, te usporedile s dimenzijama grebena prije ekstrakcije zuba.

Nakon što se utvrdilo da je postignuta odgovarajuća dimenzija alveolarnog grebena, pomoću trepan svrdla promjera 2.3 – 2.8 mm (Helmut Zepf, Seitingen-Oberflacht, Njemačka) prilikom preparacije ležišta za dentalni implantat, uzet je uzorak koštanog tkiva za analizu.

Svi osobni podaci ispitanika bili su prikupljeni u skladu s etičkim i bioetičkim principima, te se osigurala zaštita tajnosti podataka. Istraživanjem je osigurano poštivanje bioetičkih standarda, odnosno četiri temeljna bioetička principa (dobročinstvo, neškodljivost, osobni integritet – autonomnost, pravednost), kao i ona iz njih izvedena, a u skladu s Nürnberškim kodeksom, najnovijom revizijom Helsinške deklaracije te ostalim mjerodavnim dokumentima. Ispitanik je bio upoznat s istraživanjem i dao je svoj pristanak potpisivanjem informirane suglasnosti.



Slika 11: Uzimanje koštanog uzorka. (A) Trepan svrdlo u maksili. (B) Trepan svrdlo s koštanim uzorkom.

3.2 Metode istraživanja

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

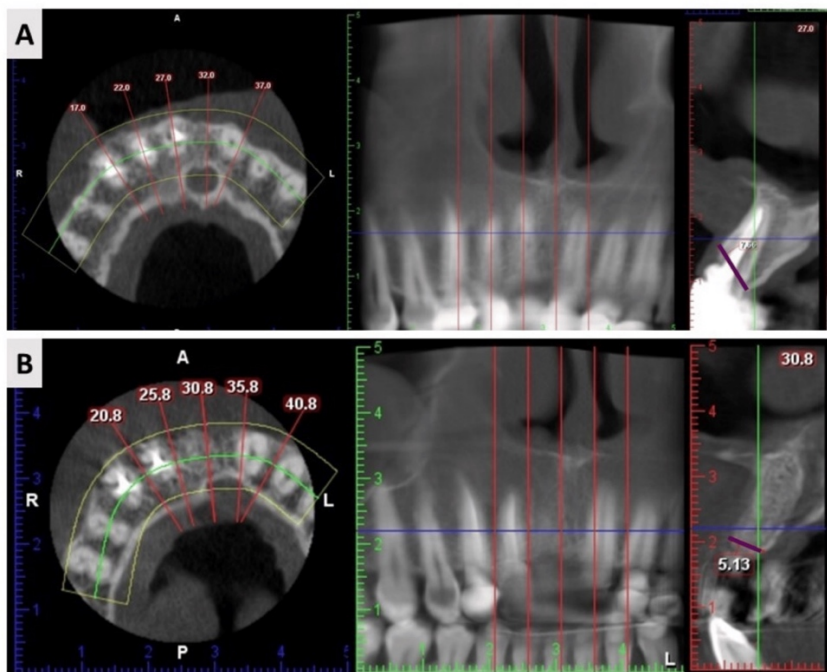
Snimanje čeljusti učinjeno je pomoću CBCT uređaja A 300 (Morita, Kyoto, Japan) kojim su se kvantificirale vrijednosti dimenzija alveolarnog grebena (debljina/mm) prije vađenja zuba i po završetku postupka - nakon 4 do 6 mjeseci.

Snimanje je izvedeno s rezolucijom od 0,3 mm (vrijeme skeniranja: 8,5 s; vrijeme ekspozicije: 4 s; 120 kV; 5 mA).

Radiološka mjerenja obavljena su u dva vremenska trenutka: prvi prije ekstrakcije zuba, a drugi 4 do 6 mjeseci nakon ekstrakcije i augmentacije alveolarnog grebena.

Za oba mjerenja korištene su identične postavke skeniranja. Procjena se temeljila na mjerenju bukolingvalne dimenzije alveolarnog grebena u navedenim vremenskim točkama. Širina alveolarnog grebena definirana je kao daljenost između najistaknutijih točaka bukalne i oralne strane grebena (slika 15).

Sva mjerenja proveo je jedan ispitivač (M.O.) kako bi se osigurala dosljednost rezultata.



Slika 12: CBCT protokol. Bukolingvalna dimenzija mjerena je između najistaknutijih točaka bukalno i oralno (ljubičasto označena linija) u dvije vremenske točke — prije ekstrakcije (A) i četiri mjeseca nakon (B).

3.2.2 Mikro-kompjuterizirana tomografija (mikro-CT)

Po uzimanju, uzorci koštanog tkiva pohranili su se u otopini 4% paraformaldehida i držali u hladnjaku na 4 °C do transporta. Kao priprema za transport, uzorci u uronjeni u otopinu 70%-tnog alkohola do trenutka snimanja na mikro-CT uređaju.

Snimanje koštanih uzoraka provedeno je mikro-CT uređajem SkyScan 1076 (Bruker, Belgija), uz rezoluciju od 18 µm i rotaciju od 0,40°, korištenjem 0,025 mm titanskog filtera. Prosječni okvir slike postavljen je na vrijednost 2. Dobivene slike rekonstruirane su pomoću Nrecon softvera, dok je analiza provedena u CTAn programu (Bruker, Belgija).

Kako bi se razlikovala novostvorena kost od korištenog biomaterijala, korišteni su specifični pragovi gustoće (engl. *threshold*) prilagođeni svakom biomaterijalu: za novostvorenu kost 50-255, za dentin 165-255, a za kombinaciju Cerabonea® i autologne kosti 110–255. Po završetku postupka, oduzimanjem je učinjena separacija vrijednosti biomaterijala u odnosu na novostvorenu kost.

Snimanjem mikro-CT dobivene su vrijednosti novostvorene kosti (NK, %) i rezidualnog biomaterijala (RB, %).

3.2.3 Histološka bojenja

Po završetku snimanja mikroCT-om, uzorci koštanog tkiva su dekalcinirani u tekućini za dekalcinaciju Osteofast 2 (Biognost, Zagreb, Hrvatska). Potom su standardnom tehnikom uklopljeni u parafinski blok i narezani pomoću mikrotoma (Leica RM2155 – Rotary Microtome, Leica Instruments, Ballerup, Njemačka) opremljenog s nožem za meka tkiva kako bi se dobili tkivni rezovi željene debljine (3-5 µm). Tkivni rezovi su obojani s histološkom bojom Hematoxylin eosin prema standardnim protokolima kojima se prikazuje kontrast između osteoida i mineraliziranog koštanog tkiva.

3.2.4 Koštana histomorfometrija

Na tkivnim rezovima koji su obojeni histološkim bojama, pomoću svjetlosnog mikroskopa Olympus BHA (Olympus, Tokyo, Japan) na koji je adaptirana digitalna Sony kamera (Sony, Yokohama, Kanagawa) učinjene su mikrofotografije tkivnih rezova. Mikrofotografije tkivnih rezova analizirane su pomoću kompjuterskog programa za obradu slike VAMS (Zagreb, Hrvatska) kako bi se kvantificirale vrijednosti sljedećih histomorfometrijskih parametara:

1. Postotak novostvorene kosti [NK (%)]. - postotak kosti koji zauzimaju nemineralizirano i mineralizirano tkivo koštanog uzorka. Odnosi se na trabekularni dio biotiranog uzorka. Ova je vrijednost izvedena iz dvodimenzionalnog mjerenja ukupog područja površine kosti i površine koju zauzima trabekularna koštana tvar, uključujući i prostor koštane srži.
2. Postotak rezidualnog biomaterijala [RB (%)]
3. Postotak mekog tkiva [MT (%)].

Svi parametri i metode koštane morfometrije, izvršeni su prema standardima i preporukama Američkog društva za istraživanje kosti i mineraliziranih tkiva (American Society of Bone and Mineral Research).

Protokol histološkog bojanja Hematoksilin & Eozin

Tkivni rezovi deparafinizirani su u otopini ksilola te rehidrirani kroz seriju etanolskih otopina opadajuće koncentracije (100%, 96%, 75%). Nakon toga uzorci su isprani destiliranom vodom i obojeni Ehrlichovim hemalaunom kroz 10 minuta. Nakon ispiranja tekućom vodom deset minuta, uslijedilo je tretiranje uzoraka kiselim alkoholom (HCL-etanol) potom je ponovno tkivo isprano tekućom vodom 10 minuta te s destiliranom vodom 5 minuta. Nakon toga, tkivo je obojeno 1%tnom vodenom otopinom hematoksilina 5 minuta i isprano u destiliranoj vodi u istom trajanju. Nakon završnog ispiranja i dehidracije kroz niz etilnih alkohola rastuće koncentracije, uzorci su izbistreni u ksilolu i uklopljeni u balzam.

U konačnom preparatu jezgre su obojene plavo, dok su citoplazma i dio međustanična tvari ružičaste boje.

3.2.5 Imunohistokemijska metoda

Imunohistokemijskom metodom indirekte peroksidaze analiziran je izražaj pro-upalnih citokina (COX-2 i TNF-alfa); protektivnih citokina (HO-1 i VEGF) i osteoinduktivnih proteini (TGF β -1, BMP-4 i BMP-7) te njihovih unutar staničnih glasničkih molekula (SMAD -2/-3 i SMAD -1/-5/-8). Intenzitet imunohistokemijskog obojenja kvantitativno je analiziran pomoću računalnog programa ImageJ. Za imunohistokemijsku analizu korištena su primarna antitijela prema popisu u nastavku.

Nakon fiksacije u 4% paraformaldehidu, dekalcinirani uzorak koštanog tkiva je uklopljen u parafinski blok. Uklopljeno tkivo je izrezano na debljinu od 3-5 μ m, nakon čega je deparafinizirano u ksilolu i dehidrirano u etanolu padajućih koncentracija. Potom su tkivni rezovi tri puta isprani otopinom PBS i u citratnom puferu 20 min zagrijavani na temperaturi 65 °C . Rezovi su zatim isprani otopinom Triton X 100 na sobnoj temperaturi. Nakon toga je uslijedila blokada aktivnosti endogene peroksidaze s 0.3% H₂O₂ u metanolu kroz 30 minuta. Nakon ispiranja tkivnih rezova otopinom PBS dodan je normalni serum (10%), izabran prema domaćinu sekundarnog antitijela u trajanju 60 min. Tkivni rezovi su inkubirani preko noći s odgovarajućim primarnim protutijelima kojima su identificirati pro-upalni citokini (anti-COX-2 i anti-TNF-alfa); protektivni citokini (anti-HO-1 i anti-VEGF) i osteoinduktivni proteini (anti-TGF β -1, anti-BMP -4 i anti-BMP-7) te njihove unutar stanične glasničke molekule (anti-SMAD -2/-3 i anti- SMAD -1/-5/-8) u odgovarajućim razrjeđenjima. Uslijedilo je ispiranje te inkubacija sa sekundarnim biotiniziranim protutijelom 45 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga je dodan streptavidin konjugiran na peroksidazu (LSAB + Kit, DakonCytomation, Denmark) i 3,3'Diaminobenzidin (DAB, Dakocytomation, Denmark) koji služi za vizualizaciju. Jezgre su kontrastno obojane s hematoksilinom. Preparat je uklopljen u entalan nakon čega se mikroskopiralo.

Popis primarnih protutijela:

BMP-7 (ab 93636 abcam, Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo), 1:200

BMP-4 (sc-137087 SCBT, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, SAD), 1:200

HO-1 (ab 189491 abcam, Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo), 1:200

SMAD-2/3 (PA5-99378, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD), 1:200

SMAD-1/5/8 (#95115 CST, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, SAD), 1:100

TNF- α (ab 270264 abcam, Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo), 1:200

TGF- β 1 (ab 215715 abcam, Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo), 1:200

COX-2 (PA5-27238, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD), 1:100

VEGF (ab 231260 abcam, Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo), 1:200

Intenzitet imunohistokemijske ekspresije

Kvantifikacija imunohistokemijskog bojenja analizirana je na prethodno snimljenim mikrofotografijama pomoću računalnog programa ImageJ. Mikrofotografije snimljene pri povećanju od 200x podvrgnute su odvajanju intenziteta, njegovoj pretvorbi u crno-bijelo i oduzimanju pozadinskog signala. Određene su interesne regije i postavljene na dobiveni prikaz slike, a konačni rezultat prikazan je kao srednja vrijednost intenziteta boje – srednja vrijednost sive boje.

3.2.6 Metoda dvostruke imunofluorescencije

Tkivni rezovi su deparafinizirani u ksilolu dva puta po 10 minuta, te su dehidrirani kroz alkohole rastućih koncentracija (70%, 90%, 100%). Potom su tkivni rezovi inkubirani u citratnom puferu kroz 10 minuta (T=60 °C) radi razotkrivanja antigena. Po hlađenju i ispiranju vrši se blokada s 5%-tnim goveđim serumskim albuminom kroz sat vremena. Tako pripremljeni tkivni rezovi inkubirani su primarnim protutijelom anti-CD68 (Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo), preko noći i po ispiranju inkubirano kroz 60 min. sa sekundarnim antitijelom ALEXA FLUOR 488 ZELENA (goat anti-mouse IgG H&I, ab150113 abcam u razrjeđenju 1:500). Potom je slijedila druga inkubacija primarnog antitijela anti-iNOS (Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo) za M1 makrofage, odnosno na drugom staklu/tkivnom rezu anti-206 (Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo) za M2 makrofage (preko noći, +4 °C) te po ispiranju u PBS-u inkubacija sekundarnog antitijela ALEXA FLUOR 594 crveno (60 min.) (goat anti-rabbit IgG H&I Alexa Fluor 594) ab150080 abcam (1:500). Po ispiranju u PBS-u nakapa se DAPI boja kojom se oboje jezgre te ponovno ispiru pod tekućom vodom i uklopi u moviol. Preparati se spremaju na čuvanje na +4 °C.

Ovom metodom istražuje se:

Kolokalizacija CD68 i iNOs markera za ekspresiju M1 staničnog fenotipa,

Kolokalizacija CD68 i CD206 markera za ekspresiju M2 staničnog fenotipa.

3.3 Statistička obrada

Statistička analiza je provedena uz pomoć kompjuterskog programa STATISTICA TIBC Software.Inc, version 14.0.1.25. Nakon što je utvrđena normalna raspodjela brojčanih podataka *Kolmogorov*-Smirnovim testom, razlike između grupa su analizirane primjenom testa one-way ANOVA. Rezultati su smatrani statistički značajnima na razini $P < 0.01$.

4 REZULTATI

4.1 Rezultati kompjuterizirane tomografije s konusnim snopom (engl. *Cone beam computed tomography, CBCT*)

Tablica 1: Prikazani su rezultati CBCT mjerenja dimenzija alveolarnog grebena.

Biomaterijal	Širina prije vađenja zuba	Širina nakon vađenja zuba	Razlika
AD ¹	8,12±1,14 mm	7,29±1,28 mm	-0,83±0,13
GK ²	7,87±1,31 mm	6,84±1,32 mm	-1,03±0,1
GK+AK ³	7,97±1,24 mm	6,67±0,73 mm	-1,3±0,48

¹Autologni dentin; ²goveđi koštani biomaterijal; ³goveđi koštani biomaterijal+autologna kost; one-way ANOVA*

Nije nađena statistički značajna razlika u dimenzijama alveolarnog grebena između analiziranih grupa biomaterijala (AD, GK, GK+AK); (P=0,103)*.

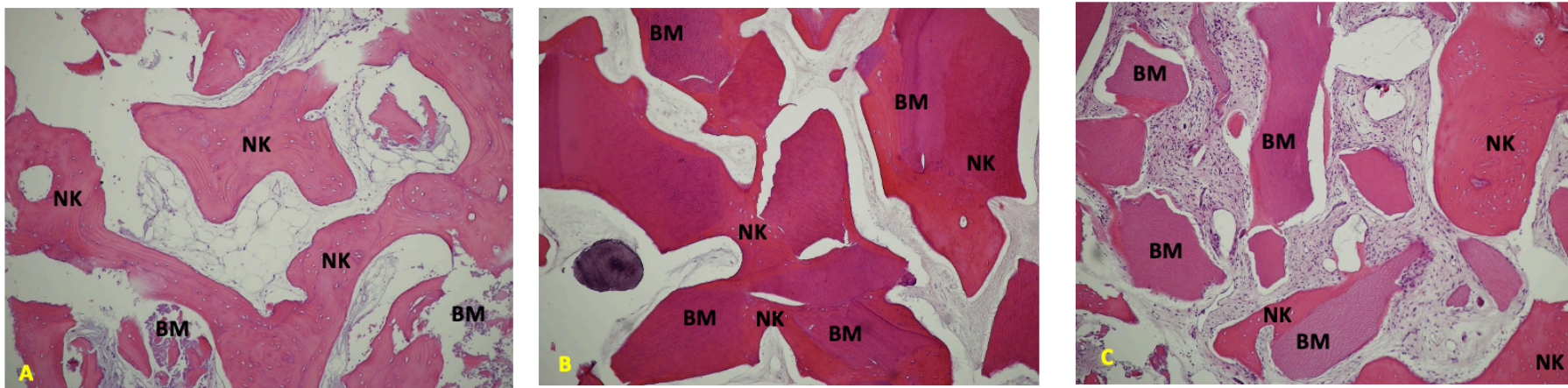
4.2 Rezultati koštane histomorfometrije

Tablica 2: Prikazani su rezultati koštane histomorfometrije.

Biomaterijal	Novostvorena kost	Rezidualni biomaterijal	Meko tkivo
AD ¹	71,35±9,15%	11,84±9,31%	16,81±8,87%
GK ²	66,85±11,31%	17,14±12,31%*	16,01±10,74%
GK+AK ³	68,89±10,43%	13,67±10,83%	17,44±7,67%

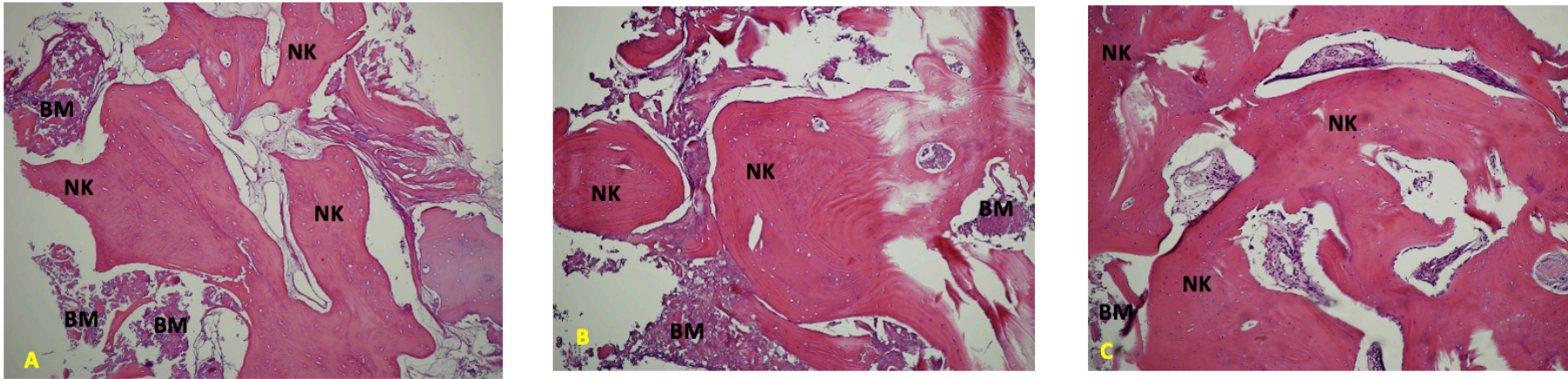
¹Autologni dentin; ²goveđi koštani biomaterijal; ³goveđi koštani biomaterijal+autologna kost; one-way ANOVA*

Nađen je statistički značajno veći postotak rezidualnog biomaterijala GK u skupini u odnosu na AD skupinu (P<0.01)*.



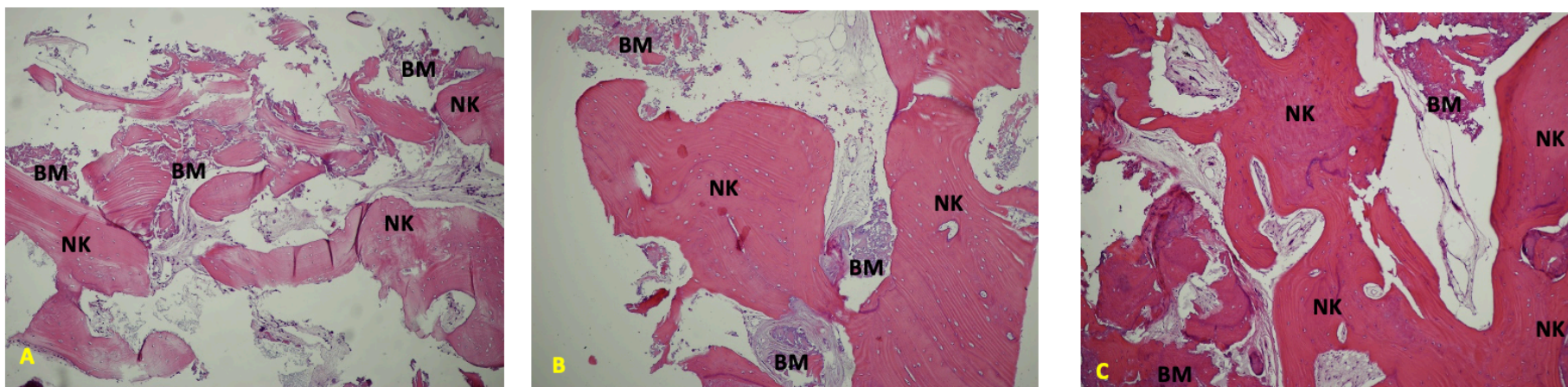
Slika 13: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova koštanih uzoraka dobivenih iz grebena alveolarne kosti nakon augmentacije s autolognim dentinom. A – (muškarac 54g., maksila); B - (žena 38g., maksila); C - (muškarac, 56g. maksila). Biomaterijal (BM); Novostvorena kost (NK). Hematoxylin-eosin, povećanje 100X.

Prisutan je fenomen „usidrenih” čestica dentina u novostvorenoj kost.



Slika 14: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova koštanih uzoraka dobivenih iz grebena alveolarne kosti nakon augmentacije s goveđim koštanim biomaterijalom+autologna kost (Cerabone+ak). A - (žena 48g., maksila); B - (žena 54g., maksila); C - (žena 57g. maksila). Biomaterijal (BM); Novostvorena kost (NK). Hematoxylin-eosin, povećanje 100X.

Čestice biomaterijala su ugrađene u novostvorenu kost.



Slika 15: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova koštanih uzoraka dobivenih iz grebena alveolarne kosti nakon augmentacije s goveđim koštanim biomaterijalom (Cerabone). A - (žena 57g., maksila); B - (muškarac 49 g., mandibula); C - (žena 54 g. maksila). Biomaterijal (BM); Novostvorena kost (NK). Hematoxylin-eosin, povećanje 100X.

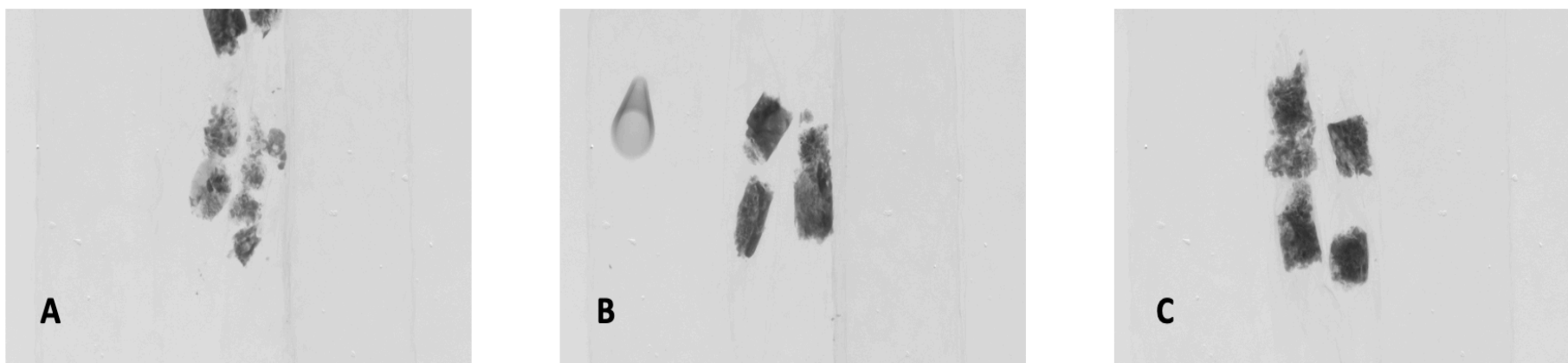
4.3 Rezultati Mikro-kompjuterizirane tomografije (mikro-CT)

Tablica 3: Prikazani su rezultati mikro-CT analize.

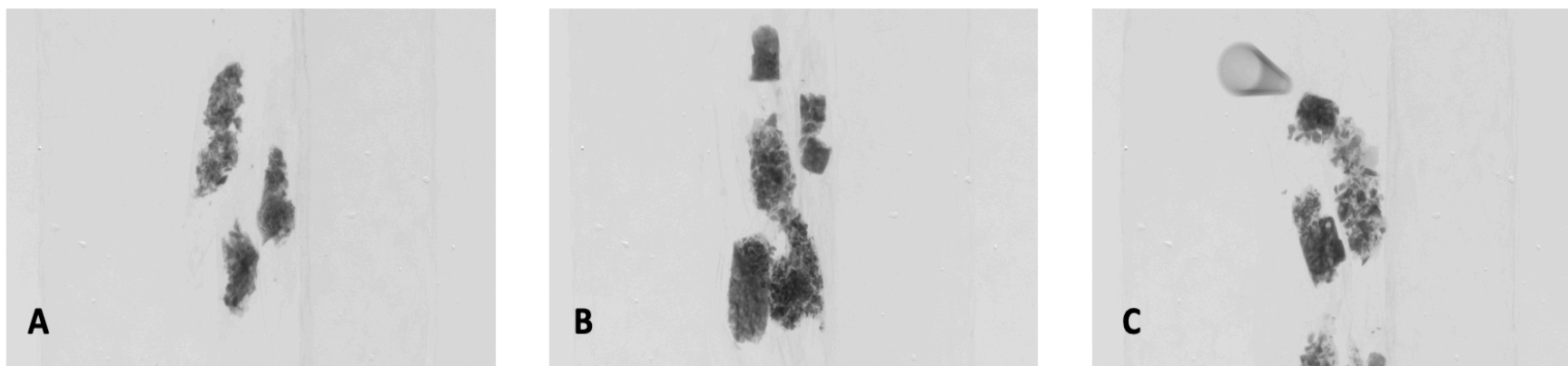
Biomaterijal	Novostvorena kost	Rezidualni biomaterijal
AD ¹	20,15±5,1%	5,44±2,11%
GK ²	18,96±4,51%	9,34±3,31%*
GK+AK ³	19,72±4,13%	6,57±2,73%

¹Autologni dentin; ²goveđi koštani biomaterijal; ³goveđi koštani biomaterijal+autologna kost; one-way ANOVA*

Nađen je statistički značajno veći postotak rezidualnog biomaterijala u skupini GK u odnosu na skupinu AD (P<0.01)*.



Slika 16: Mikro-CT rekonstruirane slike alveolarnog koštanog tkiva. A – autogni dentin; B - goveđi koštani biomaterijal (Cerabone); C - goveđi koštani biomaterijal s autolognom kosti (Cerabone +Ak). Povećanje je 2000 x 2000 px.

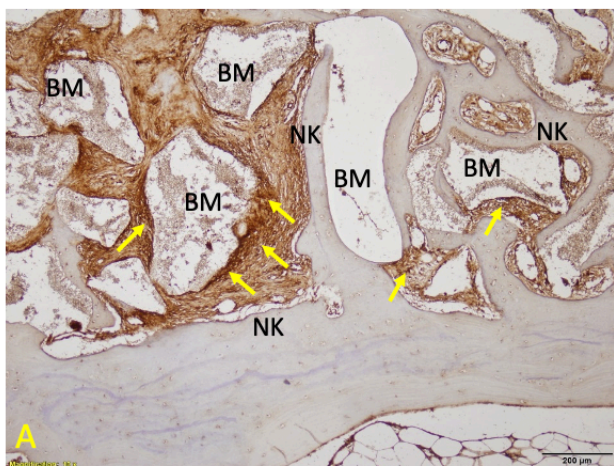


Slika 17: Mikro-CT rekonstruirane slike alveolarnog koštanog tkiva. A – autologni dentin; B - goveđi koštani biomaterijal (Cerabone); C - goveđi koštani biomaterijal s autolognom kosti (Cerabone +Ak). Povećanje je 2000 x 2000 px.

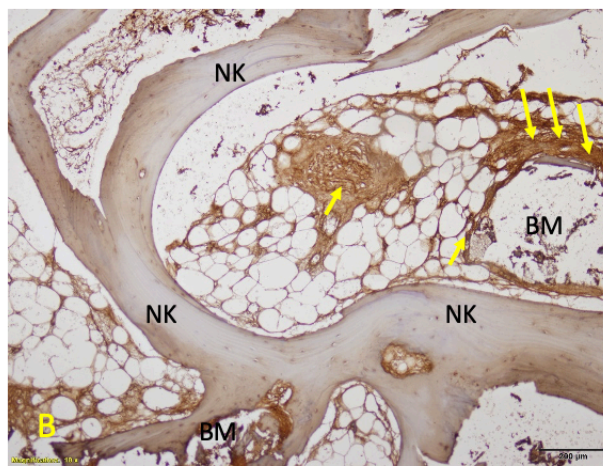
4.4 Rezultati imunohistokemijske analize

4.4.1 Imunohistokemijska analiza izražaja BMP-7

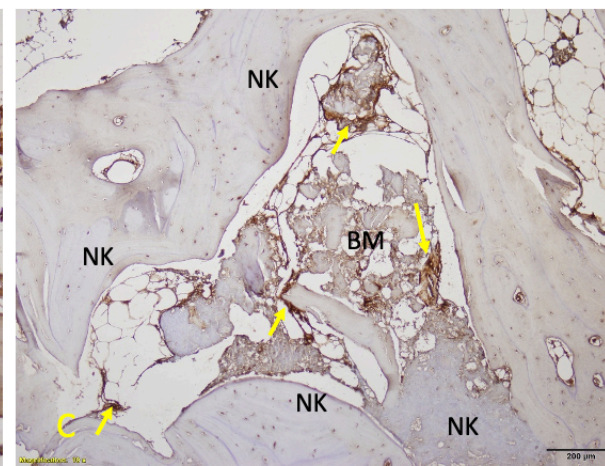
Autologni dentin



Ksenogeni biomaterijal



Ksenogeni biomaterijal+ ak

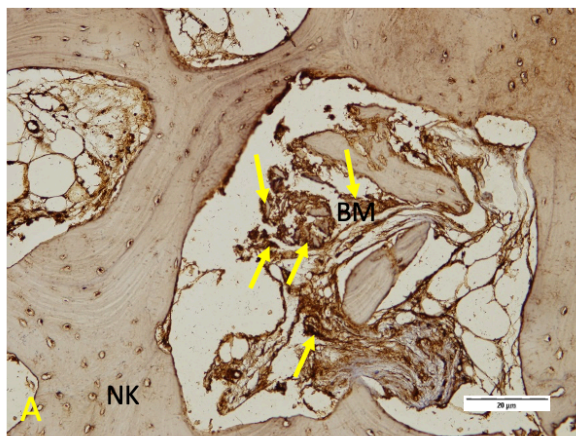


Slika 18: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova dekalciniranih uzoraka koštanog tkiva alveolarne kosti (povećanje 200x)–Dentin(A); Ksenogeni biomaterijal (B); Ksenogeni biomaterijal +ak (C).

Strelice pokazuju na imunopozitivitet koji je izražen u osteocitima te nešto manje u osteoblastima, njihovim prekursorima te pluripotentnim mezenhimskim stanicama. Vidljiva su mjesta novostvorene kosti (NK) oko biomaterijala (BM).

4.4.2 Imunohistokemijska analiza izražaja BMP -4

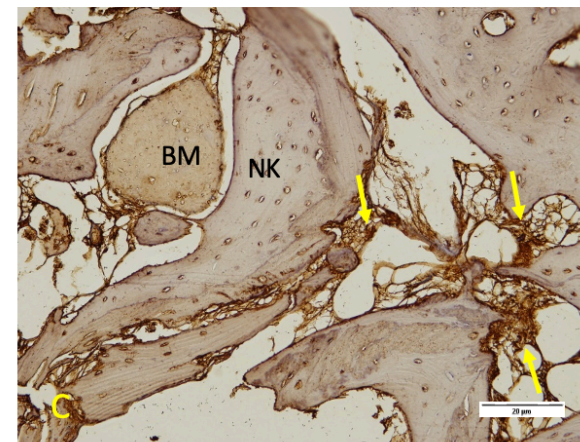
Autologni dentin



Ksenogeni biomaterijal



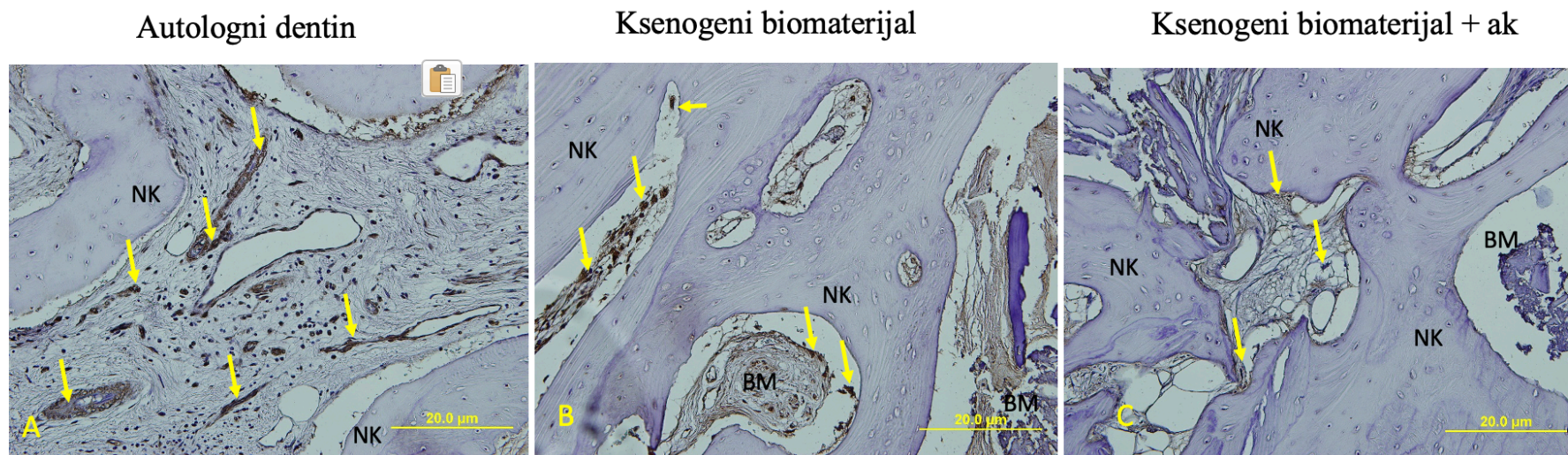
Ksenogeni biomaterijal + ak



Slika 19: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova dekalciniranih uzoraka koštanog tkiva alveolarne kosti (povećanje 200x) – Dentin(A); Ksenogeni biomaterijal (B); Ksenogeni biomaterijal +ak (C).

Strelice pokazuju ekspresiji BMP-4 koja je opažena u osteocitima koji su ukopani u novostvoreno koštano tkivo te u osteoblastima koji se nalaze na površini kosti. Vidljiva su mjesta novostvorene kosti (NK) oko biomaterijala (BM).

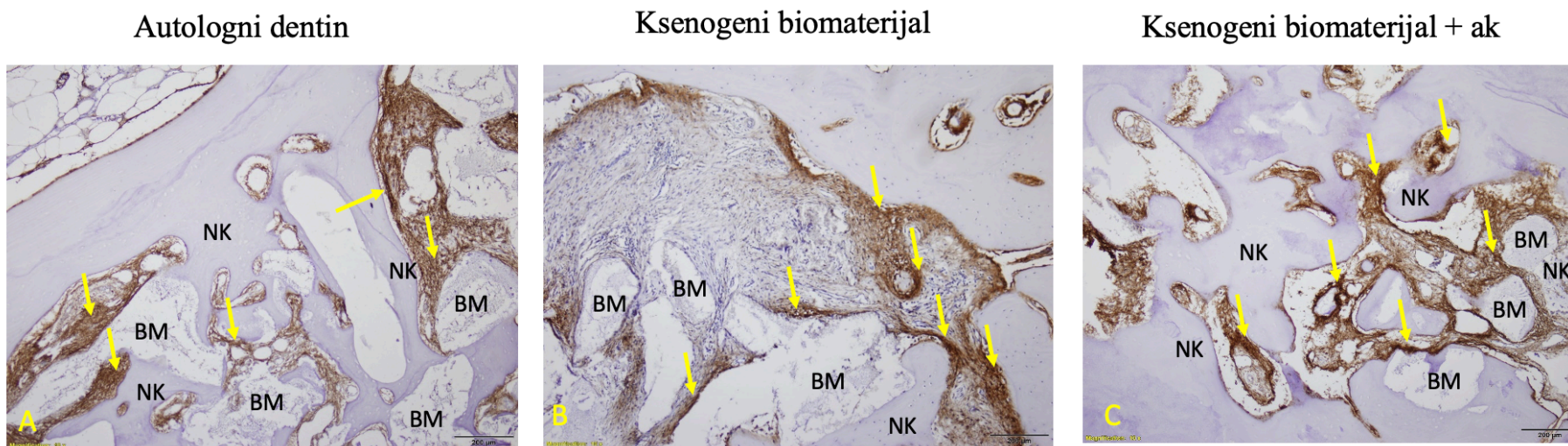
4.4.3 Imunohistokemijska analiza izražaja SMAD -1/5/8



Slika 20: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova dekalciniranih uzoraka koštanog tkiva alveolarne kosti (povećanje 200x) – Dentin(A); Ksenogeni biomaterijal (B); Ksenogeni biomaterijal +ak (C).

Strelice pokazuju SMAD 1/5/8 unutarstanične glasničke molekule koje su imunolokalizirane u mezenhimskim stanicama te osteoblastima i osteocitima. SMAD 1/5/8 je prisutan sporadično u vezivu te u oko krvnih žila. Vidljiva su mjesta novostvorene kosti (NK) oko biomaterijala (BM).

4.4.4 Imunohistokemijska analiza izražaja TNF- α

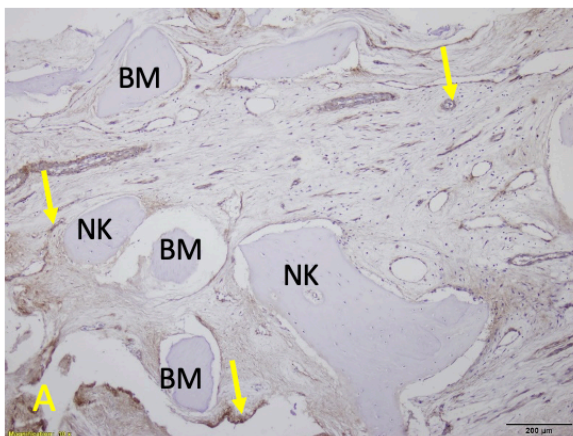


Slika 21: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova dekalciniranih uzoraka koštanog tkiva alveolarne kosti (povećanje 200x)– Dentin(A); Ksenogeni biomaterijal (B); Ksenogeni biomaterijal +ak (C).

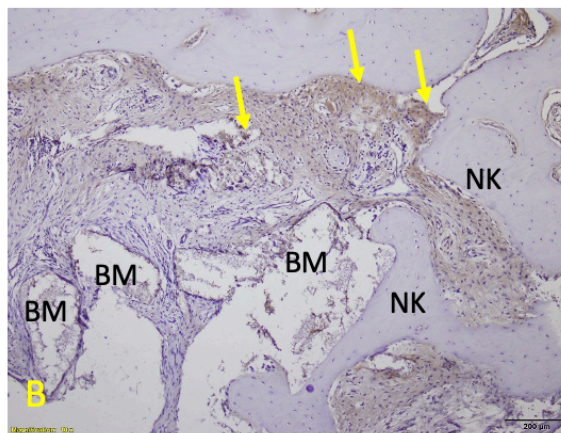
Strelice pokazuju ekspresija TNF- α koja je uočena u stanicama vezivnog tkiva. Jača ekspresija je vidljiva uz rubne površine čestica biomaterijala i novostvorene kosti što upućuje da se radi o ekspresiji na mjestima epitelno-mezenhimske tranzicije. Vidljiva su mjesta novostvorene kosti (NK) oko biomaterijala (BM).

4.4.5 Imunohistokemijska analiza izražaja VEGF

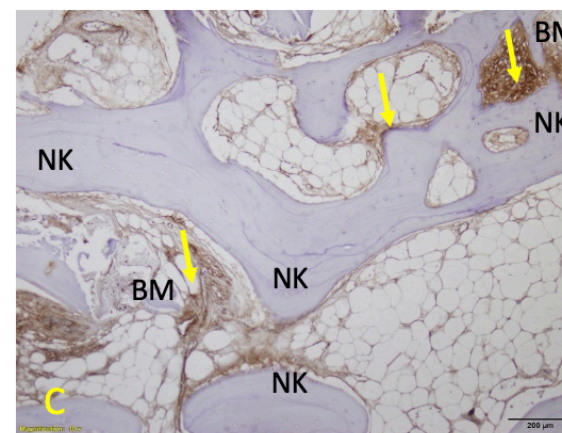
Autolni dentin



Ksenogeni biomaterijal



Ksenogeni biomaterijal + ak

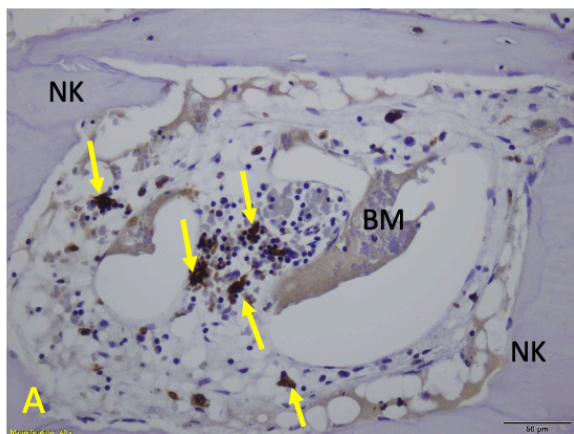


Slika 22: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova dekalciniranih uzoraka koštanog tkiva alveolarne kosti (povećanje 200x)– Dentin(A); Ksenogeni biomaterijal (B); Ksenogeni biomaterijal +ak (C).

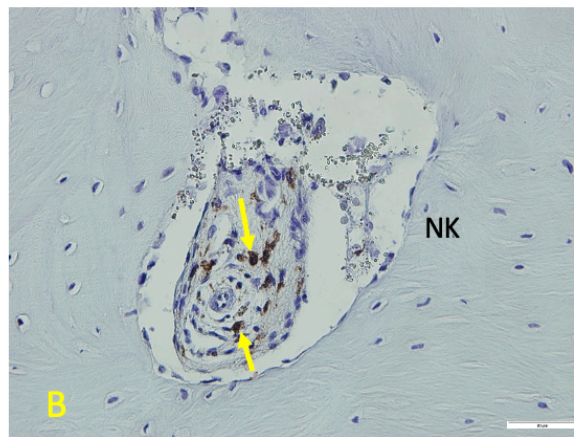
Strelice pokazuju ekspresiju VEGF-a koja je uočena u pluripotentnim mezenhimskim stanicama, na mjestima angiogeneze te na onim mjestima gdje krvne žile urastaju u čestice biomaterijala u razgradnji. Vidljiva su mjesta novostvorene kosti (NK) oko biomaterijala (BM).

4.4.6 Imunohistokemijska analiza izražaja HO - 1

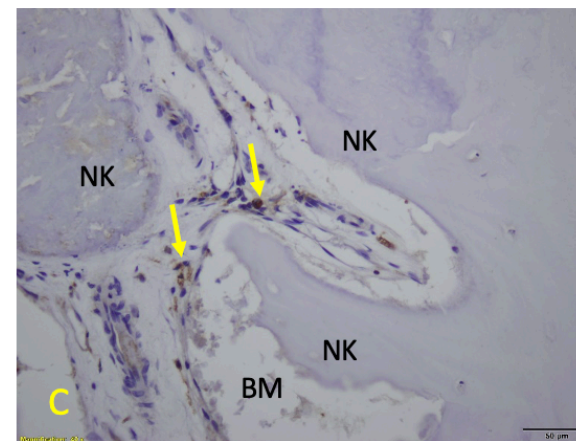
Autolni dentin



Ksenogeni biomaterijal



Ksenogeni biomaterijal + ak

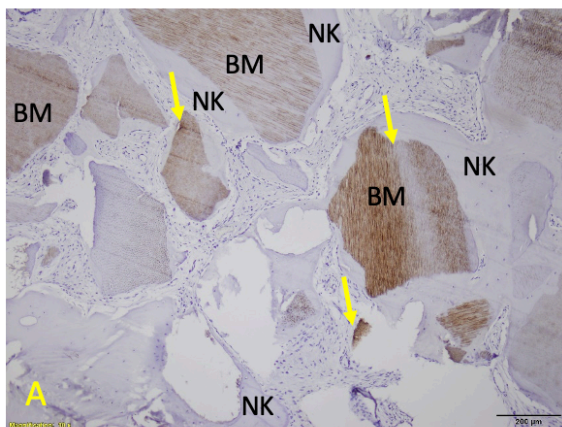


Slika 23: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova dekalciniranih uzoraka koštanog tkiva alveolarne kosti (povećanje 400x)– Dentin(A); Ksenogeni biomaterijal (B); Ksenogeni biomaterijal +ak (C).

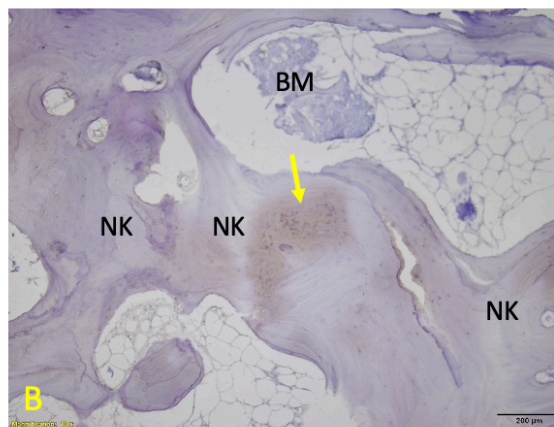
Strelice pokazuju da HO-1 je pozitivan u multinuklearnim orijaškim stanicama koje odgovaraju makrofazima u blizini čestica biomaterijala te u stanicama krvi. Vidljiva su mjesta novostvorene kosti (NK) oko biomaterijala (BM).

4.4.7 Imunohistokemijska analiza izražaja TGF β -1

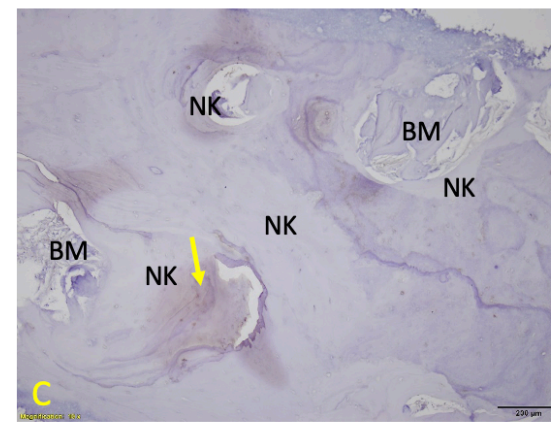
Autolni dentin



Ksenogeni biomaterijal



Ksenogeni biomaterijal + ak

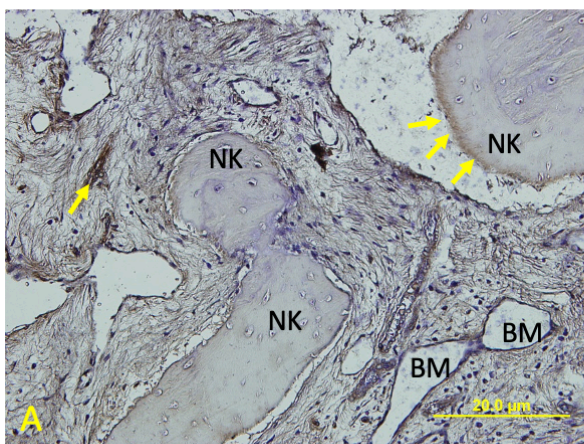


Slika 24: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova dekalciniranih uzoraka koštanog tkiva alveolarne kosti (povećanje 200x)– Dentin(A); Ksenogeni biomaterijal (B); Ksenogeni biomaterijal +ak (C).

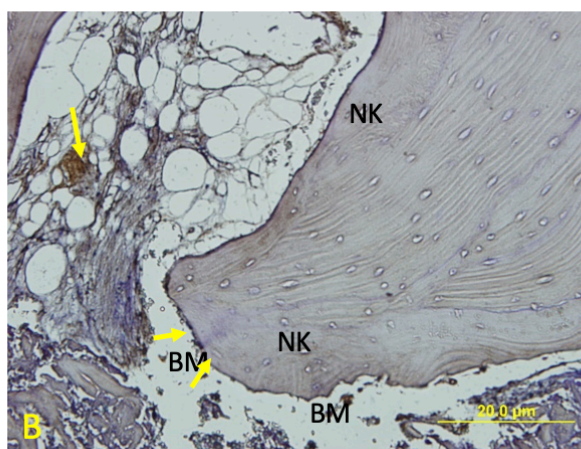
Strelice pokazuju na ekspresiju TGF- β . Uz ekspresiju koja je vidljiva u česticama dentina, TGF- β je sporadično imunopozitivan u osteocitima i osteoblastima novostvorene kosti. Vidljiva su mjesta novostvorene kosti (NK) oko biomaterijala (BM).

4.4.8 Imunohistokemijska analiza izražaja SMAD-2/3

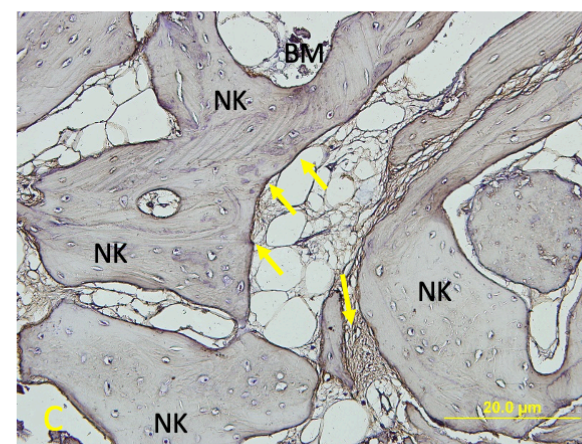
Autlogni dentin



Ksenogeni biomaterijal



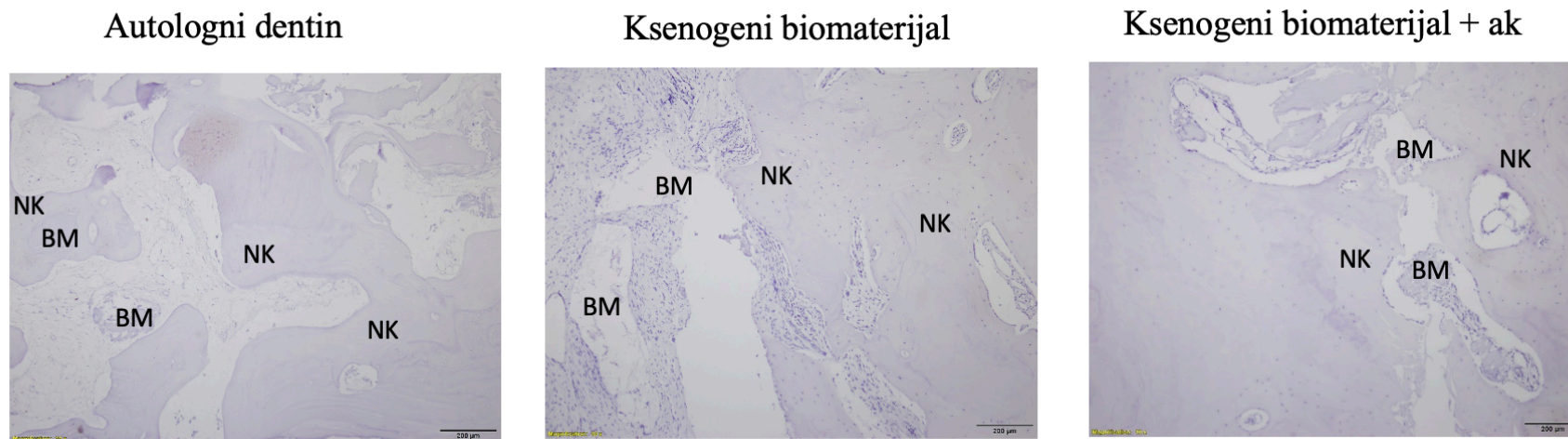
Ksenogeni biomaterijal + ak



Slika 25: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova dekalciniranih uzoraka koštanog tkiva alveolarne kosti (povećanje 200x)– Dentin(A); Ksenogeni biomaterijal (B); Ksenogeni biomaterijal +ak (C).

Stelice pokazuju na ekspresiju SMAD 2/3 koja je vidljiva u pluripotentnim mezenhimskim stanicama te u osteocitima i osteoblastima novostvorene kosti. Vidljiva su mjesta novostvorene kosti (NK) oko biomaterijala (BM).

4.4.9 Imunohistokemijska analiza izražaja COX-2



Slika 26: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova dekalciniranih uzoraka koštanog tkiva alveolarne kosti (povećanje 200x) – Dentin(A); Ksenogeni biomaterijal (B); Ksenogeni biomaterijal +ak (C).

Nisu vidljive imunopozitivne stanice. Vidljiva su mjesta novostvorene kosti (NK) oko biomaterijala (BM).

4.5 Intenzitet imunohistokemijske ekspresije

Intenzitet imunohistokemijske ekspresije prikazan je u tablicama u nastavku.

Tablica 4: Prikazane su vrijednosti intenziteta imunohistokemijske ekspresije TNF- α i BMP-4. Srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD).

Biomaterijal	TNF- α oko biomaterijala	BMP-4 oko biomaterijala
AD ¹	140,89 \pm 4,92	131,26 \pm 9,1
GK ²	152,65 \pm 3,78*	178,43 \pm 7,79*
GK+AK ³	149,96 \pm 6,64*	171,75 \pm 10,5*

¹Autologni dentin; ²goveđi koštani biomaterijal; ³goveđi koštani biomaterijal+autologna kost; one-way ANOVA*

Primjenom kolagene membrane nađene su statistički značajno veće vrijednosti intenziteta imunohistokemijskog obojenja TNF- α i BMP-4 u skupinama GK i GK+AK u odnosu na skupinu AD (P<0.01)*.

Tablica 5: Prikazane su vrijednosti intenziteta imunohistokemijske ekspresije VEGF-a i HO-1 e. Srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD).

Biomaterijal	VEGF oko biomaterijala	HO-1 oko biomaterijala
AD ¹	89,95 \pm 7,45	189,21 \pm 9,43*
GK ²	93,63 \pm 6,34	115,88 \pm 6,29
GK+AK ³	125,63 \pm 8,23*	130,49 \pm 8,12

¹Autologni dentin; ²goveđi koštani biomaterijal; ³goveđi koštani biomaterijal+autologna kost; one-way ANOVA*

Statistički značajno veći intenzitet imunohistokemijske ekspresije VEGF je nađen u GK+AK skupini u odnosu na AD i GK skupine (P<0.01)*. Statistički značajno veći intenzitet imunohistokemijske ekspresije HO-1 je nađen u AD skupini u odnosu na GK i GK+AK skupine (P<0.01)*.

Tablica 6: Prikazane su vrijednosti intenziteta imunohistokemijske ekspresije BMP-7 i TGF β -1. Prikazane su srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD).

Biomaterijal	BMP-7 oko biomaterijala	TGF- β 1 oko biomaterijala
AD ¹	142,48 \pm 7,35	85,34 \pm 4,32*
GK ²	153,61 \pm 10,23	51,38 \pm 6,98
GK+AK ³	139,89 \pm 9,73	60,13 \pm 2,54

¹Autologni dentin; ²goveđi koštani biomaterijal; ³goveđi koštani biomaterijal+autologna kost; one-way ANOVA*

Statistički značajno veći intenzitet imunohistokemijske ekspresije TGF- β 1 je nađen u AD skupini u odnosu na GK i GK+AK skupine (P<0.01)*.

Tablica 7: Prikazane su vrijednosti intenziteta imunohistokemijske ekspresije SMAD-1/5/8 i SMAD-2/3. Prikazane su srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD).

Biomaterijal	SMAD-1/5/8 oko biomaterijala	SMAD-2/3 oko biomaterijala
AD ¹	155,56 \pm 9,45*	137,33 \pm 9,57
GK ²	141,53 \pm 6,78	133,4 \pm 4,66*
GK+AK ³	121,82 \pm 7,46	128,38 \pm 2,48

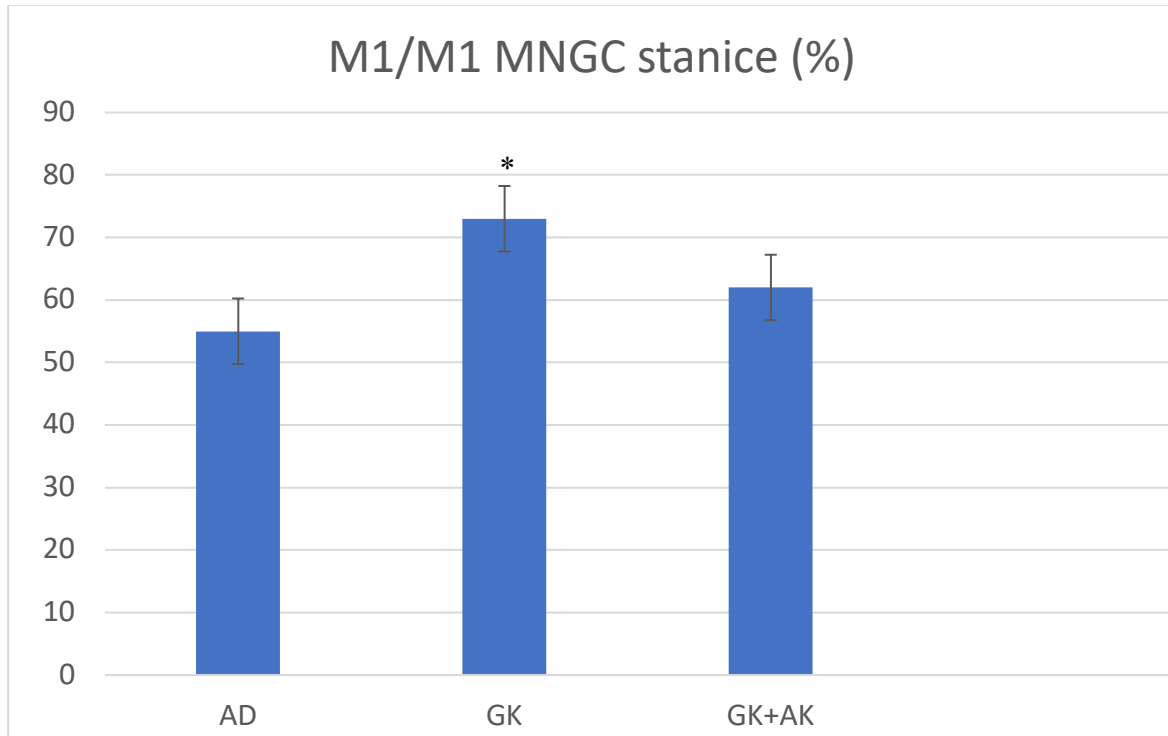
¹Autologni dentin; ²goveđi koštani biomaterijal; ³goveđi koštani biomaterijal+autologna kost; one-way ANOVA*

Nađen je statistički značajno veći intenzitet imunohistokemijske ekspresije SMAD-1/5/8 u skupini AD u odnosu na skupinu GK+AK (P<0.01)*.

4.6 Rezultati imunofluorescentnog obilježavanja

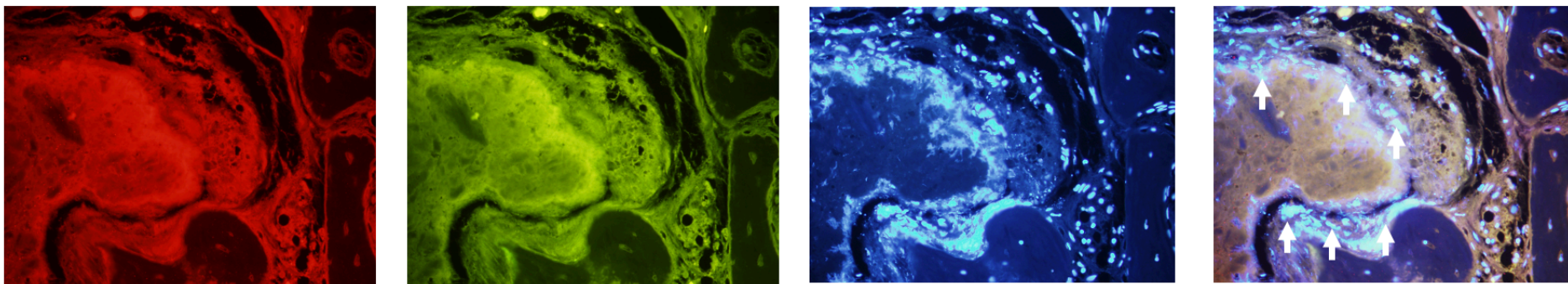
4.6.1 Rezultati imunofluorescentnog obilježavanja za M1 makrofage i M1 MNGC stanice

Rezultati za M1 makrofage i M1 MNGC stanice su izraženi kao postotak koji je dobiven nakon što je ukupan broj CD68/iNOS/DAPI podijeljen sa CD68.

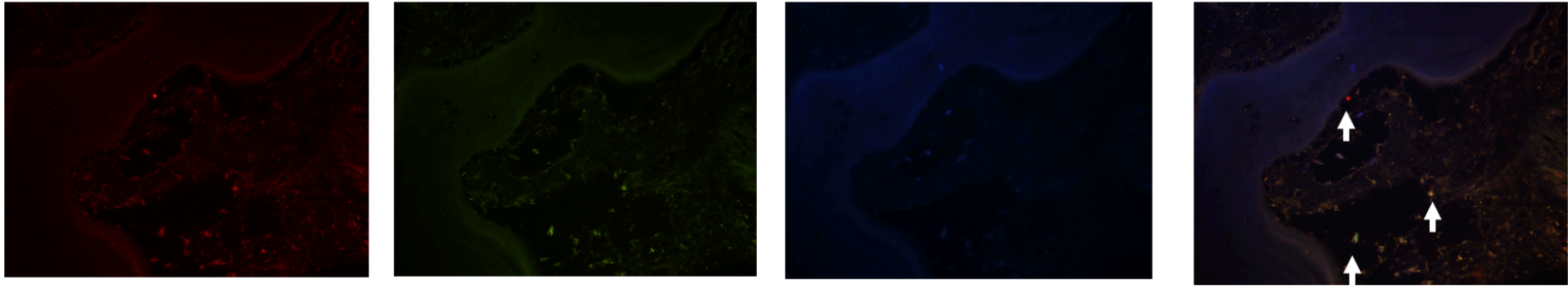


Graf 1. Prikaz postotka M1/M1MNGC staničnog fenotipa u skupinama: autologni dentin (AD); goveđi koštani biomaterijal (GK); goveđi koštani biomaterijal+autologna kost.(GK+AK), one-way ANOVA*

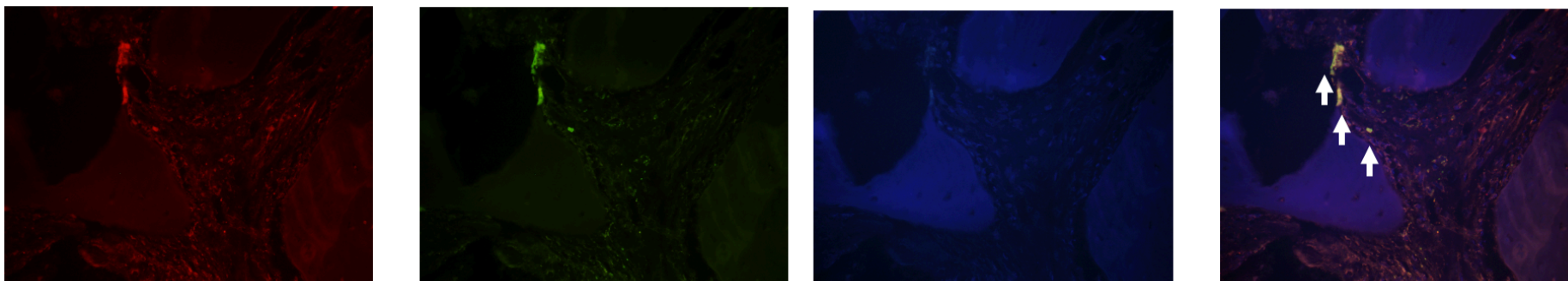
Nađen je najveći postotak M1/M1MNGC staničnog fenotipa u skupini goveđeg koštanog biomaterijala (GK), što je bilo statistički značajno više u odnosu na skupinu autologni dentin (AD), $P < 0,01^*$.



Slika 27: Reprezentativni prikaz dvostruke imunofluorescentne metode obilježavanja M1 makrofaga u skupini autologni dentin (ADG) Strelice(↑) prikazuju kolokalizaciju CD68 i iNOS markera za ekspresiju M1 staničnog fenotipa. Plavo -ukupan broj stanica; Plavo/zeleno-ukupan broj CD68; Plavo/zeleno/crveno – ukupan broj CD68/iNOS.



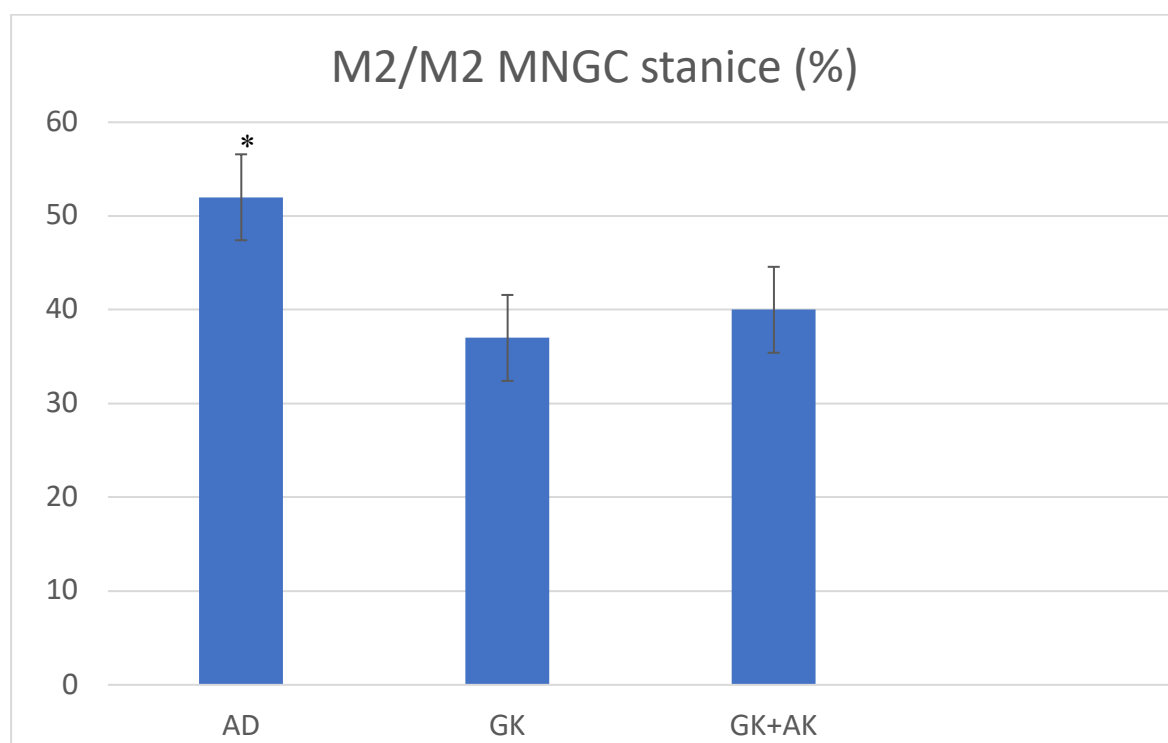
Slika 28: Reprezentativni prikaz dvostruke imunofluorescentne metode obilježavanja M1 makrofaga u skupini goveđeg koštanog biomaterijala Cerabone (BX). Strelice(↑) prikazuju kolokalizaciju CD68 i iNOS markera za ekspresiju M1 staničnog fenotipa. Plavo -ukupan broj stanica; Plavo/zeleno-ukupan broj CD68; Plavo/zeleno/crveno – ukupan broj CD68/iNOS.



Slika 29: Reprezentativni prikaz dvostruke imunofluorescentne metode obilježavanja M1 makrofaga u skupini goveđeg koštanog biomaterijala + autologna kost, Cerabone+ak (BX+AB). Strelice(↑) prikazuju kolokalizaciju CD68 i iNOS markera za ekspresiju M1 staničnog fenotipa. Plavo - ukupan broj stanica; Plavo/zeleno-ukupan broj CD68; Plavo/zeleno/crveno – ukupan broj CD68/iNOS.

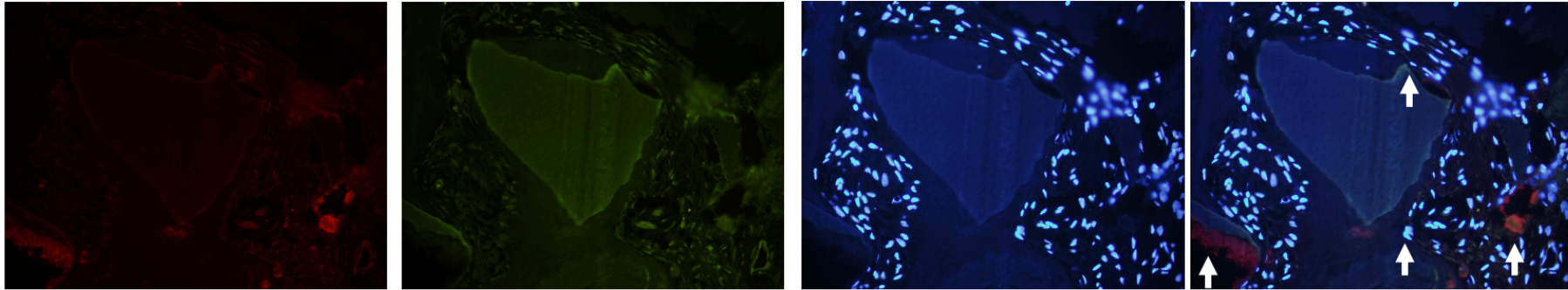
4.6.2 Rezultati imunofluorescentog obilježavanja za M2 makrofage i M2 MNGC stanice

Rezultati za M2 makrofage i M2 MNGC stanice su izraženi kao postotak koji je dobiven nakon što je ukupan broj CD68/CD206/DAPI podijeljen sa CD68.

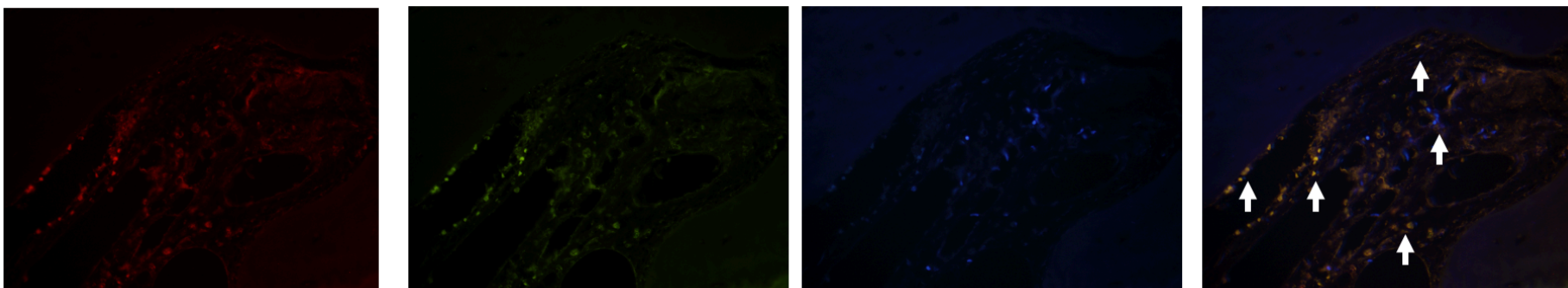


Graf 2: Prikaz postotka M2/M2MNGC staničnog fenotipa u skupinama: autologni dentin (AD); goveđi koštani biomaterijal (GK); goveđi koštani biomaterijal+autologna kost (GK+AK), one-way ANOVA*

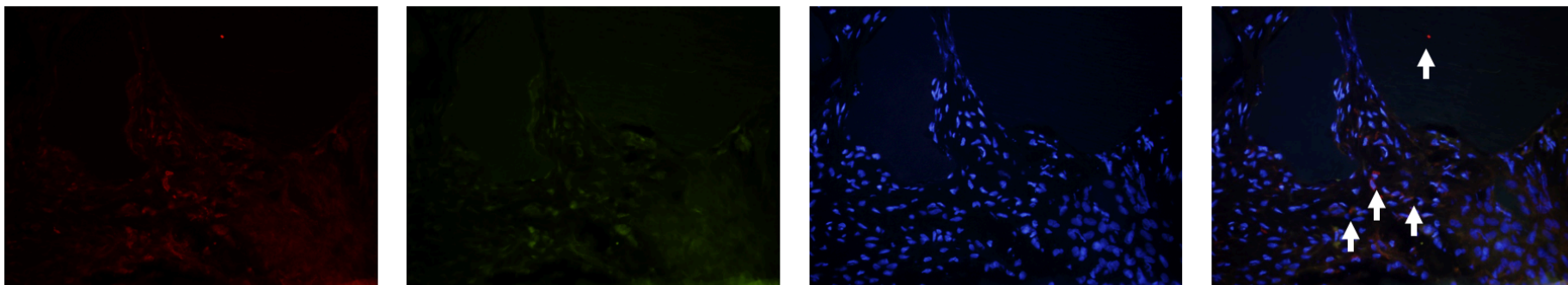
Nađen je najveći postotak M2/M2MNGC staničnog fenotipa u skupini autolognog dentina(AD), što je bilo statistički značajno više u odnosu na skupinu goveđeg koštanog biomaterijala (GK), $P < 0,01^*$.



Slika 30: Reprezentativni prikaz dvostruke imunofluorescentne metode obilježavanja M2 makrofaga u skupini autologni dentin (ADG). Strelice(↑) prikazuju kolokalizaciju CD68 i CD206 markera za ekspresiju M2 staničnog fenotipa. Plavo -ukupan broj stanica; Plavo/zeleno-ukupan broj CD68; Plavo/zeleno/crveno – ukupan broj CD68/CD206.



Slika 31: Reprezentativni prikaz dvostruke imunofluorescentne metode obilježavanja M2 makrofaga u skupini goveđi koštani biomaterijal Cerabone (BX). Strelice(↑) prikazuju kolokalizaciju CD68 i CD206 markera za ekspresiju M2 staničnog fenotipa. Plavo -ukupan broj stanica; Plavo/zeleno-ukupan broj CD68; Plavo/zeleno/crveno – ukupan broj CD68/CD206.



Slika 32: Reprezentativni prikaz dvostruke imunofluorescentne metode obilježavanja M2 makrofaga u skupini goveđi koštani biomaterijal +autologna kost, Cerabone+ak (BX+AB). Strelice(↑) prikazuju kolokalizaciju CD68 i CD206 markera za ekspresiju M2 staničnog fenotipa. Plavo -ukupan broj stanica; Plavo/zeleno-ukupan broj CD68; Plavo/zeleno/crveno – ukupan broj CD68/CD206.

5 RASPRAVA

Koštani defekti koji nastaju uslijed upalnih ili traumatskih promjena na alveolarnoj kosti predstavljaju klinički izazov prilikom ugradnje dentalnih implantata. U takvim kliničkim scenarijima koštana regeneracija nastoji se postići korištenjem zamjenskih koštanih materijala i membrana za vođenu regeneraciju kosti (VRK). Iako su znanstvena istraživanja donijela brojne napretke u pogledu razvoja kirurških tehnika za augmentaciju alveolarne kosti, kao i biomaterijala koji se pri tome koriste, još je uvijek teško u potpunosti oponašati fiziološki koštanu regeneraciju, što je i glavni cilj tkivnog inženjerstva. Razlog tomu jest složena biologija cijeljenja kosti, odnosno sposobnost koštanog samoobnavljanja, preoblikovanja i regeneracije [168]. Cilj doktorskog istraživanja bio je ispitati razlike u reparacijskom odgovoru koštanog tkiva šest mjeseci nakon augmentacije alveole tehnikom VRK. Pri tome koristila su se tri različita biomaterijala: autologni dentin (AD), goveđi ksenograft (GK) te mješavina GK i autologne kosti (GK + AK). Ispitivanje reparacijskog odgovora kosti na biomaterijal tijekom cijeljenja uključivalo je radiološku, kvalitativnu i kvantitativnu histološku, mikro-CT, imunohistokemijsku i imunofluorescencijsku analizu. Dobiveni rezultati daju uvid u biokompatibilnosti, osteokonduktivnosti, osteoinduktivnosti te biološku učinkovitosti korištenih biomaterijala. U nastavku rasprave rezultati doktorskog istraživanja uspoređuju se s prethodnim istraživanjima koja su se bavila sličnim temama, uz kritički osvrt na moguća objašnjenja uočenih promjena i njihove kliničke implikacije.

Ovisno o protokolu preparacije i stupnju mineralizacije, razlikuju se tri tipa AD-a: demineralizirani dentinski matriks (DDM), djelomično demineralizirani dentinski matriks (DDDM) i nedemineralizirani dentin (NDM) [169]. U ovom istraživanju korišten je protokol koji rezultira nastankom DDM. Ovaj protokol preparacije dentinskog grafta odabran je s obzirom na to da je DDM poznat po svojoj sposobnosti poticanja regeneracije koštanog tkiva zahvaljujući nepravilnoj površini i izloženim kolagenim vlaknima, što omogućuje poboljšanu adheziju osteoblasta i djelomično otpuštanje čimbenika rasta [170]. Ovi biološki učinci DDM-a mogu se objasniti zajedničkim embriološkim podrijetlom dentina i kosti – oba tkiva potječu iz stanica neuralnog grebena, dijeleći sličan kemijski sastav (organski, anorganski i udio vode), ali i ključna svojstva osteokondukcije i osteoindukcije. U mineraliziranom obliku, dentin sadrži hidroksiapatit niske kristalnosti u obliku kalcijevog fosfata, što olakšava njegovu razgradnju osteoklastima. Iako ne posjeduje osteogena svojstva kao AK, prednost autolognog dentina u kliničkom kontekstu leži u biokompatibilnosti, odsustvu imunogenosti te izbjegavanju morbiditeta povezanog s vađenjem autogene kosti [169–172]. Iako demineralizacija dentina

omogućuje oslobađanje čimbenika rasta i izlaganje kolagenske mreže što povećava regeneracijski potencijal, ovaj postupak također može dovesti do djelomičnog gubitka osteokonduktivnosti i oštećenja bioaktivnih molekula [173]. S druge strane, mineralizirani oblik dentina zadržava i organske i anorganske komponente te se može pripremiti pre- ili perioperativno od strane obučenog kliničara, čime se bivši "neupotrebljivi" zub pretvara u isplativu i dostupnu alternativu koštanim nadomjescima. U ovom istraživanju korišten je komercijalno dostupan protokol za preparaciju i dekontaminaciju dentinskih čestica, u skladu s preporukama proizvođača. Iako se navedeni protokol već koristi u literaturi [174], učinci korištenih kemikalija na mikrostrukturu i biološku aktivnost dentinskog matriksa još nisu u potpunosti razjašnjeni, što otvara prostor za daljnja istraživanja. Dodatna varijabilnost u pristupu preparaciji (mineralizirani vs. demineralizirani oblici) i primjeni ADG-a pridonosi metodološkoj heterogenosti dostupne literature. Upravo zato, s ciljem objektivne usporedbe dobivenih rezultata, fokus ove rasprave stavljen je na radove u kojima je korišten demineralizirani dentinski matriks (DDM) kao biomaterijal u postupcima vođene regeneracije kosti.

U usporedbi s konvencionalnim radiološkim tehnikama, CBCT pruža trodimenzionalni prikaz struktura alveolarnog grebena i omogućuje preciznija mjerenja promjena dimenzije tijekom cijeljenja [175]. Zahvaljujući tim karakteristikama, CBCT se pokazao ključnim alatom ne samo u dijagnostici i planiranju, nego i u evaluaciji regeneracijskog potencijala biomaterijala tijekom praćenja cijeljenja. Radiološkom analizom pomoću CBCT-a utvrđena je promjena bukolingvalne širine alveolarnog grebena prije i nakon zahvata VRK s tri različita biomaterijala. U sve tri ispitivane skupine uočeno je smanjenje bukolingvalne širine alveolarnog grebena tijekom perioda cijeljenja, što ukazuje na to da niti jedan od ispitivanih biomaterijala nije u potpunosti spriječio postekstrakcijsku resorpciju alveolarnog grebena. Najmanji gubitak dimenzije zabilježen je u skupini AD ($-0,83 \pm 0,13$ mm), dok je najveći gubitak zabilježen u skupini GK + AK ($-1,30 \pm 0,48$ mm), međutim, statistički značajne razlike među skupinama nisu utvrđene. Važno je naglasiti da je gubitak dimenzije alveolarnog grebena očekivan i da je dio fiziološkog procesa cijeljenja nakon ekstrakcije zuba [176]. Međutim, činjenica da su razlike u gubitku bukolingvalne dimenzije među skupinama bile male i statistički neznačajne sugerira da sva tri biomaterijala imaju podjednak učinak na očuvanje dimenzija grebena u toku cijeljenja.

Prethodne studije u kojima se procjenjuje učinkovitost AD u očuvanju dimenzija alveolarnog grebena nakon ekstrakcije pokazuju visoku metodološku heterogenost, stoga je objektivna usporedba rezultata dobivenih u ovom istraživanju vrlo teška. Primjerice, u studiji Cinar i

suradnika [177] provedena je retrospektivna CBCT analiza kod 110 pacijenata koji su podvrgnuti imedijatnoj implantaciji u estetskoj zoni gornje čeljusti uz istovremenu augmentaciju koštanog defekta AD ili GK (Bio-Oss®). Nakon godinu dana praćenja, AD pokazao je usporedive, a u jednoj mjerenu i bolje rezultate u pogledu očuvanja bukalne koštane stijenke. U njihovoj analizi nije bilo značajnih razlika u tzv. rezultatu ružičaste estetike kojom se procjenjuje zdravlje i izgled periimplantatnih tkiva (engl. *Pink Esthetic Score, PES*). Također, nije bilo statistički značajne razlike u pojavi protetskih komplikacija, čime je potvrđena klinička usporedivost AD-a s ksenogenim biomaterijalima. Studija Li i suradnika [178] usporedila je kliničku učinkovitost DDM-a pripremljenog *chairside* metodom iz ekstrahiranog zuba i GK. Indikacija je bila VRK nakon imedijatne implatancije zuba kod pacijenata s uznapredovalim parodontitisom. Tijekom 18-mjesečnog praćenja cijeljenja, nije utvrđena statistički značajna razlika između skupina u pogledu stabilnosti implantata i marginalne resorpcije kosti ispitivane radiološkim metodama, što ukazuje na podjednaku kliničku učinkovitost DDM-a i GK. S druge strane, Pohl i suradnici [179] retrospektivno su analizirali CBCT snimke 58 pacijenata kod kojih su alveole odmah nakon ekstrakcije augmentirane kombinacijom DDM i trombocitima bogatim fibrinom (engl. *platelet-rich fibrin, PRF*). Promjene širine grebena 1 mm, 3 mm i 5 mm ispod marginalnog ruba alveole iznosile su $-1,38 \pm 1,24$ mm, $-0,82 \pm 1,13$ mm i $-0,43 \pm 0,89$ mm, dok je visina bukalne kosti u prosjeku porasla. U našem istraživanju širina alveolarnog grebena mjerena je na najistaknutijim točkama bukalne i oralne kosti, što ograničava izravnu usporedbu rezultata. Ipak, zabilježen je najmanji gubitak bukolingvalne dimenzije upravo u skupini s AD-om ($-0,83 \pm 0,13$ mm), što je u skladu s nalazima prethodnih studija. Stoga, iako metodološke razlike ograničavaju izravnu usporedbu navedenih studija s doktorskim istaživanjem, ipak, one jasno upućuju na stabilnost i reparacijski potencijal autolognog dentina u različitim kliničkim protokolima.

Histomorfometrijskom analizom uzoraka kosti dobivenih šest mjeseci nakon augmentacije utvrđeno je da je najveći udio novostvorene kosti zabilježen u skupini AD ($71,35 \pm 9,15\%$), dok su nešto niže vrijednosti utvrđene u skupinama GK+AK ($68,89 \pm 10,43\%$) i GK ($66,85 \pm 11,31\%$), ali bez statistički značajne razlike. Što se tiče prisutnosti rezidualnog biomaterijala, najviši postotak pronađen je u skupini GK ($17,14 \pm 12,31\%$), dok je značajno manji udio zabilježen u skupini AD ($11,84 \pm 9,31\%$), pri čemu je razlika bila statistički značajna ($P < 0,01$). Ova razlika ukazuje na bržu i učinkovitiju razgradnju čestica dentina u usporedbi s ksenograftom. Udio mekih tkiva bio je sličan među skupinama, bez statistički značajne razlike. Nalazi dokorskog istraživanja usporedivi su s rezultatima Mazor i suradnika [180], koji su analizirali dinamiku cijeljenja nakon očuvanja alveolarnog grebena tehnikom VRK pomoću

AD i izvijestili o prosječno 63% novostvorene kosti i 25% rezidualnog dentina sedam mjeseci nakon zahvata. Njihov nalaz potvrđuje dobar osteokonduktivni i biološki potencijal ovog materijala. Također, Pang i suradnici [181] usporedili su AD i GK u augmentaciji alveolarnog grebena te histomorfometrijski pronašli sličan udio novostvorene kosti (AD: $31,24 \pm 13,87\%$; GK: $35,00 \pm 19,33\%$), bez statistički značajne razlike. Iako je udio novostvorene kosti u navedenoj studiji bio niži u odnosu na rezultate našeg istraživanja, razliku je moguće objasniti različitim kliničkom kontekstu. Naime, u doktorskom istraživanju analizirane su ekstrakcijske alveole s očuvanim koštanim zidovima i bez prisutnih defekata, što omogućava povoljnije uvjete za regeneraciju i općenito stabilizaciju biomaterijala za augmentaciju. S druge strane, u navedenoj studiji autori su pratili cijeljenje defektata s minimalnim gubitkom od ≥ 4 mm vertikalne dimenzije u više od jedne stijenke, što znači da su kod takvih alveola znatnije otežani uvjeti za koštanu regeneraciju. Unatoč tim razlikama, udjeli novostvorene kosti potvrđuju zadovoljavajući regeneracijski potencijal AD-a i GK-a, što je u skladu s našim nalazima o sličnim histomorfometrijskim ishodima između skupina. Ovi podaci dodatno podupiru pretpostavku da AD može biti klinički usporediva alternativa ksenogenim biomaterijalima u kontekstu vođene regeneracije kosti. Nadalje, Minetti i sur. [182] u retrospektivnoj analizi 178 kliničkih slučajeva očuvanja alveole izvijestili su o višem udjelu vitalne kosti u mandibuli ($40,59 \pm 19,90\%$) u odnosu na maksilu ($29,70 \pm 17,68\%$) te vrlo niskom udjelu rezidualnog dentina ($7,95\%$ u mandibuli i $6,75\%$ u maksili). Iako su vrijednosti rezidualnog biomaterijala niže u odnosu na nalaze dokorskog istraživanja, rezultati potvrđuju da DDM učinkovito potiče formiranje vitalne kosti, uz minimalnu količinu rezidualnog biomaterijala. Različiti postupci pripreme preparata AD u doktorskom istraživanju i navedenoj studiji mogući su razlozi manjeg postotka rezidualnog biomaterijala. Zanimljivo, ista prethodno spomenuta grupa autora [183] također uspoređivali AD samostalno i u kombinaciji s GK te su pokazali da je korištenje AD bez dodatka GK rezultiralo znatno većim udjelom novostvorene kosti ($+85,29\%$) i manjim udjelom rezidualnog biomaterijala ($-83,59\%$). Autori ovaj nalaz tumače mogućim interferirajućim učinkom ksenogenog biomaterijala na biološki potencijal AD, osobito u kontekstu njegove prirodne remodelacije i integracije u novo koštano tkivo. Međutim, za potvrdu takve hipoteze potrebna su daljnja istraživanja koja bi detaljnije objasnila mehanizme međudjelovanja i sposobnosti koštane regeneracije kada se kombiniraju različiti tipovi biomaterijala za koštanu augmentaciju.

Kvalitativna histološka analiza u ovom istraživanju pokazala je da su novostvorena kost i čestice rezidualnog biomaterijala u bliskom kontaktu, bez znakova upalne reakcije ili odgovora na strano tijelo, što potvrđuje biokompatibilnost primijenjenih biomaterijala, osteokonduktivna

svojstva i uspješnu integraciju s okolnim koštanim tkivom. Iako su i AD i GK bili djelomično prisutni i nakon šest mjeseci, što potvrđuje njihovu sporu resorpciju, to je ujedno i dokaz njihove strukturne stabilnosti tijekom procesa regeneracije.

Takvi nalazi u skladu su s ranije provedenim animalnim istraživanjima. Na modelu kunića, histomorfometrijska evaluacija bioptata nakon augmentacije DDM-om pokazala je značajno veću količinu novonastale kosti u usporedbi s kontrolnim defektima, uz minimalnu upalnu reakciju koja nije ometala regeneraciju. Ugrađene čestice dentina resorbirale su se tijekom remodelacije, a proces cijeljenja bio je ubrzan u grupi tretiranoj DDM-om u odnosu na kontrolnu skupinu [184]. U eksperimentu na kranijumu mini-svinja, materijal dobiven od autogenih ekstrahiranih zuba pokazao je formiranje novostvorene kosti oko čestica već nakon 4 tjedna cijeljenja. Uz to, za razliku od kontrolne skupine, u skupini mini-svinja gdje se koristio AD od 4 tjedna cijeljenja potvrđena je i ekspresija osteonektina, važnog glikoproteina koji je pokazatelj aktivne osteogeneze i koji je bio prisutan sve do 12 tjedana nakon augmentacije [185]. Slični rezultati zabilježeni su i na modelu sinus-lifta izvedenog također na mini-svinjama. Navedeno istraživanje pokazalo je da je udio novostvorene kosti bio veći kod AD-a u odnosu na sintetski hidroksiapatit (HA), osobito u središnjim dijelovima defekta, što ukazuje na aktivno prodiranje novog tkiva unutar zamjenskog koštanog materijala [186]. Nadalje, na modelu štakora, DDM humanog porijekla pokazala je izraženu osteoinduktivnost. Novostvorena kost bila je vidljiva već nakon 14 dana, a prisutnost koštanih morfogenetskim proteina, osobito BMP-2 i BMP-4 u osteoblastima ukazuje na aktivaciju koštanih prekursora [187]. Također, u sličnom istraživanju s istim materijalom, zabilježena je pojačana ekspresija VEGF-a, što se objašnjava povećanom angiogenezom i ubrzanom osteogenezom, potvrđujući potencijal AD-a da djeluje ne samo kao osteokonduktivni već i kao osteoinduktivni materijal [188].

Slična kvalitativna histološka opažanja potvrđena su i u studijama provedenim na ljudima. U istraživanju Pohl i suradnika [179] u kojem se kao augmentacijski materijal koristio AD, potvrđena je integracija dentinskih čestica i novonastale kosti, a aktivnost osteoblasta dodatno je potvrđena imunopozitivnošću transkripcijskog čimbenika Osterix. U usporednoj kvalitativnoj histološkoj analizi AD i GK, oba materijala pokazala su očuvanu tkivnu strukturu i integraciju zamjenskih koštanih materijala u novostvorenu kost, bez znakova upalne reakcije [181]. Navedeni histološki nalazi potvrđuju osteokonduktivni potencijal obje skupine. Takvi rezultati dodatno podupiru nalaze iz doktorskog istraživanja, osobito u kontekstu biokompatibilnosti, osteokonduktivnosti i učinkovitosti AD u VRK.

Mikroračunalna tomografija (mikro-CT) pokazala se kao vrlo korisna metoda za ispitivanje koštanih materijala jer omogućuje detaljnu trodimenzionalnu analizu njihove strukture. Ovom

se tehnikom može mjeriti poroznost, površina, veličina i raspored pora te debljina strukture, što daje precizne podatke o stvaranju nove kosti [189]. Rezultati mikro-CT analize u doktorskom istraživanju pokazali su da je udio novostvorene kosti u skupini AD iznosio $20,15 \pm 5,1$ %, dok je u skupinama s GK i njegovom kombinacijom s AK iznosio $18,96 \pm 4,51$ %, odnosno $19,72 \pm 4,13$ %. Rezultati dokorskog istraživanja u pogledu udjela novostvorene kosti usporedivi su s nalazima prethodnih pretkliničkih i kliničkih studija koje su koristile mikro-CT tehniku za kvantifikaciju regeneracije.

Pretklinička istraživanja iznimno su korisna za praćenje dinamike i utjecaja biomaterijala na događanja u ranoj fazi koštanog cijeljenja. U recentnoj studiji na štakorima mikro-CT analiza pokazala je da skupina tretirana AD postiže najveći volumen nove kosti i najmanji udio rezidualnog biomaterijala već na 30. dan cijeljenja u usporedbi s ostalim skupinama [190]. Analizom dinamike cijeljenja uočeno je da je najveći porast kosti u AD skupini bio između 15. i 21. dana, što ukazuje da se u tom razdoblju odvija intenzivno formiranje i remodelacija kosti. Ovakvi rezultati mogu se objasniti biološkim svojstvima AD-a, koji osim osteokonduktivnog djelovanja pokazuje i osteoinduktivni potencijal [191]. Naime, AD sadrži koštane morfo-genetske proteine koji izravno potiču diferencijaciju stanica i stvaranje novog koštanog tkiva. Upravo zbog toga AD pokazuje sličnosti s nativnom kosti, kako u pogledu organskog sastava (kolagen i proteini), tako i u pogledu anorganske komponente (mineralni dio) [173]. Dodatnu potvrdu pretkliničkim animalnim studijama daju i istraživanja na zečjem kalvarijalnom modelu te psima. Wadhwa i suradnici [192] pokazali su da i praškasti i blok-oblik dentinskog grafta, u kombinaciji s BMP-2, stimuliraju diferencijaciju mezenhimalnih stanica i endohondralnu osifikaciju, pri čemu je praškasti oblik pokazao superiorniji potencijal kao nosač za BMP-2. Mikro-CT analiza je pokazala značajan porast volumena novostvorene kosti u skupini s praškastim dentinskim graftom nakon osam tjedana cijeljenja ($13,71 \text{ mm}^3$) u usporedbi s blok-oblikom i sintetičkim graftom. Slično tome, Calvo-Guirado i suradnici [193] u studiji na novozelandskim kunićima izvijestili su da sterilizirane ljudske čestice zuba značajno potiču stvaranje nove kosti i kortikalno zatvaranje defekata u usporedbi s beta trikalcij fosfatnim (engl. beta-tricalcium phosphate, BTCP) biomaterijalom i praznim defektima, dok je histološka analiza pokazala najmanji udio vezivnog tkiva upravo u skupini s česticama zuba. U drugom istraživanju iste skupine autora, provedenom na psima, mikro-CT analiza potvrdila je da čestice dentina rezultiraju uglavnom formiranjem kosti srednje gustoće (D3 tipa), što govori u prilog povoljnom obrascu koštanog cijeljenja opisnog i u prethodno spomenutim studijama s AD [194]. Rezultati dokorskog istraživanja slični su s ovim nalazima jer također potvrđuju da AD pokazuje usporedivu učinkovitost s GK. Iako su u doktorskom istraživanju analizirane

jednostavne postekstrakcijske alveole s očuvanim koštanim zidovima, dok su u navedenim životinjskim modelima praćeni kritični defekti (engl. *critical-size defects*), opisana histomorfometrijska i mikro-CT svojstva podupiru zaključak da AD djeluje kao osteoinduktivan, ostekonduktivan i biološki kompatibilan materijal za regeneraciju kosti. Posebno je važno naglasiti da se učinak AD temelji ne samo na njegovim osteokonduktivnim, već i osteoinduktivnim svojstvima, čime se dodatno razlikuje od isključivo osteokonduktivnih materijala poput GK-a [195].

Kliničkih humanih studija koje potvrđuju učinkovitost AD kao koštanog nadomjestka evaluiranog mikro-CT analizom jako je malo i doktorsko istraživanje u tom pogledu je metodološki novina. Jun i suradnici [196] u prospektivnom istraživanju uspoređivali su AD s GK pri augmentaciji dna maksilarnog sinusa te nisu pronašli statistički značajne razlike između skupina u volumetrijskim (ukupni volumen kosti 64,98 % za AD naspram 77,06 % za GK; udio novostvorene kosti 37,91 % za AD naspram 41,93 % za GK), niti u parametrima gustoće. Jedina značajna razlika zabilježena je u debljini trabekula, koja je bila veća u skupini AD (0,08 μm) u odnosu na GK (0,07 μm ; $p = 0,006$). Slično tome, Kim i suradnici izvijestili su o 45,4 % novostvorene kosti i ukupnom volumenu od 76,45 % nakon devet mjeseci, također pri augmentaciji dna maksilarnog sinusa s AD, uz dobru integraciju čestica biomaterijala u novonastalo koštano tkivo. Rezultati dokorskog istraživanja, u kojima je mikro-CT analiza pokazala $20,15 \pm 5,1$ % novostvorene kosti nakon šest mjeseci cijeljenja u skupini AD, kvantitativno su niži, međutim, ovakvi rezultati vjerojatno su odraz različite kirurške tehnika, samog trajanja cijeljenja i lokalnih anatomskih uvjeta (dno maksilarnog sinusa vs. alveola).

Važno je i osvrnuti se na to da su rezultati mikro-CT i histomorfometrijske analize pokazali značajno viši udio rezidualnog biomaterijala u skupini GK u odnosu na AD. Ovakav nalaz može se objasniti različitim biološkim svojstvima te različitim obrascima i brzinom resorpcije ova dva biomaterijala. GK izrađen postupkom visokotemperaturne obrade, posjeduje izrazitu strukturnu stabilnost i otpornost na enzimsku razgradnju, što rezultira njegovom sporijom resorpcijom i čvrstom integracijom s koštanim defektom [197]. Ta se karakteristika često ističe kao prednost u pogledu dugoročne volumetrijske stabilnosti, ali istovremeno znači da dio biomaterijala ostaje prisutan i nakon završetka perioda cijeljenja, što je potvrđeno i u provedenoj kvalitativnoj histološkoj analizi. S druge strane, AD pokazuje veću biološku kompatibilnost s nativnim koštanim tkivom i podložniji je enzimskim procesima remodelacije. Njegov sastav, koji uključuje i organske (kolagen, proteini) i anorganske komponente slične kosti, omogućuje postupnu, ali bržu resorpciju te zamjenu novostvorenom kosti [183].

U istraživanju je provedena također i imunohistokemijska analiza markera kojima se prati koštano cijeljenje. Analizirani su ključni signalni putevi uključeni u osteogenezu, angiogenezu i upalni odgovor, a markere se može grupirati prema njihovim međusobno povezanim funkcijama. Tako su u jednoj skupini analizirani osteogeni čimbenici BMP-4 i BMP-7 [198], u drugoj SMAD-1/5/8 i SMAD-2/3 koji predstavljaju unutarstanične prijenosnike signala BMP- i TGF- β -putova [199], dok su TNF- α , VEGF i HO-1 obuhvatili aspekte upale, epitelno-mezenhimske interakcije i angiogeneze [200]. Ovakav pristup omogućio je da se rezultati prikažu pregledno i da se promatraju različiti obrasci ekspresije biomolekula ovisno o tipu biomaterijala, što pridonosi boljem razumijevanju njihove osteokonduktivne i osteoinduktivne uloge. U kvalitativnoj analizi potvrđena je prisutnost svih navedenih markera, dok je kvantitativna analiza intenziteta imunohistokemijskog obojenja omogućila usporedbu među skupinama te otkrivanje specifičnih razlika u aktivaciji signalnih putova.

U doktorskom istraživanju zabilježena je značajno viša ekspresija TNF- α u skupinama GK i GK+AK u odnosu na AD ($p < 0,01$). Ovaj nalaz upućuje na jači upalni odgovor na ksenogeni biomaterijal, što se može objasniti imunološkim prepoznavanjem stranih proteinskih i mineralnih komponenti iz biomaterijala koji je porijekla od životinje. Međutim, takav pojačani upalni signal ne znači nužno štetu jer poznato je da je TNF- α ključan kao medijator u ranim fazama cijeljenja kosti jer potiče regrutaciju progenitornih stanica i diferencijaciju preosteoblasta [201,202]. TNF- α , zajedno s RANKL-om, sudjeluje i u remodelaciji kosti, a njegova ekspresija pokazuje povezanost s dinamikom koštanog metabolizma. Naime, TNF- α može neizravno potaknuti diferencijaciju osteoklasta, samostalno ili putem RANK signalnog puta [203,204]. U uvjetima koštane homeostaze, resorpcija kosti nužan je preduvjet za formiranje nove kosti. Sličan obrazac zabilježen je i za BMP-4, čija je ekspresija bila značajno viša u skupinama GK i GK+AK u odnosu na AD ($p < 0,01$). BMP-4 pripada TGF- β obitelji i izravno potiče osteoblastnu diferencijaciju te stvaranje novog koštanog matriksa. Stoga se njegova povišena razina može se tumačiti kao dio adaptivnog odgovora organizma na prisutnost ksenogenog materijala [205–207]. Stoga, jači upalni signal detektiran imunopozitivnošću TNF- α vrlo je vjerojatno povezan s pojačanim osteoinduktivnim signalom (BMP-4), čime se osigurava da proces remodelacije napreduje unatoč inicijalno izraženijem imunološkom odgovoru. Važno je naglasiti da unatoč ovim razlikama u intenzitetu imunohistokemijskog obojenja, udio novostvorene kosti utvrđen kvantitativnom histomorfometrijom nije pokazao statistički značajne razlike između skupina. To sugerira da veća ekspresija TNF- α i BMP-4 u skupinama s GK i GK+AK ne rezultira boljim ili lošijim kvantitativnim ishodom regeneracije, već reflektira različite biološke odgovore kojima organizam reagira na pojedini biomaterijal.

Nakon analize TNF- α i BMP-4, u našem istraživanju dodatno su grupirani markeri TNF- α , VEGF i HO-1 jer zajedno odražavaju međusobno povezane procese upalne aktivacije i angiogeneze. Rezultati našeg istraživanja pokazali su da je TNF- α bio značajno viši u skupinama GK i GK+AK u odnosu na AD ($p < 0,01$), što potvrđuje konzistentnost nalaza o jačem upalnom odgovoru ksenogenih materijala. Istodobno, VEGF je pokazao najveću ekspresiju u skupini GK+AK ($p < 0,01$), što je vrlo vjerojatno povezano s prisutnošću autogene kosti, koja sadržava faktore rasta i žive stanice te time jače djeluje na poticanje angiogeneze. Suprotno tome, AD je pokazao značajno višu ekspresiju HO-1 u odnosu na obje skupine s ksenogenim materijalom ($p < 0,01$). HO-1 je enzim koji ima ključnu ulogu u koštanoj homeostazi jer potiče diferencijaciju osteoblasta, istodobno inhibira osteoklastnu aktivnost te djeluje antioksidativno i protuupalno putem svojih metabolita [208,209]. Time HO-1 pridonosi stvaranju mikrookoliša koji pogoduje osteogenezi i zaštiti novostvorene kosti od oksidativnog stresa i prekomjerne upale. Viša ekspresija HO-1 u skupini AD stoga sugerira da AD ne djeluje samo kao osteokonduktivni kostur, već aktivno modulira biološke procese cijeljenja poticanjem osteoblastne diferencijacije i uravnoteživanjem upalnog odgovora. Suprotno tome, u skupinama GK i GK+AK prevladava izraženiji upalno-angiogeni signal (TNF- α , VEGF), dok je citoprotektivna komponenta slabije izražena. Ovi nalazi potvrđuju prethodno spomenute različite biološke odgovore organizma na biomaterijal i različite obrasce koštane regeneracije. Dosad je opisano više od 15 vrsta BMP proteina iz obitelji TGF- β , no samo tri imaju ključnu ulogu u stvaranju kosti na mjestu grafta: BMP-2, BMP-4 i BMP-7. Njihova prisutnost potiče diferencijaciju mezenhimskih stanica u osteoblaste te time predstavlja snažan pokazatelj osteoinduktivnih svojstava [210]. Dok su GK i GK+AK pokazali jaču ekspresiju BMP-4, a AD izraženiji signal TGF- β 1, takvi obrasci potvrđeni su i analizom unutarstaničnih posrednika (Tablica 7). Naime, u skupini AD zabilježena je značajno viša ekspresija SMAD-1/5/8 ($p < 0,01$) u odnosu na GK+AK, što je u skladu s nalazom povišenog TGF- β 1 i ukazuje na aktivaciju kanonskog signalnog puta uključenog u osteoblastnu diferencijaciju [211]. Suprotno tome, u skupini GK uočena je viša ekspresija SMAD-2/3, što upućuje na modulaciju TGF- β /BMP signalizacije i potencijalno različit tempo remodelacije kosti. Iz ovakvih rezultata vidljivo je da AD i GK potiču regeneraciju kosti preko različitih bioloških puteva, međutim, kao što je i prethodno rečeno kvantitativna histološka i micro-CT analiza dokazale su da oba obrasca koštane regeneracije rezultiraju podjednakom količinom novostvorene kosti. Važno je također istaknuti da je u AD skupini, unatoč tretiranju dentina etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA), zadržana imunopozitivnost BMP-4 i BMP-7 u osteoblastima i osteocitima. To potvrđuje da dentin i nakon obrade zadržava svoja osteoinduktivna svojstva. Također, nalazi

doktorskog istraživanja u skladu su s prethodnim prekliničkim studijama u kojima je imunopozitivnost BMP-2 i BMP-4 zabilježena u ranim fazama cijeljenja nakon augmentacije DDM, što dodatno potvrđuje ulogu dentina kao biološki aktivnog materijala [184].

U analiziranim uzorcima šest mjeseci nakon augmentacije nije zabilježena imunopozitivnost za COX-2 u niti jednoj od ispitivanih skupina. COX-2 je enzim koji sudjeluje u sintezi prostaglandina te ima važnu ulogu u ranim fazama koštanog cijeljenja, osobito u inicijaciji upalne reakcije i diferencijaciji osteoprogenitornih stanica [212]. Njegova povišena ekspresija registrira se tijekom akutne i subakutne faze cijeljenja, dok se u kasnijim fazama fiziološki povlači [213]. Činjenica da imunopozitivnost na COX-2 u ovom istraživanju nije zabilježena, odražava završetak upalne faze i prijelaz procesa cijeljenja u stabilniju fazu koštane remodelacije. Ovaj nalaz dodatno potvrđuje da primijenjeni biomaterijali ne izazivaju patološki upalni odgovor, što je u skladu s opisanim kvalitativnim histološkim promjenama i integracijom biomaterijala s okolnim tkivom te njihovom biokompatibilnošću.

Imunofluorescentno obilježavanje u analizama koštanih bioptata učinilo se kako bi se precizno identificirali i kvantificirali specifični stanični fenotipovi makrofaga uključeni u proces cijeljenja. Za razliku od standardne histologije i imunohistokemije, ova metoda omogućuje višestruko obilježavanje stanica u istom uzorku te kolokalizaciju markera, čime se s visokom specifičnošću razlikuju stanične populacije ključne za upalni odgovor i koštanu regeneraciju [211]. U kontekstu koštane regeneracije, važno je razmotriti različite fenotipove makrofaga (M1 i M2) jer oni imaju različite, ali nadopunjujuće uloge u procesu cijeljenja. M1 makrofazi predstavljaju pro-upalni fenotip, a njihova je glavna uloga inicijacija upalnog odgovora, eliminacija patogena i poticanje rane faze remodelacije. Oni stvaraju citokine poput TNF- α , koji regrutiraju progenitorne stanice i omogućuju pokretanje procesa cijeljenja [214–216]. Suprotno od M1, M2 makrofazi predstavljaju pro-regenerativni fenotip, obilježen markerom CD206, i odgovorni su za smirivanje i povlačenje upale, stimulaciju angiogeneze, diferencijaciju osteoblasta te formiranje i stabilizaciju novog koštanog matriksa [217,218]. Stoga je ravnoteža između M1 i M2 fenotipa ključna za uspješan ishod koštane regeneracije. Rezultati imunofluorescentnog obilježavanja u doktorskome istraživanju reflektiraju prethodno opisane različite biološke odgovore ovisno o korištenom biomaterijalu. Najviši udio M1/M1MNGC fenotipa zabilježen je u skupini s GK, što je bilo statistički značajno više u odnosu na AD ($p < 0,01$). Ovaj nalaz nadovezuje se na imunohistokemijska zapažanja i ukazuje na jaču i dugotrajniju upalnu aktivaciju u prisutnosti ksenogenog materijala. Suprotno tome, u skupini s AD zabilježen je najveći udio M2/M2MNGC fenotipa ($p < 0,01$ u odnosu na GK), što je znak brže regresije upale i aktivnije faze regeneracije kosti. Ovakav obrazac u potpunosti je

u skladu s pretpostavkom da AD, osim što je biološki kompatibilan, ima i imunomodulatorni učinak usmjeren prema bržem prijelazu iz upalne u reparativnu fazu cijeljenja. S druge strane, GK pokazuje tendenciju održavanja jačeg M1 odgovora, što ne sprječava regeneraciju, ali može usporiti prijelaz prema fazi remodelacije [219].

Iz kliničke perspektive, primjena AD-a donosi nekoliko praktičnih prednosti u odnosu na kombinaciju GK+AK ili same GK. Priprema materijala odvija se tijekom same ekstrakcije i može je izvesti dentalni asistent pomoću uređaja za mljevenje dentina, čime se skraćuje ukupno trajanje zahvata i smanjuje opterećenje kirurga. Za razliku od protokola koji uključuju prikupljanje autologne kosti, primjena AD-a ne zahtijeva dodatno operativno polje, čime se izbjegava morbiditet donorskog mjesta i potencijalne postoperativne komplikacije. Osim toga, budući da se kao graft koristi vlastiti zub pacijenta, postupak je i ekonomski povoljniji jer eliminira troškove nabave dodatnih materijala. Ove praktične prednosti čine AD ne samo biološki vrijednim, nego i klinički atraktivnim rješenjem u svakodnevnoj praksi regenerativne dentalne medicine.

Rezultati ovog doktorskog istraživanja dosljedno pokazuju da sva tri ispitivana biomaterijala psojeduju biološka i imunološka svojstva koja su usporediva. Mikro-CT i histomorfometrija potvrdili su sličan udio novostvorene kosti u svim ispitivanim skupinama, dok su imunohistokemijski i imunofluorescentni nalazi ukazali na različite obrasce biološkog odgovora: GK je bio povezan s jačim proupalnim i osteoinduktivnim signalima (TNF- α , BMP-4, M1 fenotip), dok je AD pokazao više naglašene reparativne i zaštitne putove (TGF- β 1, HO-1, M2 fenotip). Ova komplementarnost rezultata potvrđuje osteoinduktivnost AD u procesu koštane regeneracije, što do sada na humanim bioptatima nije bilo dokazano. Klinički gledano, AD predstavlja jednostavniju i manje invazivnu alternativu, bez potrebe za dodatnim donorskim mjestom ili ksenogenim materijalom, uz smanjenje troškova i rizika za pacijenta. Time se potvrđuje da je AD vrijedan biomaterijal za vođenu regeneraciju kosti, čija primjena ima potencijal unaprijediti buduću praksu u regenerativnoj dentalnoj medicini.

6 ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Analizom dimenzija alveolarnog grebena metodom CBCT-a potvrđeno je da svi primijenjeni biomaterijali doprinose očuvanju volumena alveole, pri čemu nisu zabilježene statistički značajne razlike između skupina.
2. Mikro-CT i histomorfometrijska analiza pokazale su da AD postiže usporedive rezultate s GK i GK+AK u pogledu udjela novostvorene kosti i rezidualnog biomaterijala. Ovi nalazi potvrđuju da AD može djelovati kao učinkovit materijal za očuvanje alveolarnog grebena.
3. Imunohistokemijska analiza pokazala je različite obrasce biološkog odgovora između skupina. U skupinama s GK i GK+AK zabilježena je značajno viša ekspresija TNF- α i BMP-4 u odnosu na AD, što upućuje na jači upalni i osteoinduktivni signal povezan s ksenogenim materijalom. Suprotno tome, u skupini AD zabilježena je viša ekspresija protektivnog čimbenika HO-1 te TGF- β 1, što ukazuje na povoljniji biološki profil temeljen na poticanju osteoblastne diferencijacije i smanjenju oksidativnog stresa.
4. Ekspresija BMP-7 i SMAD-1/5/8 bila je izraženija u skupini AD, dok je u skupinama s GK i GK+AK dominirao jači signal BMP-4. Ovi nalazi potvrđuju da ispitivani biomaterijali aktiviraju različite signalne putove tijekom koštane regeneracije.
5. Analiza imunofluorescentnog obilježavanja potvrdila je da AD potiče veću prisutnost M2 makrofaga i M2MNGC stanica, dok GK dovodi do dominantnog aktiviranja M1 fenotipa. Stoga, može se zaključiti da AD modulira upalni odgovor prema reparativnom i pro-regenerativnom fenotipu, dok GK snažnije potiče pro-upalni odgovor.
6. Ukupno gledano, rezultati doktorskog istraživanja pokazuju da AD postiže usporedive histološke i histomorfometrijske ishode s GK i GK+AK, ali uz povoljniji imunološki i biološki profil, što ga čini dobrom alternativom autogenoj kosti i zamjenskim koštanim materijalima. Prednosti AD-a uključuju kraće trajanje kirurškog postupka, izbjegavanje dodatnog uzimanja autologne kosti te niži trošak zahvata.

7 LITERATURA

1. Okamoto K, Nakashima T, Shinohara M i sur. Osteoimmunology: The Conceptual Framework Unifying the Immune and Skeletal Systems. *Physiol Rev* 2017;97:1295–349.
2. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, 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.
3. Buck DW, Dumanian GA. Bone Biology and Physiology. *Plast Reconstr Surg* 2012;129:1314–20.
4. Đudarić Luka, Zoričić - Cvek Sanja, Cvijanović Olga, Fužinac - Smojver Arijana, Čelić Tanja, Martinović Danijela. Osnove biologije koštanog tkiva. *Medicina Fluminensis* 2014:21–38.
5. Junqueira Luiz Carlos, Carneiro José. Osnove histologije, udžbenik i atlas, prema X. američkom izdanju. Zagreb: Školska Knjiga; 2005.
6. FROST HM. In vivo osteocyte death. *J Bone Joint Surg Am* 1960;42-A:138–43.
7. Donahue HJ. Gap junctions and biophysical regulation of bone cell differentiation. *Bone* 2000;26:417–22.
8. Verborgt O, Gibson GJ, Schaffler MB. Loss of Osteocyte Integrity in Association with Microdamage and Bone Remodeling After Fatigue In Vivo. *Journal of Bone and Mineral Research* 2000;15:60–7.
9. Aarden EM, Nijweide PJ, Burger EH. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 1994;55:287–99.
10. Matyas JR, Sandell LJ, Adams ME. Gene expression of type II collagens in chondrocytes in experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;5:99–105.
11. Divieti P, Inomata N, Chapin K, Singh R, Jüppner H, Bringham FR. Receptors for the Carboxyl-Terminal Region of PTH(1–84) Are Highly Expressed in Osteocytic Cells**This work was supported by the NIH Grant DK-11794. *Endocrinology* 2001;142:916–25.
12. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 2003;4:638–49.
13. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast–osteoclast interactions. *Connect Tissue Res* 2018;59:99–107.

14. Yang X, Karsenty G. Transcription factors in bone: developmental and pathological aspects. *Trends Mol Med* 2002;8:340–5.
15. Ono T, Hayashi M, Sasaki F, Nakashima T. RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond. *Inflamm Regen* 2020;40:2.
16. Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 2007;40:251–64.
17. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E *et al*. Tumor Necrosis Factor α Stimulates Osteoclast Differentiation by a Mechanism Independent of the Odf/Rankl–Rank Interaction. *J Exp Med* 2000;191:275–86.
18. Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A. Tumor Necrosis Factor- α Induces Differentiation of and Bone Resorption by Osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:4858–64.
19. Boyce BF, Xing L. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr Osteoporos Rep* 2007;5:98–104.
20. Matalová E, Lungová V, Sharpe P. Development of Tooth and Associated Structures. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*, Elsevier; 2015, p. 335–46.
21. Marks SC, Popoff SN. Bone cell biology: The regulation of development, structure, and function in the skeleton. *American Journal of Anatomy* 1988;183:1–44.
22. Wang EA, Israel DI, Kelly S, Luxenberg DP. Bone Morphogenetic Protein-2 Causes Commitment and Differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 Cells. *Growth Factors* 1993;9:57–71.
23. Davies DV, Edwards DAW. The blood supply of the synovial membrane and intra-articular structures. *Ann R Coll Surg Engl* 1948;2:142–6.
24. Ahrens M, Ankenbauer T, Schröder D, Hollnagel A, Mayer H, Gross G. Expression of Human Bone Morphogenetic Proteins-2 or -4 in Murine Mesenchymal Progenitor C3H10T $\frac{1}{2}$ Cells Induces Differentiation into Distinct Mesenchymal Cell Lineages. *DNA Cell Biol* 1993;12:871–80.
25. Orwoll ES. Toward an Expanded Understanding of the Role of the Periosteum in Skeletal Health. *Journal of Bone and Mineral Research* 2003;18:949–54.
26. Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone Sialoprotein. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 1999;10:79–98.
27. Järveläinen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R. Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 2009;61:198–223.

28. 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.
29. Bonewald LF. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *BoneKEY-Osteovision* 2006;3:7–15.
30. Francis-West P, Ladher R, Barlow A, Graveson A. Signalling interactions during facial development. *Mech Dev* 1998;75:3–28.
31. Khoury Fouad, Antoun Hadi, Missika Patrick. Bone augmentation in oral implantology. Surrey, United Kingdom: Quintessence Publishing Co; 2007.
32. Nefussi JR. Entite fonctionnelle odontologique au cors du deplacement orthodontique. *Orthopedie dentofaciale: une approche bioprogressive*, Chichago Quintessence; n.d., p. 119–51.
33. Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 1999;87:57–66.
34. Mostafa M I, Abdelkader M A, Abdelrahman M A i sur. Frequent genetic disorders associated with missing teeth and revisiting classification of anodontia: a retrospective study. *Middle East Journal of Medical Genetics* 2021;10:95–100.
35. Li Y, Ling J, Jiang Q. Inflammasomes in Alveolar Bone Loss. *Front Immunol* 2021;12.
36. Tompkins KA. The osteoimmunology of alveolar bone loss. *Connect Tissue Res* 2016;57:69–90.
37. Horowitz R, Holtzclaw D, Rosen PS. A Review on Alveolar Ridge Preservation Following Tooth Extraction. *Journal of Evidence Based Dental Practice* 2012;12:149–60.
38. Udeabor SE, Heselich A, Al-Maawi S, Alqahtani AF, Sader R, Ghanaati S. Current Knowledge on the Healing of the Extraction Socket: A Narrative Review. *Bioengineering* 2023;10:1145.
39. Ho-Shui-Ling A, Bolander J, Rustom LE, Johnson AW, Luyten FP, Picart C. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials* 2018;180:143–62.
40. Jones RE, Salhotra A, Robertson KS i sur. Skeletal Stem Cell-Schwann Cell Circuitry in Mandibular Repair. *Cell Rep* 2019;28:2757-2766.e5.
41. Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the Inflammatory Response for Enhanced Bone Tissue Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2008;14:179–86.

42. Knight MN, Hankenson KD. Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013;2:306–16.
43. Cameron JA, Milner DJ, Lee JS, Cheng J, Fang NX, Jasiuk IM. Employing the Biology of Successful Fracture Repair to Heal Critical Size Bone Defects, 2012, p. 113–32.
44. Gerber H. Angiogenesis and Bone Growth. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10:223–8.
45. Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:133–43.
46. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 2003;88:873–84.
47. Colnot C. Skeletal Cell Fate Decisions Within Periosteum and Bone Marrow During Bone Regeneration. *Journal of Bone and Mineral Research* 2009;24:274–82.
48. Ono T, Takayanagi H. Osteoimmunology in Bone Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep* 2017;15:367–75.
49. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis P V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 2005;36:1392–404.
50. Nefussi J, Casamajor P, Serfaty R, Bolle M, Hugly C, Forest N. Activated adult human alveolar bone cells: a new model of matrix mineralization. *Eur J Oral Sci* 1998;106:424–8.
51. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury* 2011;42:551–5.
52. Fan X, Loebel DAF, Bildsoe H i sur. Tissue interactions, cell signaling and transcriptional control in the cranial mesoderm during craniofacial development. *AIMS Genet* 2016;03:074–98.
53. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997;11:3286–305.
54. Roybal PG, Wu NL, Sun J, Ting M, Schafer CA, Maxson RE. Inactivation of *Msx1* and *Msx2* in neural crest reveals an unexpected role in suppressing heterotopic bone formation in the head. *Dev Biol* 2010;343:28–39.
55. Sun J, Ishii M, Ting M-C, Maxson R. *Foxc1* controls the growth of the murine frontal bone rudiment by direct regulation of a *Bmp* response threshold of *Msx2*. *Development* 2013;140:1034–44.
56. Ferrara N, Davis-Smyth T. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocr Rev* 1997;18:4–25.

57. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor Cells Secrete a Vascular Permeability Factor That Promotes Accumulation of Ascites Fluid. *Science* (1979) 1983;219:983–5.
58. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851–8.
59. Augustin G, Antabak A, Davila S. Retracted: The periosteum. *Injury* 2007;38:1115–30.
60. Giannoudis P, Psarakis S, Kontakis G. Can we accelerate fracture healing? *Injury* 2007;38:S81–9.
61. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G *i sur.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380:435–9.
62. Deckers MML, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Löwik CWGM. Expression of Vascular Endothelial Growth Factors and Their Receptors during Osteoblast Differentiation. *Endocrinology* 2000;141:1667–74.
63. Zelzer E, McLean W, Ng Y-S *i sur.* Skeletal defects in VEGF120/120 mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development* 2002;129:1893–904.
64. Zelzer E, Mamluk R, Ferrara N, Johnson RS, Schipani E, Olsen BR. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development* 2004;131:2161–71.
65. Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T *i sur.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS Lett* 2000;473:161–4.
66. Shum L, Rabie ABM, Hägg U. Vascular endothelial growth factor expression and bone formation in posterior glenoid fossa during stepwise mandibular advancement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 2004;125:185–90.
67. Paine A, Eiz-Vesper B, Blasczyk R, Immenschuh S. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochem Pharmacol* 2010;80:1895–903.
68. Zwerina J, Tzima S, Hayer S *i sur.* Heme oxygenase 1 (HO-1) regulates osteoclastogenesis and bone resorption. *The FASEB Journal* 2005;19:2011–3.
69. Vanella L, Kim DH, Asprinio D *i sur.* HO-1 expression increases mesenchymal stem cell-derived osteoblasts but decreases adipocyte lineage. *Bone* 2010;46:236–43.
70. Wegiel B, Hedblom A, Li M *i sur.* Heme oxygenase-1 derived carbon monoxide permits maturation of myeloid cells. *Cell Death Dis* 2014;5:e1139–e1139.

71. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:139–46.
72. Algate K, Haynes DR, Bartold PM, Crotti TN, Cantley MD. The effects of tumour necrosis factor- α on bone cells involved in periodontal alveolar bone loss; osteoclasts, osteoblasts and osteocytes. *J Periodontal Res* 2016;51:549–66.
73. Teitelbaum SL. Osteoclasts; culprits in inflammatory osteolysis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:201.
74. Coon D, Gulati A, Cowan C, He J. The Role of Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Inflammatory Bone Resorption. *J Endod* 2007;33:432–6.
75. Kargman S, Charleson S, Cartwright M i sur. Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology* 1996;111:445–54.
76. Okada Y, Lorenzo JA, Freeman AM i sur. Prostaglandin G/H synthase-2 is required for maximal formation of osteoclast-like cells in culture. *Journal of Clinical Investigation* 2000;105:823–32.
77. Forwood MR. Inducible cyclo-oxygenase (COX-2) mediates the induction of bone formation by mechanical loading in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research* 1996;11:1688–93.
78. Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int* 1995;57:344–58.
79. Zhang X, Schwarz EM, Young DA, Puzas JE, Rosier RN, O’Keefe RJ. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *Journal of Clinical Investigation* 2002;109:1405–15.
80. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G i sur. The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell* 2002;108:17–29.
81. Xing W, Godwin C, Pourteymoor S, Mohan S. Conditional disruption of the osterix gene in chondrocytes during early postnatal growth impairs secondary ossification in the mouse tibial epiphysis. *Bone Res* 2019;7:24.
82. Ramazzotti G, Fiume R, Chiarini F i sur. Phospholipase C- β 1 interacts with cyclin E in adipose- derived stem cells osteogenic differentiation. *Adv Biol Regul* 2019;71:1–9.
83. Zhou X, Zhang Z, Feng JQ i sur. Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010;107:12919–24.

84. Renn J, Winkler C. *Osterix* -mCherry transgenic medaka for in vivo imaging of bone formation. *Developmental Dynamics* 2009;238:241–8.
85. Baek Wook-Young, Kim Jung Eun. Gene alterations by osteoblast-specific transcription factor osterix in postnatal bone formation. *Journal of Korean Society of Osteoporosis* 2011:51–6.
86. Klein-Nulend J, Bakker AD, Bacabac RG, Vatsa A, Weinbaum S. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bone* 2013;54:182–90.
87. Nishio Y, Dong Y, Paris M, O’Keefe RJ, Schwarz EM, Drissi H. Runx2-mediated regulation of the zinc finger *Osterix/Sp7* gene. *Gene* 2006;372:62–70.
88. Karsenty G. Minireview: Transcriptional Control of Osteoblast Differentiation. *Endocrinology* 2001;142:2731–3.
89. Nakashima K, de Crombrughe B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends in Genetics* 2003;19:458–66.
90. Zou L, Zou X, Li H i sur. Molecular Mechanism of Osteochondroprogenitor Fate Determination During Bone Formation. *Tissue Eng, Boston, MA: Springer US; n.d., p. 431–41.*
91. Yao B, Wang J, Qu S i sur. Upregulated osterix promotes invasion and bone metastasis and predicts for a poor prognosis in breast cancer. *Cell Death Dis* 2019;10:28.
92. Xiao Z-S, Hjelmeland AB, Quarles LD. Selective Deficiency of the “Bone-related” Runx2-II Unexpectedly Preserves Osteoblast-mediated Skeletogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 2004;279:20307–13.
93. Pérez-Campo FM, Santurtún A, García-Ibarbia C i sur. Osterix and RUNX2 are Transcriptional Regulators of Sclerostin in Human Bone. *Calcif Tissue Int* 2016;99:302–9.
94. Takarada T, Nakazato R, Tsuchikane A i sur. Genetic analysis of Runx2 function during intramembranous ossification. *Development* 2015.
95. Nishimura R. The role of SMADS in BMP signaling. *Frontiers in Bioscience* 2003;8:1049.
96. Massagué J. TGF β Signaling: Receptors, Transducers, and Mad Proteins. *Cell* 1996;85:947–50.
97. Derynck R, Zhang Y. Intracellular signalling: The Mad way to do it. *Current Biology* 1996;6:1226–9.
98. Heldin C-H, Miyazono K, ten Dijke P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997;390:465–71.

99. Wrana JL. Regulation of Smad Activity. *Cell* 2000;100:189–92.
100. Massague J. NEW EMBO MEMBERS REVIEW: Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 2000;19:1745–54.
101. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of Osteoblast Differentiation Mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 2000;21:393–411.
102. Reddi AH. Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4:737–44.
103. Nishimura R, Kato Y, Chen D, Harris SE, Mundy GR, Yoneda T. Smad5 and DPC4 Are Key Molecules in Mediating BMP-2-induced Osteoblastic Differentiation of the Pluripotent Mesenchymal Precursor Cell Line C2C12. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:1872–9.
104. Fujii M, Takeda K, Imamura T i sur. Roles of Bone Morphogenetic Protein Type I Receptors and Smad Proteins in Osteoblast and Chondroblast Differentiation. *Mol Biol Cell* 1999;10:3801–13.
105. Yamamoto N, Akiyama S, Katagiri T, Namiki M, Kurokawa T, Suda T. Smad1 and Smad5 Act Downstream of Intracellular Signalings of BMP-2 That Inhibits Myogenic Differentiation and Induces Osteoblast Differentiation in C2C12 Myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;238:574–80.
106. 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;23:1–21.
107. Chappuis V, Engel O, Reyes M, Shahim K, Nolte L-P, Buser D. Ridge Alterations Post-extraction in the Esthetic Zone. *J Dent Res* 2013;92:195S-201S.
108. Kalsi AS, Kalsi JS, Bassi S. Alveolar ridge preservation: why, when and how. *Br Dent J* 2019;227:264–74.
109. Ashman A, Bruins P. A new immediate hard tissue replacement (HTR)™ for bone in the oral cavity. *J Oral Implantol* 1982;10:419–52.
110. Darby I, Chen ST, Buser D. Ridge preservation techniques for implant therapy. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009;24 Suppl:260–71.
111. Cucchi A, Chierico A, Fontana F i sur. Statements and Recommendations for Guided Bone Regeneration. *Implant Dent* 2019;28:388–99.
112. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of Bone Defects by Guided Tissue Regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1988;81:672–6.
113. Seibert J, Nyman S. Localized Ridge Augmentation in Dogs: A Pilot Study Using Membranes and Hydroxyapatite. *J Periodontol* 1990;61:157–65.

114. Nyman S. Bone regeneration using the principle of guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1991;18:494–8.
115. Wang H-L, Boyapati L. “PASS” Principles for Predictable Bone Regeneration. *Implant Dent* 2006;15:8–17.
116. Shamsoddin E, Houshmand B, Golabgiran M. Biomaterial selection for bone augmentation in implant dentistry: A systematic review. *J Adv Pharm Technol Res* 2019;10:46.
117. Yamada M, Egusa H. Current bone substitutes for implant dentistry. *J Prosthodont Res* 2018;62:152–61.
118. Misch CM. Autogenous Bone: Is It Still the Gold Standard? *Implant Dent* 2010;19:361.
119. Zitzmann NU, Naef R, Schärer P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997;12:844–52.
120. Chavda S, Levin L. Human Studies of Vertical and Horizontal Alveolar Ridge Augmentation Comparing Different Types of Bone Graft Materials: A Systematic Review. *Journal of Oral Implantology* 2018;44:74–84.
121. Caballe-Serrano J, Munar-Frau A, Ortiz-Puigpelat O, Soto-Penalozza D, Penarrocha M, Hernandez-Alfaro F. On the search of the ideal barrier membrane for guided bone regeneration. *J Clin Exp Dent* 2018:0–0.
122. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci* 2017;125:315–37.
123. Matinlinna J. *Handbook of oral biomaterials*. Singapore: Pan Stanford Publishing; 2014.
124. Farzad M, Mohammadi M. Guided bone regeneration: A literature review. vol. 1. 2012.
125. Zafiroopoulos G-G, Kačarević Z, Qasim S, Trajkovski B. Open-Healing Socket Preservation with a Novel Dense Polytetrafluoroethylene (dPTFE) Membrane: A Retrospective Clinical Study. *Medicina (B Aires)* 2020;56:216.
126. Liu SH, Yang RS, al-Shaikh R, Lane JM. Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review. *Clin Orthop Relat Res* 1995:265–78.
127. Bunyaratavej P, Wang H. Collagen Membranes: A Review. *J Periodontol* 2001;72:215–29.
128. Soldatos NK, Stylianou P, Koidou VP, Angelov N, Yukna R, Romanos GE. Limitations and options using resorbable versus nonresorbable membranes for successful guided bone regeneration. *Quintessence Int* 2017;48:131–47.

129. Pikos MA. Block Autografts for Localized Ridge Augmentation. *Implant Dent* 2000;9:67–75.
130. Deshmukh J, Deshpande S, Khatri R, Deshpande S, Deshpande S. Vertical and horizontal ridge augmentation in anterior maxilla using autograft, xenograft and titanium mesh with simultaneous placement of endosseous implants. *J Indian Soc Periodontol* 2014;18:661.
131. Rabelo GD, de Paula PM, Rocha FS, Jordão Silva C, Zanetta-Barbosa D. Retrospective Study of Bone Grafting Procedures Before Implant Placement. *Implant Dent* 2010;19:342–50.
132. Bhatt RA, Rozental TD. Bone Graft Substitutes. *Hand Clin* 2012;28:457–68.
133. Kolk A, Handschel J, Drescher W i sur. Current trends and future perspectives of bone substitute materials – From space holders to innovative biomaterials. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2012;40:706–18.
134. Misch CM. Use of the mandibular ramus as a donor site for onlay bone grafting. *J Oral Implantol* 2000;26:42–9.
135. Johansson B, Grepe A, Wannfors K, Hirsch JM. A clinical study of changes in the volume of bone grafts in the atrophic maxilla. *Dentomaxillofac Radiol* 2001;30:157–61.
136. Roberts TT, Rosenbaum AJ. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics. *Organogenesis* 2012;8:114–24.
137. Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Rossi F, Perale G. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *J Clin Periodontol* 2019;46:92–102.
138. Maiorana C, Beretta M, Salina S, Santoro F. Reduction of autogenous bone graft resorption by means of bio-oss coverage: a prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2005;25:19–25.
139. Perić Kačarević Z, Kavehei F, Houshmand A i sur. Purification processes of xenogenic bone substitutes and their impact on tissue reactions and regeneration. *Int J Artif Organs* 2018;41:789–800.
140. 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.
141. 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.
142. Schmitt CM, Doering H, Schmidt T, Lutz R, Neukam FW, Schlegel KA. 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.
143. Jensen SS, Broggin N, Hjørting-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.
 144. Franco M, Viscioni A, Rigo L i sur. Wide Diameter Implants Inserted in Jaws Grafted with Homologue Bone. *Acta Stomatol Croat* 2008:273–82.
 145. 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.
 146. Tadic D. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials* 2004;25:987–94.
 147. Manfro R, Fonseca FS, Bortoluzzi MC, Sendyk WR. Comparative, Histological and Histomorphometric Analysis of Three Anorganic Bovine Xenogenous Bone Substitutes: Bio-Oss, Bone-Fill and Gen-Ox Anorganic. *J Maxillofac Oral Surg* 2014;13:464–70.
 148. Vanis S, Rheinbach O, Klawonn A, Prymak O, Epple M. Numerical computation of the porosity of bone substitution materials from synchrotron micro computer tomographic data. *Materwiss Werksttech* 2006;37:469–73.
 149. Jensen SS, Aaboe M, Pinholt EM, Hjørting-Hansen E, Melsen F, Ruyter IE. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:55–66.
 150. Taylor DM, Fraser H, McConnell I i sur. Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Arch Virol* 1994;139:313–26.
 151. Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM. The bone induction principle. *Clin Orthop Relat Res* 1967;53:243–83.
 152. Bessho K, Tanaka N, Matsumoto J, Tagawa T, Murata M. Human Dentin-matrix-derived Bone Morphogenetic Protein. *J Dent Res* 1991;70:171–5.
 153. Xiao Y-T, Xiang L-X, Shao J-Z. Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362:550–3.
 154. Xhaferi B, Peeva M P, Atanasosoki G J, Xheladini A, Murtezai L. Use of autologous dentin (ADG) graft in augmentation of bone defects in jaw bone. *Apolonia* 2020;41–42:45–52.

155. Schmidt-Schultz TH, Schultz M. Intact growth factors are conserved in the extracellular matrix of ancient human bone and teeth: a storehouse for the study of human evolution in health and disease. *Biol Chem* 2005;386.
156. Um I-W, Kim Y-K, Mitsugi M. Demineralized dentin matrix scaffolds for alveolar bone engineering. *The Journal of Indian Prosthodontic Society* 2017;17:120.
157. Carvalho VAP, Tosello D de O, Salgado MA de C, Gomes MF. Histomorphometric analysis of homogenous demineralized dentin matrix as osteopromotive material in rabbit mandibles. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19:679–86.
158. Kim J-Y, Kim K-W, Um I-W, Kim Y-K, Lee J-K. Bone Healing Capacity of Demineralized Dentin Matrix Materials in a Mini-pig Cranium Defect. *Journal of Korean Dental Science* 2012;5:21–8.
159. Lee DH, Yang KY, Lee JK. Porcine study on the efficacy of autogenous tooth bone in the maxillary sinus. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 2013;39:120.
160. Mazor Z, Horowitz R, Prasad H, Kotsakis G. Healing Dynamics Following Alveolar Ridge Preservation with Autologous Tooth Structure. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2019;39:697–702.
161. Pohl S, Binderman I, Tomac J. Maintenance of Alveolar Ridge Dimensions Utilizing an Extracted Tooth Dentin Particulate Autograft and Platelet-Rich fibrin: A Retrospective Radiographic Cone-Beam Computed Tomography Study. *Materials* 2020;13:1083.
162. Pang K, Um I, Kim Y, Woo J, Kim S, Lee J. Autogenous demineralized dentin matrix from extracted tooth for the augmentation of alveolar bone defect: a prospective randomized clinical trial in comparison with anorganic bovine bone. *Clin Oral Implants Res* 2017;28:809–15.
163. Oguić M, Čandrlić 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.
164. Barbeck M, Booms P, Unger R i sur. Multinucleated giant cells in the implant bed of bone substitutes are foreign body giant cells—New insights into the material-mediated healing process. *J Biomed Mater Res A* 2017;105:1105–11.
165. Panagiotou D, Özkan Karaca E, Dirikan İpçi Ş, Çakar G, Olgaç V, Yılmaz S. Comparison of two different xenografts in bilateral sinus augmentation: radiographic and histologic findings. *Quintessence Int* 2015;46:611–9.

166. Barbeck M, Motta A, Migliaresi C, Sader R, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S. Heterogeneity of biomaterial-induced multinucleated giant cells: Possible importance for the regeneration process? *J Biomed Mater Res A* 2016;104:413–8.
167. Rolvien T, Barbeck M, Wenisch S, Amling M, Krause M. Cellular Mechanisms Responsible for Success and Failure of Bone Substitute Materials. *Int J Mol Sci* 2018;19:2893.
168. Chocholata P, Kulda V, Babuska V. Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials* 2019, Vol 12, Page 568 2019;12:568.
169. Cervera-Maillo JM, Morales-Schwarz D, Morales-Melendez H, Mahesh L, Calvo-Guirado JL. Autologous Tooth Dentin Graft: A Retrospective Study in Humans. *Medicina (B Aires)* 2021;58:56.
170. Sánchez-Labrador L, Martín-Ares M, Ortega-Aranegui R, López-Quiles J, Martínez-González JM. Autogenous dentin graft in bone defects after lower third molar extraction: A split-mouth clinical trial. *Materials* 2020;13.
171. Cenicante J, Botelho J, Machado V i sur. The Use of Autogenous Teeth for Alveolar Ridge Preservation: A Literature Review. *Applied Sciences* 2021, Vol 11, Page 1853 2021;11:1853.
172. Pohl S, Binderman I, Božić D, Shapira L, Venkataraman N. Effectiveness of Autologous Tissue Grafts on Soft Tissue Ingrowth in Patients Following Partial Root Extraction with Socket Shield: A Retrospective Analysis of a Case Series. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2021;36:362–70.
173. Kim YK, Kim SG, Byeon JH i sur. Development of a novel bone grafting material using autogenous teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* 2010;109:496–503.
174. Binderman I, Hallel G, Nardy C, Yaffe A, Sapoznikov L. A novel procedure to process extracted teeth for immediate grafting of autogenous dentin. *56 INTERNATIONAL DENTISTRY-AFRICAN EDITION* n.d.;7.
175. Lo Giudice R, Nicita F, Puleio F i sur. Accuracy of Periapical Radiography and CBCT in Endodontic Evaluation. *Int J Dent* 2018;2018.
176. Araújo MG, Dias DR, Matarazzo F. Anatomical characteristics of the alveolar process and basal bone that have an effect on socket healing. *Periodontol 2000* 2023;93:277–88.
177. Cinar IC, Zboun M, Saglanmak A, Mijiritsky E. Immediate Implantation with Autologous Mineralized Dentin Graft versus Deproteinized Bovine Bone as Space-

- Filling Substitute in Maxillary Anterior Zone: Retrospective Radiological and Clinical Study. *J Clin Med* 2024;13:5521.
178. Li P, Zhu HC, Huang DH. Autogenous DDM versus Bio-Oss granules in GBR for immediate implantation in periodontal postextraction sites: A prospective clinical study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2018;20:923–8.
 179. Pohl S, Binderman I, Tomac J. Maintenance of alveolar ridge dimensions utilizing an extracted tooth dentin particulate autograft and platelet-rich fibrin: A retrospective radiographic cone-beam computed tomography study. *Materials* 2020;13.
 180. Mazor Z, Horowitz R, Prasad H, Kotsakis G. Healing Dynamics Following Alveolar Ridge Preservation with Autologous Tooth Structure. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2019;39:697–702.
 181. Pang KM, Um IW, Kim YK, Woo JM, Kim SM, Lee JH. Autogenous demineralized dentin matrix from extracted tooth for the augmentation of alveolar bone defect: a prospective randomized clinical trial in comparison with anorganic bovine bone. *Clin Oral Implants Res* 2017;28:809–15.
 182. Minetti E, Gianfreda F, Bollero P i sur. Comparative Histological Analysis of Dentine-Derived Tooth Grafts in Maxillary vs Mandibular Socket Preservation: A Retrospective Study of 178 Cases. *Dent J (Basel)* 2024;12:320.
 183. Minetti M. Autologous tooth graft: a histological comparison between dentin mixed with xenograft and dentin alone grafts in socket preservation - PubMed. *J Biol Regul Homeost Agents* 2019;33:189–97.
 184. Pinheiro Carvalho i sur. Histomorphometric analysis of homogenous demineralized dentin matrix as osteopromotive material in rabbit mandibles - PubMed. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19:679–86.
 185. Kim J-Y, Kim K-W, Um I-W, Kim Y-K, Lee J-K. Bone Healing Capacity of Demineralized Dentin Matrix Materials in a Mini-pig Cranium Defect. *Journal of Korean Dental Science* 2012;5:21–8.
 186. Lee DH, Yang KY, Lee JK. Porcine study on the efficacy of autogenous tooth bone in the maxillary sinus. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 2013;39:120.
 187. De Oliveira GS, Miziara MN, Silva ERD, Ferreira EL, Biulchi APF, Alves JB. Enhanced bone formation during healing process of tooth sockets filled with demineralized human dentine matrix. *Aust Dent J* 2013;58:326–32.

188. Reis-Filho CR, Silva ER, Martins AB i sur. Demineralised human dentine matrix stimulates the expression of VEGF and accelerates the bone repair in tooth sockets of rats. *Arch Oral Biol* 2012;57:469–76.
189. Van Lenthe GH, Hagemüller H, Bohner M, Hollister SJ, Meinel L, Müller R. Nondestructive micro-computed tomography for biological imaging and quantification of scaffold-bone interaction in vivo. *Biomaterials* 2007;28:2479–90.
190. Čandrić M, Jerbić Radetić AT, Omrčen H i sur. 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. *J Funct Biomater* 2024;15.
191. Mazzucchi G, Mariano A, Serafini G i sur. Osteoinductive Properties of Autologous Dentin: An Ex Vivo Study on Extracted Teeth. *J Funct Biomater* 2024;15:162.
192. Wadhwa P, Lee JH, Zhao BC i sur. Microcomputed Tomography and Histological Study of Bone Regeneration Using Tooth Biomaterial with BMP-2 in Rabbit Calvarial Defects. *Scanning* 2021;2021:6690221.
193. Calvo-Guirado JL, Cabo-Pastor MB, Martínez-Martínez F i sur. The Use of Human Sterilized Crushed Tooth Particles Compared with BTCP Biomaterial and Empty Defects in Bone Formation inside Critical Rabbit Calvaria Sites. *Bioengineering* 2023;10:638.
194. Calvo-Guirado JL, Carlos-Villafranca F de, Garcés-Villalá M, García-Carrillo N, Jindal V, Martínez-Martínez F. X-ray Micro-Computed Tomography Characterization of Autologous Teeth Particle used in Postextraction Sites for Bone Regeneration. An Experimental Study in Dogs. *Indian Journal of Dental Sciences* 2022;14:58–67.
195. Ferraz MP. Bone Grafts in Dental Medicine: An Overview of Autografts, Allografts and Synthetic Materials. *Materials* 2023, Vol 16, Page 4117 2023;16:4117.
196. Jun SH, Ahn JS, Lee J Il, Ahn KJ, Yun PY, Kim YK. A prospective study on the effectiveness of newly developed autogenous tooth bone graft material for sinus bone graft procedure. *J Adv Prosthodont* 2014;6:528–38.
197. Perić Kačarević Ž, Rider P, Alkildani S i sur. An introduction to bone tissue engineering. *Int J Artif Organs* 2020;43:69–86.
198. Myllylä RM, Haapasaari KM, Lehenkari P, Tuukkanen J. Bone morphogenetic proteins 4 and 2/7 induce osteogenic differentiation of mouse skin derived fibroblast and dermal papilla cells. *Cell Tissue Res* 2014;355:463–70.

199. Zou ML, Chen ZH, Teng YY i sur. The Smad Dependent TGF- β and BMP Signaling Pathway in Bone Remodeling and Therapies. *Front Mol Biosci* 2021;8:593310.
200. Jeong JH, Ojha U, Lee YM. Pathological angiogenesis and inflammation in tissues. *Arch Pharm Res* 2020;44:1.
201. Glass GE, Chan JK, Freidin A, Feldmann M, Horwood NJ, Nanchahal J. TNF- α promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:1585–90.
202. Kitaura H, Marahleh A, Ohori F i sur. Role of the Interaction of Tumor Necrosis Factor- α and Tumor Necrosis Factor Receptors 1 and 2 in Bone-Related Cells. *Int J Mol Sci* 2022;23:1481.
203. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:139–46.
204. Algate K, Haynes DR, Bartold PM, Crotti TN, Cantley MD. The effects of tumour necrosis factor- α on bone cells involved in periodontal alveolar bone loss; osteoclasts, osteoblasts and osteocytes. *J Periodontal Res* 2016;51:549–66.
205. Suzawa M, Takeuchi Y, Fukumoto S i sur. Extracellular Matrix-Associated Bone Morphogenetic Proteins Are Essential for Differentiation of Murine Osteoblastic Cells in Vitro. *Endocrinology* 1999;140:2125–33.
206. Chen G, Deng C, Li YP. TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Int J Biol Sci* 2012;8:272.
207. Kitaura H, Marahleh A, Ohori F i sur. Role of the Interaction of Tumor Necrosis Factor- α and Tumor Necrosis Factor Receptors 1 and 2 in Bone-Related Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 1481 2022;23:1481.
208. Zhou X, Yuan W, Xiong X i sur. HO-1 in Bone Biology: Potential Therapeutic Strategies for Osteoporosis. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:791585.
209. Bak SU, Kim S, Hwang HJ i sur. Heme oxygenase-1 (HO-1)/carbon monoxide (CO) axis suppresses RANKL-induced osteoclastic differentiation by inhibiting redox-sensitive NF- κ B activation. *BMB Rep* 2017;50:103.
210. Arias-Betancur A, Badilla-Wenzel N, Astete-Sanhueza Á, Farfán-Beltrán N, Dias FJ. Carrier systems for bone morphogenetic proteins: An overview of biomaterials used for dentoalveolar and maxillofacial bone regeneration. *Jpn Dent Sci Rev* 2022;58:316.
211. Nelson AL, Fontana GL, Miclau E i sur. Therapeutic approaches to activate the canonical Wnt pathway for bone regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* 2022;16:961.

212. Simon AM, Manigrasso MB, O'Connor JP. Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002;17:963–76.
213. Maruyama M, Rhee C, Utsunomiya T i sur. Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:542565.
214. Zhang D, Dang Y, Deng R i sur. Research Progress of Macrophages in Bone Regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* 2023;2023:1512966.
215. Shin RLY, Lee CW, Shen OYJ, Xu H, Lee OKS. The Crosstalk between Mesenchymal Stem Cells and Macrophages in Bone Regeneration: A Systematic Review. *Stem Cells Int* 2021;2021.
216. Lu LY, Loi F, Nathan K i sur. Pro-inflammatory M1 macrophages promote Osteogenesis by mesenchymal stem cells via the COX-2-prostaglandin E2 pathway. *J Orthop Res* 2017;35:2378–85.
217. Gou M, Wang H, Xie H, Song H. Macrophages in guided bone regeneration: potential roles and future directions. *Front Immunol* 2024;15:1396759.
218. Arabpour M, Saghazadeh A, Rezaei N. Anti-inflammatory and M2 macrophage polarization-promoting effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes. *Int Immunopharmacol* 2021;97.
219. Alvarez MM, Liu JC, Trujillo-de Santiago G i sur. Delivery strategies to control inflammatory response: Modulating M1-M2 polarization in tissue engineering applications. *J Control Release* 2016;240:349.

7.1 Popis slika

Slika 1: Prikazan je shematski presjek Haversova osteona koji se sastoji od pet koštanih lamela, znatno uvećano. Osteociti su međusobno umreženi brojnim citoplazmatskim izdancima. Preuzeto iz Đudarić i sur. [4]

Slika 2: Shematski prikaz osteoklasta u Howshipovoj lakuni. Preuzeto iz Đudarić i sur. [4]

Slika 3: RANKL/RANK sustav diferencijacije osteoklasta. Preuzeto i prilagođeno prema [20].

Slika 4: Međusobna povezanost stanica u koštanom tkivu citoplazmatskim izdancima. Preuzeto iz Đudarić i sur. [4].

Slika 5: Prikaz u shematskom obliku molekule kolagena tipa I i kristala hidroksiapatita. Preuzeto iz Đudarić i sur. [4].

Slika 6: Zrelo koštano tkivo s prikazanim rasporedom kolagenih vlakana u pojedinoj lameli. Preuzeto iz Đudarić i sur. [4].

Slika 7: Shematski prikaz cijeljenja alveole nakon ekstrakcije. Preuzeto i prilagođeno prema [38].

Slika 8: Podjela ispitanika

Slika 9: Shematski prikaz tijeka kliničke i laboratorijske faze istraživanja

Slika 10: Klinički postupak očuvanja alveole nakon vađenja zuba.*

Slika 11: Uzimanje koštanog uzorka. (A) Trepan svrdlo u maksili. (B) Trepan svrdlo s koštanim uzorkom.

Slika 12: CBCT protokol. Bukolingvalna dimenzija mjerena je između najistaknutijih točaka bukalno i oralno (ljubičasto označena linija) u dvije vremenske točke — prije ekstrakcije (A) i četiri mjeseca nakon (B).

Slika 13: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova koštanih uzoraka dobivenih iz grebena alveolarne kosti nakon augmentacije s autolognim dentinom. A – (muškarac 54g., maksila); B - (žena 38g., maksila); C - (muškarac, 56g. maksila). Biomaterijal (BM); Novostvorena kost (NK). Hematoxylin-eosin, povećanje 100X.

Slika 14: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova koštanih uzoraka dobivenih iz grebena alveolarne kosti nakon augmentacije s goveđim koštanim biomaterijalom+autologna kost (Cerabone+ak). A - (žena 48g., maksila); B - (žena 54g., maksila); C - (žena 57g. maksila). Biomaterijal (BM); Novostvorena kost (NK). Hematoxylin-eosin, povećanje 100X.

Slika 15: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova koštanih uzoraka dobivenih iz grebena alveolarne kosti nakon augmentacije s goveđim koštanim biomaterijalom (Cerabone). A - (žena 57g., maksila); B - (muškarac 49 g., mandibula); C - (žena 54 g. maksila). Biomaterijal (BM); Novostvorena kost (NK). Hematoxylin-eosin, povećanje 100X.

Slika 16: Mikro-CT rekonstruirane slike alveolarnog koštanog tkiva. A – autologni dentin; B - goveđi koštani biomaterijal (Cerabone); C - goveđi koštani biomaterijal s autolognom kosti (Cerabone +Ak). Povećanje je 2000 x 2000 px.

Slika 17: Mikro-CT rekonstruirane slike alveolarnog koštanog tkiva. A – autologni dentin; B - goveđi koštani biomaterijal (Cerabone); C - goveđi koštani biomaterijal s autolognom kosti (Cerabone +Ak). Povećanje je 2000 x 2000 px.

Slika 18: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova dekalciniranih uzoraka koštanog tkiva alveolarne kosti (povećanje 200x)– Dentin(A); Ksenogeni biomaterijal (B); Ksenogeni biomaterijal +ak (C).

Slika 19: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova dekalciniranih uzoraka koštanog tkiva alveolarne kosti (povećanje 200x) – Dentin(A); Ksenogeni biomaterijal (B); Ksenogeni biomaterijal +ak (C).

Slika 20: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova dekalciniranih uzoraka koštanog tkiva alveolarne kosti (povećanje 200x) – Dentin(A); Ksenogeni biomaterijal (B); Ksenogeni biomaterijal +ak (C).

Slika 21: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova dekalciniranih uzoraka koštanog tkiva alveolarne kosti (povećanje 200x)– Dentin(A); Ksenogeni biomaterijal (B); Ksenogeni biomaterijal +ak (C).

Slika 22: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova dekalciniranih uzoraka koštanog tkiva alveolarne kosti (povećanje 200x)– Dentin(A); Ksenogeni biomaterijal (B); Ksenogeni biomaterijal +ak (C).

Slika 23: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova dekalciniranih uzoraka koštanog tkiva alveolarne kosti (povećanje 400x)– Dentin(A); Ksenogeni biomaterijal (B); Ksenogeni biomaterijal +ak (C).

Slika 24: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova dekalciniranih uzoraka koštanog tkiva alveolarne kosti (povećanje 200x)– Dentin(A); Ksenogeni biomaterijal (B); Ksenogeni biomaterijal +ak (C).

Slika 25: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova dekalciniranih uzoraka koštanog tkiva alveolarne kosti (povećanje 200x)– Dentin(A); Ksenogeni biomaterijal (B); Ksenogeni biomaterijal +ak (C).

Slika 26: Reprezentativni prikaz mikrofotografija tkivnih rezova dekalciniranih uzoraka koštanog tkiva alveolarne kosti (povećanje 200x) – Dentin(A); Ksenogeni biomaterijal (B); Ksenogeni biomaterijal +ak (C).

Slika 27: Reprezentativni prikaz dvostruke imunofluorescentne metode obilježavanja M1 makrofaga u skupini autologni dentin (ADG) Strelice(↑) prikazuju kolokalizaciju CD68 i iNOS markera za ekspresiju M1 staničnog fenotipa. Plavo -ukupan broj stanica; Plavo/zeleno-ukupan broj CD68; Plavo/zeleno/crveno – ukupan broj CD68/iNOS.

Slika 28: Reprezentativni prikaz dvostruke imunofluorescentne metode obilježavanja M1 makrofaga u skupini govedeg koštanog biomaterijala Cerabone (BX). Strelice(↑) prikazuju kolokalizaciju CD68 i iNOS markera za ekspresiju M1 staničnog fenotipa. Plavo -ukupan broj stanica; Plavo/zeleno-ukupan broj CD68; Plavo/zeleno/crveno – ukupan broj CD68/iNOS.

Slika 29: Reprezentativni prikaz dvostruke imunofluorescentne metode obilježavanja M1 makrofaga u skupini govedeg koštanog biomaterijala + autologna kost, Cerabone+ak (BX+AB). Strelice(↑) prikazuju kolokalizaciju CD68 i iNOS markera za ekspresiju M1 staničnog fenotipa. Plavo -ukupan broj stanica; Plavo/zeleno-ukupan broj CD68; Plavo/zeleno/crveno – ukupan broj CD68/iNOS.

Slika 30: Reprezentativni prikaz dvostruke imunofluorescentne metode obilježavanja M2 makrofaga u skupini autologni dentin (ADG). Strelice(↑) prikazuju kolokalizaciju CD68 i CD206 markera za ekspresiju M2 staničnog fenotipa. Plavo -ukupan broj stanica; Plavo/zeleno-ukupan broj CD68; Plavo/zeleno/crveno – ukupan broj CD68/CD206.

Slika 31: Reprezentativni prikaz dvostruke imunofluorescentne metode obilježavanja M2 makrofaga u skupini goveđi koštani biomaterijal Cerabone (BX). Strelice(↑) prikazuju kolokalizaciju CD68 i CD206 markera za ekspresiju M2 staničnog fenotipa. Plavo -ukupan broj stanica; Plavo/zeleno-ukupan broj CD68; Plavo/zeleno/crveno – ukupan broj CD68/CD206.

Slika 32: Reprezentativni prikaz dvostruke imunofluorescentne metode obilježavanja M2 makrofaga u skupini goveđi koštani biomaterijal +autologna kost, Cerabone+ak (BX+AB). Strelice(↑) prikazuju kolokalizaciju CD68 i CD206 markera za ekspresiju M2 staničnog fenotipa. Plavo -ukupan broj stanica; Plavo/zeleno-ukupan broj CD68; Plavo/zeleno/crveno – ukupan broj CD68/CD206.

7.2 Popis tablica

Tablica 1: Prikazani su rezultati CBCT mjerenja dimenzija alveolarnog grebena.

Tablica 2: Prikazani su rezultati koštane histomorfometrije.

Tablica 3: Prikazani su rezultati mikro-CT analize.

Tablica 4: Prikazane su vrijednosti intenziteta imunohistokemijske ekspresije TNF- α i BMP-4. Srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD).

Tablica 5: Prikazane su vrijednosti intenziteta imunohistokemijske ekspresije VEGF-a i HO-1 e. Srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD).

Tablica 6: Prikazane su vrijednosti intenziteta imunohistokemijske ekspresije BMP-7 i TGF β -1. Prikazane su srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD).

Tablica 7: Prikazane su vrijednosti intenziteta imunohistokemijske ekspresije SMAD-1/5/8 i SMAD-2/3. Prikazane su srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD).

7.3 Popis grafova

Graf 1: Prikaz postotka M1/M1MNGC staničnog fenotipa u skupinama: autologni dentin (ADG); goveđi koštani biomaterijal (GK); goveđi koštani biomaterijal+autologna kost (GK+AK).

Graf 2: Prikaz postotka M2/M2MNGC staničnog fenotipa u skupinama: autologni dentin (AD); goveđi koštani biomaterijal (GK); goveđi koštani biomaterijal+autologna kost (GK+AK).

7.4 Popis pokrata

PTH – parathormon (engl. Parathyroid hormone; PTH)

OPG - osteoprotegrin

RANK - receptor aktivator nuklearnog činitelja κ B (engl. receptor activator of nuclear factor κ B)

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

M-CSF - makrofagni činitelj stimulacije kolonija (engl. macrophage colony-stimulating factor)

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

IL-4 – Interleukin 4 (engl. *interleukin-4*)

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

IL-13 – Interleukin 13 (engl. *interleukin-13*)

TNF- α - Faktor tumorske nekroze α (engl. Tumor Necrosis Factor α)

TGF- β - transformirajući činiteljem rasta tip β (engl. Transforming growth factor β)

Runx2 - runt-povezan transkripcijski činitelj 2 (engl. runt-related transcription factor 2)

BMP - koštani morfogenetski protein (engl. bone morphogenetic protein).

IGF - inzulinu sličan činitelj rasta (engl. insulin like growth factor)

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

HAP/HA – Hidroksiapatit (lat. Crystallum hydroxyapatiti; engl. hydroxyapatite)

OFE - odontološki funkcionalni entitet (engl. odontologic functional entity)

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

PDGF - faktor rasta podrijetlom od trombocita (engl. platelet-derivde growth factor)

FGF - faktor rasta fibroblasta (engl. fibroblast growth factor)

Osx - Osterix (engl. transcriptionsal factor Sp7 – Osterix))

OC - osteokalcin (engl. osteocalcin)

VEGF - vaskularni endotelni faktora rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)

SOST - sklerostin (engl. sclerostin)

HO – 1 - hemoksigenaza 1 (engl. Heme oxygenase 1)

PG – Prostaglandin (engl. Prostaglandine)

COX – ciklooksigenaza (engl. Cyclooxygenase)

PTHrP - Paratireoidni hormon povezani proteina (engl. Parathyroid hormone-related protein)

GBR - vođena regeneracija kosti (engl. Guided Bone regeneration)

PTFE - politetrafluoretilenska membrana (engl. polytetrafluorethylene)

EPTFE - ekspanzirana politetrafluoretilenske membrane (engl. expanded polytetrafluoroethylene)

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

IGF-II - inzulinu sličan faktor rasta 2 (engl. Insulin like growth factor)

OPN - osteopontin (engl. osteopontin), osteokalcina

BSP - koštani sijaloprotein (engl. bone sialoprotein)

TCP - trikalcijfosfat (engl. tricalcium phosphate)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

MNGCs - Multinuklearne orijaške stanice (engl. Multinuclear Giant Cells)

BMGC - Multinuklearne orijaške stanice koje se povezuju s odgovorom na biomaterijal (engl. Biomaterial-associated Multinuclear Giant Cells)

CBCT – kopjuterizirana tomografija konusnim snopom (engl. Cone Beam Computed Tomography).

Mikro-CT - Mikro-kompjuterizirana tomografija

AD – autologni dentin

GK – goveđi koštani biomaterijal

MK – meko tkivo

BTCP – beta trikalcij fosfat

7.5 Životopis

Matko Oguić, dr. med. dent.

OSOBNNE INFORMACIJE

Kućna adresa: Tizianova 29, 51000 Rijeka, Hrvatska

E-adresa: matko.oguc@gmail.com

Telefonski broj: +385 98 177 5022

Spol: Muško

Državljanstvo: hrvatsko

RADNO ISKUSTVO

[03/2024 – Trenutačno]

Član uprave i direktor

Poliklinika Rident, Rijeka

[01/2019 – 02/2024]

Voditelj odjela oralne kirurgije

Poliklinika Rident, Rijeka

[06/2016 – 12/2018]

Doktor dentalne medicine

Poliklinika Rident

[2015]

Doktor dentalne medicine

Ordinacija Dentalne medicine Gordana Oguić, dr. med. dent, Rijeka

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

[2023-2025]

Executive Master in Business Administration, EMBA

Cotrugli Business School, Hrvatska

[10/2014 – Trenutačno]

Poslijediplomski doktorski studij – Biomedicinske znanosti

Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

[2009 – 2014]

Doktor dentalne medicine

Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

[2013]

Talijanski jezik – Istituto Michelangelo, Firenca

[2006]

Engleski jezik– St Giles International, London

JEZIČNE VJEŠTINE

Materinji jezik: hrvatski

Drugi jezici:

- engleski – C1/C2
 - talijanski – C1
 - njemački – B1
-

ORGANIZACIJSKE, KOMUNIKACIJSKE I POSLOVNE VJEŠTINE

Iskustvo u upravljanju zdravstvenom ustanovom, organizaciji rada multidisciplinarnog tima, strateškom planiranju i koordinaciji kliničkih procesa. Odlikuje se visokom razinom odgovornosti, inicijativnosti i samostalnosti u radu.

STRUČNE AKTIVNOSTI I PUBLIKACIJE

Autor više znanstvenih radova objavljenih u međunarodnim časopisima iz područja regeneracije koštanog tkiva, dentina kao biomaterijala te augmentacije alveolarnog grebena.

Sudionik i predavač na međunarodnim kongresima i stručnim edukacijama iz područja implantologije, regeneracije tvrdih i mekih tkiva i estetske dentalne medicine.

POSTIGNUĆA

- Dekanova nagrada – 2010., 2011., 2013., 2014.
 - Rektorova nagrada – najbolji student generacije Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, 2014.
-

ČLANSTVA

- Hrvatska dentalna komora
- Suosnivač Rotary kluba Rijeka Novi Val

- Osnivač i predsjednik Zaklade „Radivoje Bošnjaković“
 - Član uprave RK Zamet
-

OBJAVLJENI RADOVI

1. Matko Oguić, Marija Čandrlić, Matej Tomas, Bruno Vidaković, Marko Blašković, Ana Terezija Jerbić Radetić, Sanja Zoričić Cvek, Davor Kuiš and Olga Cvijanović Peloz. 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(7), 6440, [https://doi.org/10.3390/ijms24076440\(Q1,IF6.208\)](https://doi.org/10.3390/ijms24076440(Q1,IF6.208))
2. Jerbić Radetić AT, Zoričić Cvek S, Tomas M, Erjavec I, Oguić M, Perić Kačarević Ž and Cvijanović Peloz O. CSBD Healing in Rats after Application of Bovine Xenogeneic Biomaterial Enriched with Magnesium Alloy. *Int J Mol Sci.* 2021, 22(16), 9089; [https://doi.org/10.3390/ijms22169089.\(Q1, IF 5.923\)](https://doi.org/10.3390/ijms22169089.(Q1, IF 5.923))