

**UNIVERZITET U BEOGRADU
STOMATOLOŠKI FAKULTET**

Milka M. Živadinović

**ISPITIVANJE USPEŠNOSTI REGENERACIJE
KOSTNOG TKIVA NA MODELU KRITIČNOG
DEFEKTA KALVARIJE KUNIĆA SA
DIJABETES MELITUSOM TIP I**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

**UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE**

Milka M. Živadinović

**EVALUATION OF BONE REGENERATION IN
CRITICAL SIZED CALVARIAL DEFECTS IN
RABBITS WITH DIABETES MELLITUS
TYPE I**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

MENTOR

Prof. dr Božidar Brković

vanredni profesor Stomatološkog Fakulteta Univerziteta u Beogradu

KOMISIJA ZA OCENU I ODBRANU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

Prof. dr Snježana Čolić

vanredni profesor Stomatološkog Fakulteta Univerziteta u Beogradu

Doc. dr Jelena Roganović

docent Stomatološkog Fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr Verica Milošević

naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” Univerziteta u Beogradu

DATUM ODBRANE

Želela bih da se zahvalim svima koji su dali svoj doprinos u izradi ove doktorske disertacije.

Prof. dr Božidaru Brkoviću, mom dragom mentoru, izražavam posebnu zahvalnost, na dragocenoj pomoći u svim fazama izrade moje doktorske teze, od izbora teme, do njenog konačnog oblikovanja. Korisnim sugestijama i podsticajima, kao i velikim ličnim angažovanjem prof. dr Božidar Brković dao je nemerljiv doprinos mom radu.

Prof. dr Snježani Čolić, poštovanom predsedniku komisije, dugujem veliku zahvalnost na posvećenosti i podršci, koji su mi bili neizmerno značajni u toku izrade ove doktorske disertacije.

Naučnom savetniku Dr Verici Milošević, rukovodiocu Odeljenja citologije, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, posebno zahvaljujem na stručnom usmeravanju i korisnim sugestijama, koje su mi mnogo pomogle u definitivnoj izradi ovog rada.

Dr Milici Manojlović-Stojanoski, Naučnom savetniku Odeljenja citologije, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, dugujem veliku zahvalnost na divnoj saradnji i bezrezervnoj pomoći u toku histološke i histomorfometrijske analize.

Doc. dr Jeleni Roganović, dragom članu komisije, zahvaljujem na ogromnoj pomoći u izvođenju eksperimentalnih postupaka, kao i na korisnim savetima i sugestijama.

Doc. dr Miroslavu Andriću sam neizmerno zahvalna na predivnoj saradnji i pomoći u hirurškom delu eksperimentalnog istraživanja.

Prof. dr Vesni Danilović dugujem zahvalnost na savetima i pomoći u toku histološke analize.

Prof. dr Branislavu Prokiću i Bogomiru Prokiću sa Fakulteta veterinarske medicine, zahvaljujem na velikoj pomoći u radu sa eksperimentalnim životinjama.

Zaposlenima Odeljenja citologije, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” dugujem zahvalnost za podršku i svu pruženu pomoć.

Zaposlenima Klinike za oralnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu, kao i lekarima na specijalizaciji i doktorskim studijama, zahvaljujem na divnoj saradnji i kolegijalnosti.

I naposljetku, sa najvećom pažnjom, najtoplije zahvaljujem mojoj porodici za svu pruženu ljubav, razumevanje i podršku.

Milka Živadinović

ISPITIVANJE USPEŠNOSTI REGENERACIJE KOSTNOG TKIVA NA MODELU KRITIČNOG DEFEKTA KALVARIJE KUNIĆA SA DIJABETES MELITUSOM TIPI

SAŽETAK

Uvod: Kostno tkivo je mineralizovano i visoko vaskularizovano vezivno tkivo koje ima jedinstvenu sposobnost zarastanja, sa potpunim obnavljanjem svoje strukture i funkcije, koje se odvija procesom regeneracije kosti. Imajući u vidu ovaj složeni biološki proces, zarastanje kostnog tkiva se odvija u nekoliko faza intramembranoznog tipa osifikacije, i to: faza inflamacije i stvaranja centara osifikacije u vezivnom tkivu, potom faza stvaranja osteoida tj. nemineralizovanog matriksa kosti, faza stvaranja nezrele novoformirane kosti, faza stvaranja periosta i faza primarnog stvaranja kosti.

Osnovni biološki mehanizmi koji čine osnovu regeneracije kosti uključuju tri procesa: *osteogenezu*, *osteokondukciju* i *osteoindukciju*. U svojoj osnovi, proces *osteogeneze*, zasnovan na stvaranju centara nove kosti u fazama njenog zarastanja, jeste organizovan procesom *osteokondukcije*, odnosno stvaranja kostnog tkiva signalnim mehanizmima iz okolne kosti čime se obezbeđuje mobilizacija i prorastanje osteogenih ćelija na mestu regeneracije, i procesom *osteoindukcije*, tj. stvaranjem kostnog tkiva indukovano signalnim mehanizmima unutar kostnog defekta, diferencijacijom lokalnih nediferenciranih ćelija vezivnog tkiva u osteoblaste, fibroblaste i osteoklaste, pod uticajem jednog ili više induktivnih faktora.

Sinhronizovano, ćelijski (aktivnost faktora rasta) i tkivni (aktivnost ćelija kostnog tkiva) mehanizmi osteogeneze leže u osnovi fiziološkog procesa modelacije i remodelacije kostnog tkiva u toku njenog zarastanja, usled interakcije između ćelija kostnog tkiva, osteoinduktivnih faktora rasta, osteokonduktivnog matriksa i procesa vaskularizacije. S tim u vezi, faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF) je jedan od najznačajnijih signalnih molekula u procesu angiogeneze. Njegova uloga je važna u stimulaciji rasta i deobe endotelnih ćelija iz već postojeće vaskularne strukture u procesu regeneracije kostnog tkiva, kontroli propustljivosti krvnih sudova, zaštiti endotelnih ćelija od apoptoze i stimulaciji diferencijacije i proliferacije osteoprogenitornih ćelija. Takođe, transdukcionim mehanizmima preko stimulacije endotelnih ćelija, VEGF utiče na produkciju kostnog morfogenetskog faktora 2 (BMP2), za koji je poznato da, kao osnovni

osteogeni faktor rasta, ima važnu ulogu u stimulaciji diferencijacije mezenhimalnih stem ćelija u pravcu nastanka osteoblastima sličnih ćelija, kao i aktivnih osteoblasta i ćelija periosta. S druge strane, BMP2 modulira produkciju VEGF u endotelnim ćelijama, utičući tako na proces angiogeneze.

Imajući u vidu da se proces zarastanja kostnog tkiva pomenutim mehanizmima odvija zavisno od veličine defekta kosti, za veće defekte kritične veličine indikovana je primena regenerativne terapije autotransplantatima ili sintetskim biomaterijalima, kako bi, dodatno stimulisan, proces zarastanja bio uspešan. Ovo tim pre što autotransplanti kostnog tkiva imaju pored osteogenog, osteokondutivnog i osteoinduktivne karakteristike, za razliku od sintetskih materijala koji su osteokonduktivni. Dosadašnja istraživanja su pokazala visok stepen uspešnosti regenerativne terapije kritičnih defekta kosti primenom ovih materijala kod zdravih ispitanika.

S druge strane, kao faktor uspešnosti regenerativne terapije, jeste i prisustvo metaboličkih oboljenja, kao što je dijabetes melitus (DM). Ključni mehanizam, koji je odgovoran za otežano i usporeno zarastanje kostnog tkiva kod pacijenata sa DM, je supresija osteoblastogeneze, odnosno biološkog procesa stvaranja aktivnih osteoblasta, kojom je redukovana njihova aktivnost, diferencijacija i proliferacija. Pored i mikro i makrovaskularnih promena u DM, smanjena je i sinteza VEGF, koja direktno utiče na procese angiogeneze u zarastanju kostnog tkiva.

Cilj: Cilj ove doktorske disertacije je bio da se ispita i komparativno analizira uspešnost regenerativne terapije kosti, 4 nedelje posle primene autotransplantata (AUTO), beta-trikalcijum fosfata (β TKF) samog ili u kombinaciji sa hidroksiapatitom (β TKF/HA) na modelu kritičnih defekata kalvarije zdravih i kunića sa indukovanim DM tip I. Takođe, cilj ove disertacije je bio i da se kvantitativnom analizom utvrde i uporede vrednosti VEGF i BMP2 u novoformiranom kostnom tkivu posle primene pomenutih materijala za regeneraciju kritičnih defekata kosti.

Materijal i metod: Istraživanje je bilo sprovedeno u dva dela, kao preliminarno istraživanje i kao kontrolisano, komparativno istraživanje na kunićima soja Velika činčila, podeljenih u dve grupe: I) sa eksperimentalno indukovanim DM tip I primenom aloksana i.v. (n=11) i II) zdravi kunići (n=9). Svaka grupa je bila podeljena na četiri podgrupe zavisno od materijala koji se koristio za regeneraciju kostnog defekta:

I grupa - kostni defekt popunjen beta-trikalcijum fosfatom (β TKF),

II grupa - kostni defekt popunjen beta-trikalcijum fosfat/hidroksiapatitom (β TKF/HA),

III grupa - kostni defekt popunjen autotransplantatom (AUTO),

IV grupa - nepopunjen kostni defekt (kontrolni defekt koji spontano zarasta), (KON).

Model kritičnog defekta je hirurški kreiran na kalvarijama kunića, tako da je za popunjavanje jednog defekta korišćen autotransplantat kosti kalvarije uzet na mestu hirurške osteotomije, jedan defekt je ostao nepopunjen (kontrola) i dva su bila popunjena sa β TKF i β TKF/HA. Posle 4 nedelje, životinje su žrtvovane, a uzorci regenerisanog tkiva su uzeti za histološku i histomorfometrijsku analizu i određivanje koncentracije VEGF i BMP2.

Rezultati: Analizirano je tkivo kod ukupno 16 kunića, 8 sa DM tip I i 8 zdravih kunića. Histološka analiza kosti 4 nedelje posle primene materijala za regeneraciju je pokazala da primena AUTO dovodi do potpunog kostnog zarastanja defekta sa izraženijom trabekularnom strukturom kosti kod zdravih u odnosu na DM kuniće. Novoformirano kostno tkivo je bilo prisutno i u centralnim delovima defekta, dobro inkorporirano sa partikulama β TKF, kako kod zdravih tako i kod DM kunića, dok je kod grupa sa primenjenim β TKF/HA, novoformirano tkivo registrovano uglavnom na periferiji kritičnog defekta. Vezivno fibrozno tkivo je bilo prisutno u centralnim delovima defekata tretiranih sa β TKF, β TKF/HA i kontrolnim defektima u obe grupe kunića. Neresorbovani materijal je bio prisutan u centralnim delovima defekta dobro inkorporiran u novoformiranu kost ili u vezivno tkivo, češće prisutno u DM defektima kosti.

Dobijeni rezultati unutar grupe zdravih i kunića sa DM tip I, 4 nedelje posle regenerativne terapije, pokazali su značajno povećanje količine novoformirane kosti i kostne srži u defektima tretiranim AUTO u odnosu na rezultate dobijene u defektima posle primene β TKF, β TKF/HA i kontrolnoj grupi. Značajno manje vezivnog tkiva registrovano je i u defektima sa β TKF u odnosu na defekte tretirane sa β TKF/HA kod DM. Analiza prisustva neresorbovanih partikula materijala je pokazala značajnu razliku između β TKF/HA grupe i ostalih ispitivanih grupa, dok je procenat materijala bio podjednak u AUTO i β TKF. Razlika u procentu neresorbovanog materijala nije bila uočena između analiziranih grupa zdravih kunića. Komparativna analiza u uspešnosti regenerativne terapije između defekata kosti zdravih kunića i kunića sa indukovanim DM tip I je

pokazala da dijabetes melitus značajno redukuje procenat novoformirane kosti kada se kao materijal koristio AUTO i β TKF, što nije bio slučaj posle primene β TKF/HA. Međutim u dijabetičnim defektima regenerisanim sa β TKF/HA, bilo je prisutno značajno više neresorbovanog materijala u odnosu na iste defekte kod zdravih kunića, a što nije bio slučaj registrovan u drugim ispitivanim grupama.

Značajno povećanje VEGF i BMP2 je registrovano u kontrolnim defektima dijabetičnih kunića u odnosu na zdrave. Analiza unutar grupa je pokazala značajno povećanje VEGF kod zdravih kunića sa regenerativnom terapijom β TKF u odnosu na kontrolne defekte.

Zaključak: Komparativnom i kvantitativnom analizom je pokazano da je u uslovima postojanja DM tip I prisutno značajno smanjenje uspešnosti regeneracije kritičnog defekta kosti novoformiranim kostnim tkivom četiri nedelje posle regenerativne terapije defekta autotransplantatom i β -trikalcijum fosfatom, u odnosu na zdrave kuniće, kao i to da u grupi kunića sa DM tip I, oba pomenuta materijala, autotransplantat i β -trikalcijum fosfat, postižu bolju regeneraciju kosti u odnosu na β -trikalcijum fosfat u kombinaciji sa hidroksiapatitom i kontrolni defekt. Regenerativna terapija kritičnih defekata kosti β TKF zdravih kunića praćena je značajnim povećanjem VEGF što nije bio slučaj kada se primeni regenerativna terapija u uslovima DM tip I.

KLJUČNE REČI: regeneracija kostnog tkiva, eksperimentalno izazvan DM, kritični defekt kalvarije kunića, autotransplantat, β TKF.

NAUČNA OBLAST: Stomatološke nauke

UŽA NAUČNA OBLAST: Kliničke stomatološke nauke

UDK broj: 616.71-001-085.27:616.379-008.64(043.3)

EVALUATION OF BONE REGENERATION IN CRITICAL SIZED CALVARIAL DEFECTS IN RABBITS WITH DIABETES MELLITUS TYPE I

SUMMARY

Introduction: Bone tissue is mineralized and highly vascularized connective tissue that has the unique ability to heal by restoring its structure and function, which is done by the process of bone regeneration. Given this complex biological process, the bone tissue healing takes place in several stages of intramembraneous type of ossification, namely: phase of inflammation and the creation of centers of ossification in the connective tissue, then the phase of creating osteoid i.e. unmineralised bone matrix, the phase of creation of the immature newly formed bone and the periosteum and the stage of the primary bone formation.

The basic biological principles of bone regeneration involve three processes: osteogenesis, osteoinduction and osteoconduction. In essence, the process of osteogenesis based on the creation of centers of newly formed bone in the phases of healing, is organized by the process of osteoconduction and osteoinduction. Osteoconduction means the creation of bone tissue by the signaling mechanisms from the surrounding bone, ensuring mobilization and ingrowth of osteogenic cells at the site of regeneration. Osteoinduction implies formation of bone tissue by the signaling mechanisms induced within the bone defect, the differentiation of the local non-differentiated connective tissue cells into osteoblasts, osteoclasts, fibroblasts under the influence of one or more inductive factors.

Synchronized mechanisms of osteogenesis, which involve growth factor activity and cellular activity of bone tissue, underlie physiological process of bone tissue modeling and remodeling during the course of bone healing, due to the interaction between cells of bone tissue, osteoinductive growth factors, osteoconductive matrix and process of vascularization. In this regard, vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the most important signaling molecule in the process of angiogenesis. Its role is important in stimulating growth and differentiation of endothelial cells from pre-existing vascular structures in the process of regeneration of bone tissue and controlling the permeability of blood vessels. VEGF protect endothelial cells from apoptosis and stimulate differentiation and proliferation of osteoprogenitor

cells. Owing to transduction mechanisms through the stimulation of endothelial cells, VEGF affects the production of bone morphogenetic protein 2 (BMP2), for which it is known that, as a primary osteogenic growth factor, plays a major role in the stimulation of differentiation of mesenchymal stem cells in the osteoblasts-like cells, as well as in active osteoblasts and periosteal cells. On the other hand, BMP2 modulate VEGF production in endothelial cells, by having an impact on the process of angiogenesis.

Considering the fact that the healing process of bone tissue with aforementioned mechanisms takes place depending on the size of the bone defect, the use of regenerative therapy with autograft or synthetic biomaterials is indicated in larger critical sized bone defects. In addition, autotransplant of bone tissues has osteogenic, osteoinductive and osteoconductive properties, in contrast to synthetic materials that are only osteoconductive. Previous studies have shown a high success rate of the regenerative therapy of critical sized bone defect by using these materials in healthy subjects.

On the other hand, success rate of regenerative therapy depends on the presence of metabolic diseases, such as diabetes mellitus (DM). The key mechanism, which is responsible for the difficult and slow healing process of the bone tissue in patients with DM, is the suppression of osteoblastogenesis, or biological process of creating active osteoblasts, which reduces their activity, differentiation and proliferation. In addition to the microvascular and macrovascular changes in DM, the synthesis of VEGF is also reduced, which directly influence the process of angiogenesis involved in the healing of bone tissue.

Aim: The aim of this doctoral dissertation was to investigate and analyze the comparative performance of the regenerative therapy of bone, 4 weeks after use of autogenous bone (AUTO), beta-tricalcium phosphate (β TKF) alone or in combination with hydroxyapatite (β TKF/HA) on the model of critical sized calvarial defects of healthy and rabbits with induced DM type I. Further, the aim of this thesis was to determine and examine the value of VEGF and BMP2 in the newly formed bone tissue after application of the aforementioned materials for regeneration of critical sized bone defects.

Materials and Methods: The study was conducted in two parts, as a preliminary study and as a controlled, comparative study in giant chinchilla rabbits, divided into two groups: I) with

experimentally induced diabetes mellitus type I using alloxan i.v. (n=11) and II) healthy rabbits (n=9). Each group was divided into four groups depending on the material used for the regeneration of bone defects:

I group - the bone defect filled with beta-tricalcium phosphate (β TKF),

II group - bone defect filled with beta-tricalcium phosphate / hydroxyapatite (β TKF/HA),

III group - bone defect filled with autogenous bone (AUTO),

IV group - unfilled bone defect (control defect that healed spontaneously) (KON).

The critical sized defects were surgically created on rabbits calvaria. One defect was filled with autogenous bone graft taken at the site of surgical osteotomy, one remained unfilled (control) and two had been filled with β TKF and β TKF/HA. After 4 weeks, the animals were sacrificed and the samples of the regenerated tissues were taken for histological and histomorphometric analysis and determination of the concentration of VEGF and BMP2.

Results: We analyzed tissue in a total of 16 rabbits, 8 with DM type I and 8 healthy rabbits. Histological analysis of the bone tissue, 4 weeks after the use of materials for regeneration has shown that the use of AUTO led to complete healing of the bone defect with more prominent trabecular bone structure in healthy as compared to DM rabbits. Newly formed bone was also present in the central parts of the defect, well incorporated with the particles of β TKF, both in healthy and in DM rabbits, while in the group with the applied β TKF/HA, a newly formed bone tissue was registered mainly in the periphery of the critical defect. Connective fibrous tissue was present in the central parts of the defects treated with β TKF, β TKF/HA and control defects in both groups of rabbits. Residual graft material was present in the central parts of the defect, well incorporated into newly formed bone or connective tissue, often present in DM bone defects.

The results obtained in a group of healthy rabbits and rabbits with DM type I, 4 weeks after the regenerative therapy, showed a significant increase in the amount of newly formed bone and bone marrow defects treated with AUTO compared to the results obtained after the use of β TKF, β TKF/HA and the control group. Significantly less connective tissue is registered in the defect with β TKF compared to defects treated with β TKF/HA in DM. Analysis of residual graft particles showed a significant difference between the β TKF/HA group and the other examined groups, while an equal percentage of the material was present in the AUTO and β TKF defects. The difference in the percentage of residual graft particles was not observed between the

analyzed groups of healthy rabbits. Comparative analysis of the performance of regenerative therapies between bone defects of healthy rabbits and rabbits with induced DM type I, found that diabetes significantly reduces the percentage of newly formed bone when AUTO and β TKF were used, which was not the case after the application β TKF/HA. However, significantly more residual graft particles were present in diabetic defects regenerated with β TKF/HA, compared with the same defects in healthy rabbit, which was not the case registered in other test groups.

The significant increase in concentration of VEGF and BMP2 is registered in the control defects of diabetic rabbits compared to the healthy. Analysis within the groups showed a significant increase in VEGF in healthy rabbits where β TKF was used, compared to control defects.

Conclusion: A comparative quantitative analysis demonstrated that DM type I significantly reduces regeneration of critical sized defect with newly formed bone tissue, four weeks after the use of autograft and β -tricalcium phosphate, compared to healthy rabbits. In rabbits with DM type I, autograft and β -tricalcium phosphate, achieve a better regeneration of the bone in relation to β -tricalcium phosphate in combination with hydroxyapatite and control defect. Regenerative therapy of critical bone defects after the use of β TKF in healthy rabbits is accompanied by a significant increase in VEGF, what was not the case after the use of regenerative therapy in DM type I.

KEY WORDS: regeneration of bone tissue, experimentally induced DM, critical sized rabbit calvarial defect, autogenous bone graft, β TKF.

SCIENTIFIC FIELD: Dental Sciences

SPECIFIC SCIENTIFIC FIELD: Clinical Dental Sciences

UDC: 616.71-001-085.27:616.379-008.64(043.3)

SADRŽAJ

UVOD.....	1
Regeneracija kostnog tkiva.....	2
Tkivni mehanizmi u regeneraciji kostnog tkiva	4
Ćelijski mehanizmi u regeneraciji kostnog tkiva (VEGF i BMP2).....	6
Autotransplantati i sintetički materijali u regeneraciji kostnog tkiva.....	8
Dijabetes melitus (DM) i regeneracija kostnog tkiva.....	11
Model kritičnog defekta kalvarije kunića.....	14
CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	16
RADNA HIPOTEZA.....	18
MATERIJAL I METOD.....	20
Uslovi eksperimentalnog rada na laboratorijskim životinjama.....	21
Dizajn studije.....	21
Dizajn preliminarnog istraživanja.....	22
Protokoli preliminarnog istraživanja.....	22
Dizajn kontrolisanog istraživanja.....	24
Eksperimentalne grupe.....	24
Eksperimentalno izazvan DM kod kunića.....	25
Ispitivani materijali za regeneraciju kostnog tkiva.....	26
Eksperimentalni model kritičnog defekta kostnog tkiva.....	26
Postoperativna kontrola, žrtvovanje životinja i uzimanje uzorka kosti.....	31

Priprema tkiva za histološku analizu.....	32
Histološka analiza kostnog tkiva.....	35
Histomorfometrijska analiza kostnog tkiva.....	36
Priprema uzoraka za određivanje VEGF-a i BMP2.....	37
Eksperimentalni protokol za ELISA.....	38
Statistička obrada podataka.....	40
REZULTATI.....	41
Preliminarna studija.....	42
Histološka analiza.....	42
Histomorfometrijska analiza.....	45
Kontrolisana, komparativna studija.....	46
Deskriptivne makroskopske karakteristike uzorka.....	46
Histološka analiza.....	46
Kostni defekti tretirani sa β TKF.....	47
Kostni defekti tretirani sa β TKF/HA.....	50
Kostni defekti tretirani sa AUTO.....	52
Kontrolni kostni defekt.....	55
Histomorfometrijska analiza.....	58
Kvantitativna analiza VEGF i BMP2.....	62
DISKUSIJA.....	64
ZAKLJUČCI.....	79
LITERATURA.....	82

UVOD

Regeneracija kostnog tkiva

Kostno tkivo je mineralizovano i visoko vaskularizovano vezivno tkivo koje ima jedinstvenu sposobnost zarastanja sa potpunim obnavljanjem svoje strukture i funkcije, koje se odvija procesima modelacije, remodelacije i regeneracije (Sommerfeldt 2001).

Sa fiziološkog aspekta, postoje dva osnovna tipa zarastanja kostnog tkiva, enhondralni i intramembranozni tip zarastanja. Osnovna razlika između ova dva tipa osifikacije je u činjenici da je kod enhondralnog tipa zarastanja prisutna faza formiranja i resorpcije hrskavice, koja prethodi formiranju kostnog tkiva, za razliku od intramembranoznog tipa, gde se kost formira direktnom apozicijom u vezivnom tkivu, bez prethodnog stvaranja hrskavice. Enhondralna osifikacija je prisutna kod kostiju izvan orofacijalne regije i odgovorna je za rast i razvoj dugih kostiju, kao i za zarastanje preloma kosti. S druge strane, fiziološko zarastanje kostiju orofacijalne regije pripada intramembranoznom tipu osifikacije i prisutno je kako posle preloma kostiju lica i glave, tako i posle regenerativne terapije. Intramembranozni tip zarastanja kosti prolazi kroz sledeće faze: faza inflamacije i stvaranja centara osifikacije u vezivnom tkivu, potom faza stvaranja osteoida tj. nemineralizovanog matriksa kosti, faza stvaranja nezrele novoformirane kosti, faza stvaranja periosta i faza primarnog stvaranja kosti. Nadalje, intramembranozni tip osifikacije obuhvata dva osnovna biološka mehanizama zarastanja. Kao prvi od mehanizama, predstavljen je mehanizam modelacije novoformiranog kostnog tkiva, odnosno stvaranje kosti iz nemineralizovanog matriksa, osteoida, do mineralizovane forme nove kosti. Naredni mehanizam zarastanja, koji se inače nadovezuje na proces modelacije, jeste remodelacija novoformiranog tkiva, a što se odnosi na konstantne promene volumena kosti sa aspekta njene resorpcije i apozicije. Iako kostno tkivo pokazuje veliki regenerativni potencijal i može u potpunosti obnoviti originalnu strukturu i funkciju, kostni defekti često ne uspevaju u potpunosti zarasti kostnim tkivom. Upravo da bi se omogućilo i podstaklo zarastanje, u defekte se stavljaju materijali za regeneraciju kostnog tkiva, a to podrazumeva regenerativnu terapiju kosti.

Osnovni biološki mehanizmi regeneracije kosti uključuju tri osnovna procesa: *osteogenezu*, *osteokondukciju* i *osteoindukciju*.

Osteogeneza jeste biološki proces zarastanja kostnog tkiva čiji se mehanizmi pokreću delovanjem osteoblasta i prekursorskih osteoblasta u samom defektu kosti, ili kojim se fiziološki aktivni osteoblasti transplantiraju u defekte kosti zajedno sa biološkim materijalom za regeneraciju (Sheik i sar. 2015). U svojoj osnovi, proces osteogeneze je zasnovan na stvaranju centara nove kosti u fazama njenog zarastanja ili regeneracije. Naime, pokazano je da osteoprogenitorne ćelije domaćina infiltrišu mesto prijema autotransplantata, kao i materijala za terapijski postupak regeneracije, u toku prvih 7 dana zarastanja kosti, odnosno vremenskog perioda rane, početne osteogeneze (Goldberg 2000).

Sa druge strane, faktori rasta koji su neophodni za proces osteogeneze, mogu biti prisutni u materijalu za regeneraciju, regiji prijema materijala i krvnim sudovima. Brojna klinička istraživanja su pokazala da spongiozni autotransplantati ekstraoralnog ilijačnog ili intraoralnog porekla imaju snažan osteogeni potencijal u regenerativnoj terapiji kostnih defekata (Hiatt i sar. 1978, Buser i sar. 1996).

Osteokondukcija je proces koji nastaje kada materijal za transplantaciju služi kao trodimenzionalni nosač za urastanje krvnih sudova i prekursorskih ćelija kosti u defekt (Goldberg i sar. 1987). Zahvaljujući ovom biološkom procesu, uspešno se primenjuju materijali koji se koriste u regenerativnoj terapiji kostnog tkiva (Cornell 1999). Struktura i dizajn materijala su važni faktori koji doprinose procesu osteokondukcije (Sheikh i sar. 2015). Materijali koji imaju hemijsku strukturu najbližnju kostnom tkivu, obezbediće adekvatnu ćelijsku osteogenu diferencijaciju. Takođe, makroporoznost, mikroporoznost i interkonekcija među porama materijala, značajno utiču na potencijal osteokondukcije. Visok stepen poroznosti omogućuje prorastanje krvnih sudova i apoziciju kostnog matriksa (Mastrogiacomo i sar. 2006).

Osteoindukcija jeste proces stvaranja nove kosti diferencijacijom lokalnih nediferenciranih ćelija vezivnog tkiva u osteoblaste, fibroblaste i osteoklaste, pod uticajem jednog ili više induktivnih faktora. Proces osteoindukcije u velikoj meri zavisi od faktora rasta, naročito u toku rane faze kostne regeneracije (Boyne 1988). Faktori rasta koji utiču na proces formiranja nove kosti deluju na proliferaciju fibroblasta i osteoblasta, produkciju ekstracelularnog matriksa, diferencijaciju mezenhimalnih ćelija i stvaranje krvnih sudova (Sheikh i sar. 2015).

Često su sva tri mehanizma stvaranja kosti uključena u regeneraciju i definišu tri osnovna uslova koja su neophodna u regenerativnoj terapiji kostnog tkiva:

- prisustvo osteoblasta, ćelija koje stvaraju kost ili ćelija sa sposobnostima diferencijacije u osteoblaste,
- prisustvo osteoinduktivnih stimulusa za inicijaciju diferencijacije mezenhimalnih ćelija u osteoblaste,
- prisustvo osteokonduktivne sredine koja će omogućiti prorastanje vezivnog tkiva i unutar koje će se osteoprogenitorne ćelije diferencirati u osteoblaste i stvarati novu kost.

Regeneracija kostnog tkiva predstavlja složen i dinamičan fiziološki proces koji se zasniva na molekularnim, ćelijskim i biološkim mehanizmima osteoindukcije (stvaranje kostnog tkiva indukovano signalnim mehanizmima unutar kostnog defekta) i osteokondukcije (stvaranje kostnog tkiva signalnim mehanizmima iz okolne kosti), čiji je cilj potpuna regeneracija kosti bez stvaranja ožiljnog tkiva (Dimitrou i sar. 2011, Kanzler i sar. 2008).

Tkivni mehanizmi u regeneraciji kostnog tkiva

Osnovu regeneracije kostnog tkiva čine funkcionalni, tkivni mehanizmi ćelija kosti. Ćelije značajne za proces regeneracije kostnog tkiva su osteoprogenitorne ćelije, osteoblastima slične ćelije, aktivni osteoblasti, osteociti i osteoklasti.

Osteoprogenitorne ćelije su multipotentne ćelije čijom diferencijacijom, pod uticajem različitih faktora, mogu nastati osteoblasti (Barrere i sar. 2006). Smeštene su u unutrašnjem celularnom sloju periosta, oblažu Haverzove kanale i endosteum, a mogu se u veoma malom procentu izolovati iz kosne srži (Block 2005).

Osteoblasti su mononuklearne ćelije koje vode poreklo od mezenhimalnih progenitornih ćelija. Nalaze se na površini kosti, kuboidalnog su oblika i odgovorni su za produkciju i mineralizaciju kostnog matriksa čija sinteza se odvija u dve faze (Capulli i sar. 2014). U prvoj fazi osteoblasti proizvode kolagen (uglavnom tip I), nekolagene proteine (osteokalcin, osteonektin, kostni sijaloprotein i osteopontin) i proteoglikane (dekorin i biglikan) koji zajedno formiraju organski matriks, čijom se mineralizacijom u drugoj fazi formira kostni matriks. Pored navedenog, u okviru organskog matriksa prisutni su i različiti faktori rasta, kao što je BMP2, koji doprinose

aktivaciji, diferencijaciji i proliferaciji kostnih ćelija kao i regeneraciji kostnog tkiva (Aszódi i sar. 2000). Neorgansku komponentu matriksa čine joni kalcijuma, fosfora, magnezijuma, kalijuma, natrijuma, bikarbonata i citrata. Najvažniji su joni kalcijuma i fosfata jer obrazuju kristale hidroksiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) koji mogu biti u obliku tankih pločica ili štapića i postavljeni su paralelno sa kolagenim vlaknima.

Osteoblastima slične ćelije ili linijske kostne ćelije su ustvari osteoblasti u stanju mirovanja, pljosnatog su oblika i nalaze se na površini kosti gde nema resorpcije ni produkcije novog kostnog tkiva (Miller i sar.1989). Njihova funkcija nije u potpunosti razjašnjena, ali je pokazano da ove ćelije mogu da spreče direktnu interakciju između osteoklasta i kostnog matriksa u cilju sprečavanja procesa resorpcije kosti (Andersen i sar. 2009). U zavisnosti od fiziološkog stanja kostnog tkiva ove ćelije mogu ponovo dobiti sekretornu aktivnost, povećati svoju veličinu i dobiti kuboidalan oblik (Donahue i sar.1995).

Osteociti su najzastupljenije ćelije kostnog tkiva. Nalaze se u lakunama okružene mineralizovanim kostnim matriksom, gde pokazuju dendritičnu morfologiju. Potiču od mezenhimalnih progenitornih ćelija, jer nastaju diferencijacijom osteoblasta. Osteociti u lakunama su međusobno povezani putem svojih citoplazmatičnih produžetaka zahvaljujući lakuno-kanalikularnom sistemu (Manolagas i sar. 2006). Ovaj sistem je, pored metaboličke aktivnosti, odgovoran za mehaničko-senzornu funkciju osteocita, jer ima sposobnost da detektuje mehanički pritisak i time pomaže adaptaciju kosti na opterećenje (Rocheftort i sar. 2010). Osteociti na površini autotransplantata preživljavaju i ishranjuju se procesom difuzije (Goldberg 2000).

Osteoklasti su multinuklearne džinovske ćelije koje potiču od ćelija monocitno-makrofagne loze hematopoetičnog sistema. Smešteni su na površini kostnog tkiva u ulegnućima koja se nazivaju Haušipove lakune i koje sami osteoklasti stvaraju. Pokretne su ćelije pa im je i oblik promenljiv. Sintetišu hidrolitičke enzime čime obavljaju proces resorbovanja i demineralizacije koštanog matriksa tokom rasta i remodeliranja.

Proces remodelacije i regeneracije kostnog tkiva odigrava se zahvaljujući sinhronizovanoj aktivnosti osteoblasta, osteocita i osteoklasta.

Ćelijski mehanizmi u regeneraciji kostnog tkiva (VEGF i BMP2)

Proces regeneracije kostnog tkiva podrazumeva koordiniranu interakciju između ćelija, osteoinduktivnih faktora rasta, osteokonduktivnog matriksa i procesa vaskularizacije (Carofino i sar. 2008). Faktori rasta su solubilni signalni molekuli koji stimulišu rast ćelija, migraciju, diferencijaciju i angiogenezu (Heckman i sar.1999, Street i sar. 2002). Proces regeneracije kosti se odvija pod uticajem različitih faktora rasta, kao što su faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF) i kostni morfogenetski protein 2 (BMP2), koji predstavljaju primarne ćelijske faktore u procesu angiogeneze i osteogeneze (Grellier i sar. 2009). Sinergetski efekat između VEGF i BMP2 ima snažan uticaj na regeneraciju kostnog tkiva (Kempen i sar. 2009).

Vaskularni endotelni faktor rasta je najjači i najznačajniji stimulator angiogeneze. Opstanak i mitozu endotelnih ćelija, jedna od osnovnih funkcija VEGF, je odgovorna za indukciju angiogeneze, u brojnim fiziološkim (embrionalni razvoj, skeletni rast) i patološkim stanjima (mikrovaskularne i makrovaskularne komplikacije dijabetes melitusa), (Wirotko i sar. 2008). Uticaj VEGF-a na povećanje vaskularne permeabilnosti i vazodilatacije je funkcija koja ukazuje na značajnu ulogu ovog molekula u inflamaciji i drugim patološkim stanjima (Ferrara i sar. 2004).

U procesu regeneracije kosti, angiogenezu zauzima centralno mesto (Schipiani i sar. 2009). S tim u vezi, vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) je jedan od najznačajnijih signalnih molekula u procesu angiogeneze. Prisustvo VEGF kao ključnog faktora angiogeneze u ranim fazama zarastanja pokazano je u mnogobrojnim studijama (Brown i sar. 2002, Kumar i sar. 2009). Osnovna uloga VEGF je stimulacija rasta i deobe endotelnih ćelija, pa stoga, VEGF ima značajan uticaj na proces stvaranja novih krvnih sudova iz već postojeće vaskularne strukture u kostnom tkivu u procesu njegove regeneracije (Pandya i sar. 2006, Neufeld i sar. 1999). Pored značajne mitogene aktivnosti, VEGF učestvuje i u kontroli propustljivosti krvnih sudova, kao i zaštiti endotelnih ćelija od apoptoze (Makinen i sar. 2001). Dosadašnja *in vivo* ispitivanja su pokazala pojačanu ekspresiju VEGF u novoformiranom kostnom tkivu u prvih šest nedelja kostnog zarastanja na modelu kritičnih defekata kalvarije kunića (Fok i sar. 2008).

Pored angiogeneze, VEGF ima značajan efekat i na proces osteogeneze, stimulišući migraciju osteoblasta i diferencijaciju osteoprogenitornih ćelija (Yang i sar. 2012). Štaviše, Street i sar.

(2002) su pokazali da VEGF ima snažan osteoinduktivni efekat, jer pored angiogeneze utiče na migraciju osteoblasta i proces mineralizacije kostnog matriksa. Takođe, transdukcionim mehanizmima preko stimulacije endotelnih ćelija, VEGF utiče na produkciju kostnog morfogenetskog faktora 2 (BMP2) (Matsubara i sar. 2012), za koji je poznato da, kao osnovni osteogeni faktor rasta, ima važnu ulogu u fiziološkoj regeneraciji kostog tkiva (Rosen 2009).

Kostni morfogenetski proteini (BMP) su multifunkcionalni faktori rasta koji su identifikovani zahvaljujući činjenici da mogu inicirati ektopično formiranje kosti na animalnom modelu (Urist 1965). Oni indukuju proces formiranja kostnog tkiva zahvaljujući procesima hemotakse, proliferacije i diferencijacije mezenhimalnih progenitornih ćelija, promociji angiogeneze, diferencijacije, mineralizacije i remodelacije kosti (Chang i sar. 1994, Ishiodu i sar.1995). Među njima, BMP2 ima najvažniju ulogu u procesu regeneracije kosti. Takođe je pokazano da i BMP2, indukuje ektopično formiranje kosti, lokalnu mineralizaciju i inflamaciju u različitim tkivima (Johnson i sar. 2006). Osteoinduktivni kapacitet ovog signalnog molekula je pokazan na eksperimentalnim životinjama i u kliničkim studijama i ogleda se u stimulaciji diferencijacije mezenhimalnih stem ćelija u pravcu nastanka osteoblastima sličnih ćelija, kao i aktivnih osteoblasta, hondroblasta i ćelija periosta (Granjeiro i sar. 2005). Poznato je, takođe, da BMP2 indukuje sintezu kolagena, osteokalcina i alkalne fosfataze kosti (Sampath i sar. 1992). S druge strane, i BMP2 modulira produkciju VEGF u endotelnim ćelijama, utičući tako na proces angiogeneze (Dietrich i Antoniadis 2012). Langenfeld i sar. (2004) su pokazali da BMP2 ima potencijal da indukuje proces angiogeneze. Patološka stanja, kao što su oksidativni stres, inflamacija ili hiperglikemija mogu da izazovu ekspresiju BMP2 u glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova što ukazuje na moguću ulogu u patogenezi vaskularnih kalcifikacija (Hurska i sar. 2005).

Autotransplantati i sintetički materijali u regeneraciji kostnog tkiva

Materijali koji se koriste u regenerativnoj terapiji kostnog tkiva su podeljeni na prirodne transplantate (autograft ili autotransplantat, alograt i ksenograft) i sintetičke materijale (aloplastični materijali) (Khoury i sar. 2001, Esposito i sar. 2008). Ovi materijali se primenjuju u regenerativnim procedurama, zahvaljujući svojim osteogenim, osteoinduktivnim i osteokonduktivnim svojstvima (Sheikh i sar. 2013).

Autotransplantati su kostni transplantati koji se uzimaju i prenose sa intraoralnih ili ekstraoralnih donor mesta na mesto prijema, gde se nalazi kostni defekt i predstavljaju "zlatni standard" u regenerativnoj terapiji kostnog tkiva, jer poseduju osteogene, osteoinduktivne i osteokonduktivne osobine (Cypher i sar. 1996). Međutim, morbiditet donor mesta, ograničenost u volumenu intraoralnog transplantata, dužina trajanja intervencije, broj operativnih regija i ekonomičnost su veliki nedostaci, zbog kojih se u kliničkoj upotrebi sve više koriste drugi materijali, zavisno od indikacije za regenerativnu terapiju (Younger i sar. 1989, Cypher i sar. 1996) (Tabela 1).

Tabela 1. Prednosti i nedostaci korišćenja autotransplantata u regeneraciji kostnog tkiva

Prednosti	Nedostaci
Biokompatibilnost	Potreba za dodatnom hirurškom intervencijom
Osteokonduktivnost	Produženo vreme trajanja operacije
Osteoinduktivnost	Povećanje troškova
Visok osteogeni potencijal	Morbiditet donor mesta i postoperativni bol
Adekvatna mehanička snaga	Povećan rizik od frakture kod donor mesta
Dostupnost u kortikalnom i spongioznom tipu	Ograničena količina i volumen kosti Visoka varijacija u kvalitetu kostnog tkiva

Po poreklu, autotransplantati su podeljeni na ekstraoralne i intraoralne, dok u zavisnosti od sastava mogu biti korikalni, spongiozni ili kombinovani. Spongiozni autotransplantati imaju veću sposobnost revaskularizacije od kortikalnih, zahvaljujući svojoj poroznoj arhitekturi. Revaskularizacija ovih graftova počinje petog dana nakon transplantacije (Wilk 2004). Sa druge strane, kortikalni graftovi imaju veću mehaničku otpornost koja se vremenom smanjuje, kao i manji stepen inicijalne resorpcije u odnosu na spongiozni.

Alograftovi se uzimaju od genetički neidentičnog člana iste vrste (Sheikh i sar. 2015). Iako alograftovi podležu mnogobrojnim procesima pre upotrebe, rizik od transmisije bolesti uvek postoji. Ovi materijali mogu biti sveži, zamrznuti, liofilizirani, mineralizovani, demineralizovani i primenjuju se u regenerativnoj terapiji kostnog tkiva (Block i sar. 2006, Sterio i sar. 2013).

Ksenograftovi se biomaterijali životinjskog porekla, biokompatibilni su sa ljudskim primaoceom i imaju visok osteokonduktivni potencijal. Anorganska deproteinizirana kost govedeg porekla je ksenograft koji se uspešno koristi u terapiji infrakostnih defekata i augmentacionim kostnim procedurama (Valentini i sar. 1997, Thoma i sar. 2010).

Aloplastični kostni graftovi su sintetički materijali koji su uvedeni u kliničku praksu da bi se prevazišli nedostaci vezani za upotrebu autotransplantata (Hench 1998). Osnovne prednosti alograftova jesu veća dostupnost u količini u odnosu na prirodne materijale, ne postojanje rizika od transmisije bolesti i jako nizak antigeni potencijal (Shetty i sar. 1991). Aloplastični materijali su biokompatibilni i poseduju osteokonduktivne karakteristike, a najčešće korišćeni su beta-trikalcijum fosfat (β TKF), sintetički hidroksiapatit (HA) i bifazni kalcijum fosfat (β TKF/HA), zbog njihovog mineralnog sastva i hemijske strukture koji najviše odgovaraju humanom kostnom tkivu (Han i sar. 1984). Osim toga, bitna karakteristika ovih materijala je i njihova porozna mikroarhitektura (Lecomte i sar. 2005). Prethodno navedeni kalcijum fosfatni biomaterijali favorizuju migraciju, prijanjanje, proliferaciju i ekspresiju ćelija kostnog tkiva i dovode do formiranja nove kosti koja je u direktnom kontaktu sa primenjenim materijalom za regeneraciju (Trombelli i sar. 2002). Biološko ponašanje materijala za regeneraciju kosti ne zavisi isključivo od hemijskih osobina, jer veliki uticaj imaju mikro i makrostrukturne karakteristike kao što su veličina pora, poroznost i interkonekcija (Hannink i sar. 2011). Štaviše, strukturne osobine imaju značajan efekat na osteokonduktivnost ovih materijala, jer pore omogućavaju formiranje krvnih sudova i direktno prorastanje novoformiranog kostnog tkiva unutar samog materijala.

Interkonekcija među porama obezbeđuje cirkulaciju fluida kroz celokupnu strukturu materijala, što dovodi do povećanja koncentracije biološki aktivnih proteina i pospešuje proces regeneracije kostnog tkiva (Lecomte i sar. 2008). Rastvorljivost materijala i topografske karakteristike njihove površine su jedni od najznačajnijih faktora koji utiču na biološku aktivnost ćelija kostnog tkiva. Naime, u toku procesa biodegradacije i resorpcije materijala, može doći do promene u lokalnim pH vrednostima, što direktno utiče na vitalnost i diferencijaciju ćelija. Topografske karakteristike površine materijala imaju ključnu ulogu u adsorpciji proteina i adheziji ćelija, što može imati efekat na diferencijaciju osteoblasta (Savamedi i sar. 2013).

Bioaktivnost i resorpcija ovih materijala zavise od odnosa kalcijumovih i fosfatnih jona (Ca/P), kristalne strukture i čistoće kristalne faze. U uslovima fizioloških pH=7,4 vrednosti ovi materijali su relativno nerastvorljivi, dok se u kiseloj sredini povećava njihova rastvorljivost (Lai i sar. 2005).

Beta-trikalcijum fosfat (β TKF) je sintetički aloplastični materijal koji se koristi u regenerativnoj terapiji kostnog tkiva sa zadovoljavajućim kliničkim i histološkim rezultatima (Artzi i sar. 2004, Hadadd i sar. 2006). Osteokonduktivni efekat ovog materijala pokazan je u mnogim eksperimentalnim i kliničkim istraživanjima. Zerbo i sar. (2001) su pokazali da je β TKF pouzdan materijal u augmentacionoj proceduri podizanja poda sinusa. Naime, autori su pokazali da je 8 meseci nakon operacije bila prisutna novoformirana kost i osteoid koji su u direktnom kontaktu sa neresorbovanim granulama materijala. Autori su analizirali osteogenezu i degradaciju β TKF i zaključili da partikule ovog materijala privlače ostoprogenitorne ćelije, kao i da osteoklasti nemaju uticaj na proces njegove inicijalne resorpcije. Ovo je potvrđeno u studiji Knabe i sar. (2008) gde je pokazano da je osnovni mehanizam degradacije β TKF hemijska disolucija, a potom i fagocitoza makrofagima. β TKF se potpuno resorbuje u periodu od 12 do 18 meseci i zamenjuje novoformiranom kosti, koja je po svojim anatomskim i funkcionalnim karakteristikama slična originalnom kostnom tkivu (Szabo i sar. 2001).

Sintetički hidroksiapatit (HA) ima hemijsku strukturu veoma sličnu humanoj mineralizovanoj kosti i njegov efekat u procesu regeneracije kosti je pokazan na mnogim studijama (Kenney i sar. 1985, Bagambisa i sar. 1993, Ayers i sar. 1998). β TKF i HA se međusobno razlikuju po sastavu, kristalnoj strukturi i biološkom ponašanju. β TKF ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) je brzo resorbujući osteokonduktivan materijal koji brže dovodi do formiranja kostnog tkiva u poređenju sa sporo

resorbirajućim HA (Savamed i sar. 2013). Međutim, sa druge strane, HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) je pouzdaniji materijal za dugoročnu *in vivo* stabilnost i za duže održavanje efekata osteokondukcije. Imajući ovo u vidu, pretpostavljeno je da bi kombinacija HA sa β TKF imala prednosti u regenerativnoj terapiji zbog kontrolisane bioaktivnosti i balansa između procesa resorpcije materijala i modelacije nove kosti (LeGeros i sar. 2003).

Bifazni kalcijum fosfat (β TKF/HA) je sintetički aloplastični materijal koji se sastoji od hidroksiapatita (60%) i beta-trikalcijum fosfata (40%). Radiološka evaluacija u toku kliničkih istraživanja je potvrdila zadovoljavajuće osteokonduktivne karakteristike ovog regenerativnog materijala (LeGeros i sar. 2003). Hwang i sar. (2012), poredeći efekte β TKF, HA i β TKF/HA na modelu kritičnog defekta kalvarije kunića su pronašli da je procenat novoformirane kosti bio najveći kod primene bifaznog kalcijum fosfata, kao i da je stepen resorpcije materijala bio veći kod β TKF. U saglasnosti sa ovim istraživanjem su i rezultati Yang-a i sar. (2013), gde je histomorfometrijskom analizom pokazano da je procenat novoformirane kosti bio veći posle primene bifaznog kalcijum fosfata u poređenju sa β TKF. Na istom modelu Park i sar. (2010) su zaključili da β TKF/HA poseduje dobar osteokonduktivni potencijal i da je pouzdan materijal u regenerativnoj terapiji kostnog tkiva.

Dijabetes melitus (DM) i regeneracija kostnog tkiva

Dijabetes melitus se definiše kao grupa metaboličkih oboljenja praćenih hiperglikemijom, koja nastaju zbog poremećaja u lučenju insulina, aktivnosti insulina ili su oba patološka mehanizma prisutna u patogenezi ovog oboljenja (Retzepe i Donos 2010).

Etiološki se razlikuju dva osnovna tipa ove bolesti: DM tip I gde je uzrok hiperglikemije autoimuna destrukcija β ćelija endokrinog dela pankreasa koja dovodi do deficita insulina i DM tip II sa hiperglikemijom kao posledicom kombinacije metaboličkih disbalansa, kao što su: rezistencija na insulinsku aktivnost, relativni insulinski deficit, visoka hepatična produkcija glukoze, neadekvatni kompenzatorni insulinski sekretorni odgovor.

Najčešće sistemske komplikacije DM su nefropatija, retinopatija i otežano zarastanje rana, nastale kao posledice mikrovaskulopatija, makrovaskulopatija i neuropatija. Ovo hronično

metaboličko oboljenje je takođe praćeno pojavom komplikacija na kostnom tkivu koje se definišu kao dijabetička bolest kostiju ili dijabetička osteopatija (Bouillon, 1991). Dijabetični skeletni fenotip karakterišu:

- smanjen linearni rast kostiju kod pubertetskog naglog razvoja (Salerno i sar.1997),
- smanjena mineralna gustina kostiju i povećan rizik od osteoporoze i osteopenije (Vestergaard 2007),
- povećan rizik od frakture (Janghorbani i sar. 2007),
- usporeno kostno zarastanje i oslabljen regenerativni potencijal kostnog tkiva (Cozen 1972).

Ključni mehanizam koji je odgovoran za otežano i usporeno zarastanje kostnog tkiva kod pacijenata sa DM je supresija osteoblastogeneze, odnosno biološkog procesa stvaranja aktivnih osteoblasta (Hamann i sar. 2011), kojom je redukovana njihova aktivnost, diferencijacija i proliferacija (McCabe 2007). Naime, ispitivanja na animalnom modelu sa eksperimentalno izazvanim DM tip I pokazala su da redukcija u ekspresiji gena koji regulišu diferencijaciju osteoblasta dovodi do smanjenja broja ovih ćelija, kao i do poremećaja u njihovoj funkciji. Upravo zbog poremećaja u aktivnosti osteoblasta, DM prouzrokuje smanjenu sintezu kolagena i osteodnog matriksa, kao osnove za stvaranje novoformiranog kostnog tkiva (Lu i sar. 2003, Hamada i sar. 2009, Hamada i sar. 2007, Botolin i McCabe 2007). Stoga, poremećaj u proliferaciji ćelija i smanjenje metabolizma kolagena, direktna su posledica dijabetesa koji ozbiljno utiču na proces obnove tkiva (Falanga i sar. 2005, Maruyama i sar. 2007). Hiperglikemijski status kod dijabetesa dovodi i do povećanja procesa resorpcije kosti (Krakauer i sar. 1995), zahvaljujući povećanoj aktivnosti osteoklasta i sledstvenoj redukciji u formiranju novostvorene kosti (He i sar. 2003). Pored toga, smanjuje adherenciju, rast i akumulaciju ekstracelularnog matriksa kostnog tkiva (Weiss i sar. 1981). Hiperglikemija takođe, pored inhibicije diferencijacije osteoblasta utiče i na promene u lučenju paratiroidnog hormona koji reguliše metabolizam fosfora i kalcijuma (Santana i sar. 2003).

Na ćelijskom nivou, DM dovodi do poremećaja u imunnoj funkciji, ranom starenju ćelija i prevremenoj apoptozi, što ima uticaj na keratinocite, osteoblaste i makrofage (Crafford 1995, Zykova i sar. 2000, Falanga 2005). Poznato je da promene u DM, kao što su hipoksija, disfunkcija fibroblasta, izmenjena angiogeneza i neovaskularizacija, smanjen imunitet i neuropatija, dovode do poremećaja svih faza u zarastanju rana, a posebno utiču na hemostazu,

inflamaciju i angiogenezu (Miley i sar. 2005). Smanjena sekrecija faktora rasta, povećan inflamatorni odgovor i loša oksigenacija su mehanizmi koji remete proces regeneracije tkiva kod DM (Baumgartner-Parzer i sar. 1995, Liu i sar. 2006). Štaviše, povećana aktivnost signalnih molekula u dijabetičnim uslovima (DM tip II) može da prouzrokuje, pored smanjenja produkcije kolagena, i apoptozu osteoblasta i fibroblasta (Graves i sar. 2005).

Imajući u vidu da osnovu patofizioloških mehanizama u DM čine mikrovaskularne i makrovaskularne promene, regeneracija kostnog tkiva kod pacijenata sa DM je otežana i usporena. Naime, usled patoloških promena na krvnim sudovima (mikroangiopatija) u dijabetično izmenjenoj kostnoj srži, i prisutne ishemije, smanjena je indukcija endotelnih progenitornih ćelija (Fadini i sar. 2006). S druge strane, vreme i obim indukcije endotelnih progenitornih ćelija u kostnoj srži smanjeno je i usled postojanja dijabetično izmenjene autonomne inervacije (neuropatija) (Busik i sar. 2009). Isto tako, pokazano je da su krvni sudovi u dijabetičnim uslovima patološki zadebljani, sa zonama mikrotromboza i naslagama fibrina, pri čemu je smanjen i broja kapilara (von Wilmowskiy i sar. 2010, Oikawa i sar. 2010). Takođe, u dijabetičnim uslovima smanjena je i sinteza faktora rasta, kao što je i VEGF (Brem i Tomic-Canic 2007, Thangarajah i sar. 2009).

Kostno zarastanje kod pacijenata sa DM je praćeno smanjenjem gustine, mineralizacije i trabekularne strukture kosti (Retzepi i Donos 2010, McCabe 2007, Hou i sar. 1993, Suzuki i sar. 2003). S tim u vezi, histološke analize dijabetično izmenjenog kostnog tkiva, na eksperimentalno izazvanom DM tip I, pokazale su redukovanu površinu kostne srži, koja je ograničena širokom trabekularnom strukturom kosti sa iregularnim izgledom u odnosu na zdravu kost (von Wilmowsky i sar. 2010). Takođe je pokazano da je, već pomenuto smanjenje površine kostne srži, praćeno smanjenim brojem ćelija i krvnih sudova (Santana i sar. 2003). S druge strane, u uslovima slabo kontrolisanog DM tip I, postoji značajna redukcija volumena trabekularne kosti i stepena njene mineralizacije (Follak i sar. 2004).

Imajući sve ovo u vidu, može se zaključiti da osnovni tkivni i ćelijski mehanizmi koji su odgovorni za usporeno kostno zarastanje kod DM, podrazumevaju supresiju diferencijacije i proliferacije osteoblasta i promenu nivoa faktora rasta (VEGF i BMP2) u toku kritične rane faze regeneracije kostnog tkiva. Trenutno dostupni podaci iz literature ukazuju da osnovu patofizioloških promena u kostnom tkivu kod DM tip I čine hiperglikemija i/ili hipoinsulinemija.

Uzimajući u obzir patogenezu ovih poremećaja, kao i prevalencu DM, smatra se značajnim pronalaženje odgovarajućih terapijskih strategija u rekonstrukciji kostnih defekata kod pacijenata sa dijabetesom.

Model kritičnog defekta kalvarije kunića

Eksperimentalno kreiran model kritičnog defekta kostnog tkiva su prvobitno definisali Schmitz i Hollinger (1986), kao najmanji intraosealni defekt kosti koji ne može da zaraste spontano bez primene regenerativne terapije, ili se u njegovom spontanom zarastanju stvara manje od 10% novoformirane kosti (Schmitz i Hollinger 1986). Ova definicija je nedavno modifikovana od strane Cooper i sar. (2010), gde se kritičnim defektom kostnog tkiva smatra najmanji intraosealni defekt koji ne može spontano da zaraste u praćenom vremenskom intervalu, osim ukoliko se ne primeni regenerativna terapija kostnog tkiva.

Ovaj model se koristi za ispitivanje uspešnosti regeneracije kosti i to:

- za ispitivanje uspešnosti terapijskih postupaka za regeneraciju kostnog tkiva,
- za ispitivanje rane faze regeneracije kostnog tkiva do 4 nedelje,
- za ispitivanje kasne faze regeneracije kosti do 12 nedelje (Sohn i sar. 2010).

Standardna veličina eksperimentalno izazvanog kritičnog defekta kosti se kreće u intervalu od 6 do 15 mm u prečniku, što zavisi od dužine praćenja zarastanja defekta. Naime, defekti manjeg prečnika (6-8 mm) imaju osobine kritičnog defekta ako im je observacioni period skraćen (Marden i sar. 1994, Sohn i sar. 2010, Borie i sar. 2011, Calvo-Guirado i sar. 2012). Štaviše, predstavljaju koristan model za određivanje efekata osteoindukcije (Hammerle i sar. 1992, Lundgren i sar. 1992) i evaluacije rane faze regeneracije kostnog tkiva (Hammerle i sar. 1992). Defekti prečnika 6 i 8 mm uglavnom se koriste za ispitivanja uspešnosti terapijskih postupaka regeneracije kosti na tkivnom nivou (histološka i histomorfometrijska analiza), dok se defekti većeg prečnika od 11 do 15 mm koriste i za ispitivanja na ćelijskom i molekularnom nivou (kvantitativna analiza signalnih molekula) (Humber i sar. 2010, Nagata i sar. 2009).

Postoji nekoliko modela koji se koriste u proceni regeneracije kostnog tkiva u različitim anatomskim regijama, uključujući tibiju, radius, mandibulu i kalvariju. Najčešće korišćen jeste

model kritičnog defekta parijetalne kosti kalvarije kunića, zahvaljujući njenom intramembranoznom poreklu, što je čini veoma sličnom humanoj mandibuli. Pored ovoga, pokazano je da obe kosti, parijetalna kost kunića i donja vilica čoveka, imaju manje spongiozne kosti u odnosu na kompaktnu, a time i manje krvnih sudova, kao i činjenica da obe kosti nisu izložene pritisku i opterećenju (Frame 1980). Prednosti korišćenja ovog modela su sledeće: formiranje kranijalnog defekta u toku eksperimenta je olakšano radi vidljivog i kontrolisanog pristupa, veličina kalvarije kunića omogućava formiranje većeg broja kostnih defekata na jednoj eksperimentalnoj životinji, što povećava ekonomičnost, a smanjuje ukupno trajanje hirurške intervencije i pojavu greške u toku analize rezultata unutar jedne jedinice (eksperimentalne životinje) (Sohn i sar. 2010). Zatim, kada je u pitanju dinamika stvaranja kosti, kostno tkivo kalvarije kunića karakteriše brži stepen remodelacije kosti i njeno potpuno sazrevanje u prvih 6 meseci od formiranja defekta (Gilzans i sar 1988).

Zarastanje kritičnih defekata kostnog tkiva se odvija u dva pravca, u okviru kostnog grafta unutar defekta i na ivicama kostnog defekta. Zahvaljujući ovome, redukcija u veličini defekta obezbediće informacije o procentualnoj zastupljenosti novoformiranog kostnog tkiva. Analizom podataka iz literature je pokazano da vreme zarastanja i osteogeni potencijal primenjenog materijala imaju direktan uticaj na smanjenje kostnog defekta (Delgado-Ruiz i sar. 2015). Isti autori su pokazali da faktori, kao što su pol, starost i težina eksperimentalnih životinja, zatim broj, lokalizacija i oblik defekata, kao i tip osteotomije značajno ne utiču na proces zarastanja kritičnih kostnih defekata (Delgado-Ruiz i sar. 2014).

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu klinički značaj uspešnosti regenerativne terapije kostnog tkiva u uslovima DM, kao i činjenicu da za sada nema podataka o uspešnosti regenerativne terapije u dijabetičnim uslovima, ciljevi ove doktorske disertacije su sledeći:

- 1) Ispitati histološke i histomorfometrijske karakteristike novoformiranog kostnog tkiva posle primene autotransplantata, beta-trikalcijum fosfata ili beta-trikalcijum fosfata sa hidroksiapatitom na modelu kritičnih defekata kalvarije zdravih, kontrolnih kunića, kao i kunića sa eksperimentalno indukovanim DM tip I, 4 nedelje posle primene pomenutih materijala.
- 2) Odrediti koncentracije VEGF i BMP2 u novoformiranom kostnom tkivu posle primene autotransplantata, beta-trikalcijum fosfata ili beta-trikalcijum fosfata sa hidroksiapatitom na modelu kritičnih defekata kalvarije zdravih, kontrolnih kunića, kao i kunića sa eksperimentalno indukovanim DM tip I, 4 nedelje posle primene pomenutih materijala.
- 3) Komparativnom statističkom analizom utvrditi značaj uspešnosti primenjene terapije na ranu fazu regeneracije kostnog tkiva kod kontrolnih i kunića sa eksperimentalno izazvanim DM tip I.

RADNA HIPOTEZA

Primena autotransplantata (osteoinduktivni materijal), beta-trikalcijum fosfata samog ili u kombinaciji sa hidroksiapatitom (osteokonduktivni materijali) značajno utiče na povećanje kvantiteta i kvaliteta novoformiranog kostnog tkiva u ranoj fazi osteogeneze (4 nedelje) kod kunića sa eksperimentalno izazvanim DM tip I.

Rana faza regeneracije kritičnog kostnog defekta kalvarije kontrolnih i kunića sa eksperimentalno izazvanim DM tip I praćena je povećanjem nivoa VEGF i BMP2 u novoformiranom kostnom tkivu, koji je veći kod kontrolnih, nego kod kunića sa eksperimentalno izazvanim DM tip I.

MATERIJAL I METOD

Uslovi eksperimentalnog rada na laboratorijskim životinjama

U istraživanje je bilo uključeno ukupno 20 kunića vrste Velika činčila (*Oryctologus cuniculus*), muškog pola, starosti 4 meseca, telesne mase od 3,5 do 4 kg, odgojenih u vivarijumu za potrebe medicinskog istraživanja uzgajivačnice Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Svi kunići su u toku adaptacionog perioda i istraživanja bili smešteni u laboratorijskim individualnim kaveznim sistemima, u kontrolisanoj sredini sa dnevnom profesionalnom negom, kontrolom zdravstvenog stanja i ishranom sa svežom vodom za piće i hranom *ad libitum*, što je podrazumevalo korišćenje principa Evropske konvencije za zaštitu životinja koje se koriste u eksperimentima i za druge naučne svrhe (CoE-ETS 123). Pre započinjanja eksperimentalne studije, urađena je preliminarna studija na ukupno 8 kunića sa indukovanim dijabetes melitusom tip I.

Dozvola za eksperimentalni rad na životinjama dobijena je od Etičkog komiteta Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (No. 36/17). Istraživanje na laboratorijskim životinjama, odnosno adaptacija kunića, eksperiment i njihovo žrtvovanje, urađeno je po principima *Dobre laboratorijske prakse* na Fakultetu veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, dok su preostale laboratorijske analize uzoraka tkiva urađene na Stomatološkom fakultetu i Institutu za biološka istraživanja Univerziteta u Beogradu.

Dizajn studije

Eksperimentalno istraživanje u ovoj doktorskoj disertaciji urađeno je kao *in vivo* istraživanje na animalnom modelu kritičnih defekata kostnog tkiva parijetalne kosti kunića (modelni eksperiment). Ovo istraživanje je bilo sprovedeno u dva dela: preliminarno istraživanje i kontrolisano, komparativno istraživanje.

Dizajn preliminarnog istraživanja

Imajući u vidu složenost i osetljivost izvođenja *in vivo* studije, u prvom delu istraživanja urađena je preliminarna studija, sa ciljem da se definišu parametri istraživanja koji bi omogućili da se isti rezultati reprodukuju pri ponavljanju oglada pod istim uslovima kao kontrolisana, komparativna studija (Festing, Altman 2002). Takođe, preliminarno istraživanje je bilo urađeno kako bi se utvrdila i planirana veličina uzorka s obzirom na snagu studije, kriterijumi indukcije DM, analiza hirurških postupaka na eksperimentalnom modelu, preživljavanja i praćenja eksperimentalnih životinja, zatim prikupljanje, analiziranje i testiranje rezultata na osnovu čega bi se odredila radna hipoteza, primarni i sekundarni rezultati, odnosno, ishod studije. Preliminarno istraživanje je urađeno na 8 kunića vrste Velika činčila, starosti 4 meseca, telesne mase 3,5 do 4 kg, kod kojih je eksperimentalno izazvan DM tip I. S obzirom na to, preliminarno istraživanje je obuhvatalo nekoliko protokola.

Protokoli preliminarnog istraživanja

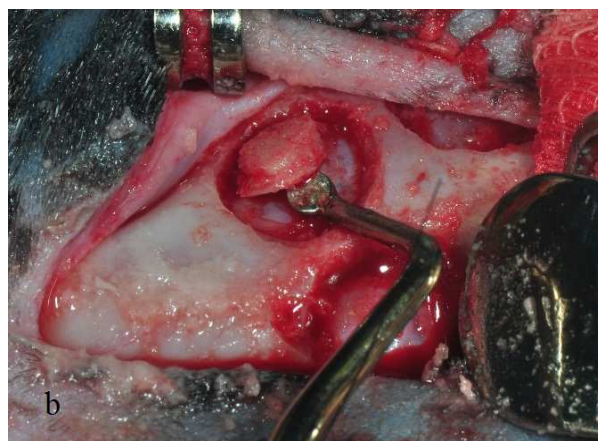
- Protokol indukcije DM tip I u preliminarnoj studiji:

Protokol za eksperimentalnu indukciju DM je trebao da utvrdi ispravnost postupka, stepen uspešnosti indukcije, odnosno nivo glikemije u krvi, stepen inicijalne hipoglikemije i njenu terapiju, kao i preživljavanje kunića. Postupak indukcije je urađen intravenskom primenom aloksana (100 mg/kg) preko marginalne ušne vene.

- Protokol izrade modela kritičnog defekta kalvarije kunića preliminarne studije:

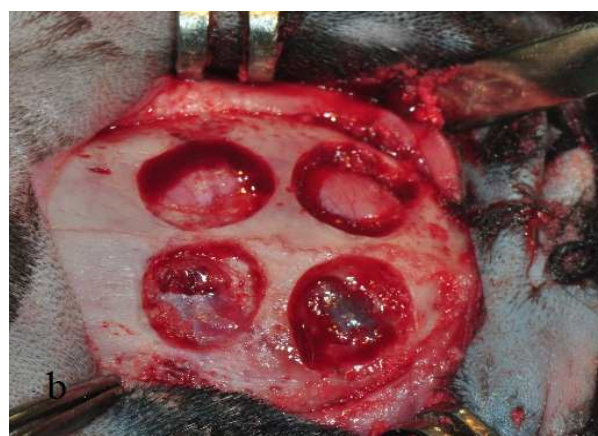
Protokol hirurške intervencije na eksperimentalnom modelu je trebao da utvrdi kvalitet opšte intramuskularne anestezije, stepen intraoperativnih komplikacija kao što su: krvarenje iz intrakranijalnog venskog pleksusa, povredu moždanice (Slika 1a, 1b), cepanje periosta, prelom kalvarije, opstrukciju disanja usled mehaničkog pritiska u toku izvođenja eksperimenta. Pored toga, definisao se i metod osteotomije kritičnog defekta kosti (primena trepan borera ili hirurškog šablona) i veličinu i broj kritičnih defekata kosti (Slika 2a, 2b). Od značaja je bilo i da se utvrdi

način randomizacije kostnih defekata s obzirom na primenu različitih materijala za regeneraciju kosti. U toku četiri postoperativne nedelje, praćeno je stanje vitalnih funkcija (ritmičnost disanja i srčane radnje), oporavak kunića, pojava postoperativnih komplikacija i stepen preživljavanja životinja. Po žrtvovanju životinja uzimani su uzorci regenerisanog kostnog tkiva za histološku i histomorfometrijsku analizu. S tim u vezi, utvrđivan je i način uzimanja uzoraka, njihova raspodela i postupci čuvanja tkiva do planiranih analiza.



Slika 1a. Postupak osteotomije kritičnog defekta kalvarije kunića

Slika 1b. Uklanjanje bikortikalne kosti na mestu trepanacije kalvarije i očuvanje integriteta moždanica



Slika 2a. Izgled dva kritična defekta na kalvariji kunića prečnika 12 mm u okviru preliminarne studije

Slika 2b. Izgled četiri kritična defekta kosti kalvarije kunića prečnika 8 mm

- Protokol histološke, histomorfometrijske i statističke analize preliminarne studije:

Histološki protokol je obuhvatao dva histološka bojenja tkiva: standardno bojenje Hematoksilin-eozinom i specifično bojenje Goldner-trihrom metodom, da bi se pokazao različiti stepen sazrevanja regenerisanog kostnog tkiva. Nadalje, histomorfometrijska analiza je korišćena da bi se kvantitativno analizirao procenat regenerisanog kostnog tkiva, vezivnog tkiva ili neresorbovanog materijala. Takođe, preliminarnom analizom bilo je obuhvaćeno i vrednovanje kvaliteta novoformiranog kostnog tkiva, inkorporacija materijala i vezivnog tkiva u regenerisano tkivo, stepen vaskulogeneze, stepen ćelijske infiltracije i ćelijske reakcije na proces regeneracije. Statističkom analizom utvrđivani su testovi poređenja između grupa, stepen značajnosti i moguće korelacije.

Dizajn kontrolisanog istraživanja

Na osnovu analiziranih rezultata preliminarne studije utvrđen je dizajn kontrolisane, komparativne studije doktorske disertacije, koji je detaljno prikazan sledećim protokolom istraživanja.

Eksperimentalne grupe

Kunići su bili podeljeni u dve grupe, eksperimentalnu, sa indukovanim DM tip I (n=11), i kontrolnu grupu zdravih kunića (n=9). Svaka grupa je bila podeljena na četiri podgrupe zavisno od materijala koji se koristio za regeneraciju kostnog defekta:

I grupa - kostni defekt popunjen beta-trikalcijum fosfatom (β TKF),

II grupa - kostni defekt popunjen beta-trikalcijum fosfat/hidroksiapatitom (β TKF/HA),

III grupa - kostni defekt popunjen autotransplantatom (AUTO),

IV grupa - nepopunjen kostni defekt (kontrolni defekt koji spontano zarasta) (KON).

Eksperimentalno izazvan DM kod kunića

Dijabetes mellitus tip I je bio indukovan u eksperimentalnoj grupi kunića jednom dozom aloksana (100 mg/kg), rastvorenoj u fiziološkom rastvoru, kontinuiranom primenom preko marginalne ušne vene. Rastvor aloksana, za koji je poznato da na eksperimentalnim životinjama indukuje dijabetes melitus tip I, bio je pripremljen neposredno pre ubrizgavanja. Merenje nivoa glukoze u krvi vršeno je pre indukcije DM i svakodnevno u intervalu od 14 dana nakon ubrizgavanja aloksana, uzimanjem uzorka krvi iz marginalne vene uha kunića (Slika 3a, 3b). Posle ovog perioda kunići sa izmerenom glikemijom ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) su smatrani dijabetičnim.



Slika 3a, 3b. Merenje nivoa glukoze u krvi uzete iz marginalne ušne vene kunića

Eksperimentalni model u ovoj studiji je odgovarao modelu nekontrolisanog DM, a vrednosti glikemije kunića u eksperimentalnoj grupi (dijabetični) su bile u intervalu od 200 mg/dL do 400 mg/dL (11,1 mmol/l do 22,2 mmol/l). Imajući u vidu činjenicu da posle indukcije DM aloksanom dolazi do iznenadne pojave hipoglikemije i opasnosti od hipoglikemijskog šoka korišćena su dva metoda kontrole: metod hitne korekcije hipoglikemije i metod prevencije hipoglikemije. Za hitnu korekciju hipoglikemije (ako bi vrednost hipoglikemije na kontrolnim nalazima iznosila ≤ 100 mg/dL), korišćen je 5-10% rastvor glukoze intravenski ili do 30% rastvor glukoze subkutano. U slučaju da vrednosti hipoglikemije nisu padale do pomenute vrednosti od ≤ 100 mg/dL, kod kunića je korišćen metod prevencije hipoglikemije primenom 10% rastvor glukoze u vidu sveže

vode za piće *ad libitum* (Gerritsen i sar. 2000). U slučaju da je vrednost glukoze u krvi iznosila 200 mg/dL (11,11 mmol/l), dve nedelje posle indukcije DM aloksanom, na eksperimentalnim životinjama je rađena hirurška intervencija. Kontrola glikemije je rađena dva puta dnevno i u slučaju da vrednost glukoze pređe 400 mg/dL, kod kunića je bio ordiniran insulin u individualnoj dozi, radi sprečavanja letalnog ishoda. Kontrolnoj grupi kunića ubrizgavana se ista količina fiziološkog rastvora, sa merenjem nivoa glukoze, po prethodno navedenom protokolu.

Ispitivani materijali za regeneraciju kostnog tkiva

Ispitivani materijali su bili podeljeni u dve grupe:

- A) sintetički osteokonduktivni materijali koji se koriste u regenerativnoj terapiji kostnog tkiva, i to: beta-trikalcijum fosfat (RTR[®] Septodont, Francuska) i bifazni kalcijum fosfat (BoneCeramic[®], Straumann, Švajcarska), koga čini 60% hidroksiapatit i 40% beta-trikalcijum fosfat. Ovi materijali su korišćeni u skladu sa upustvom proizvođača.
- B) autotransplantat, kao osteoinduktivni materijal u regenerativnoj terapiji kostnog tkiva, uzet sa kalvarije kunića na mestu osteotomije kritičnog defekta parijetalne kosti, pripremljen u obliku kortikospongioznih parčića kosti neposredno po uzimanju sa donor mesta.

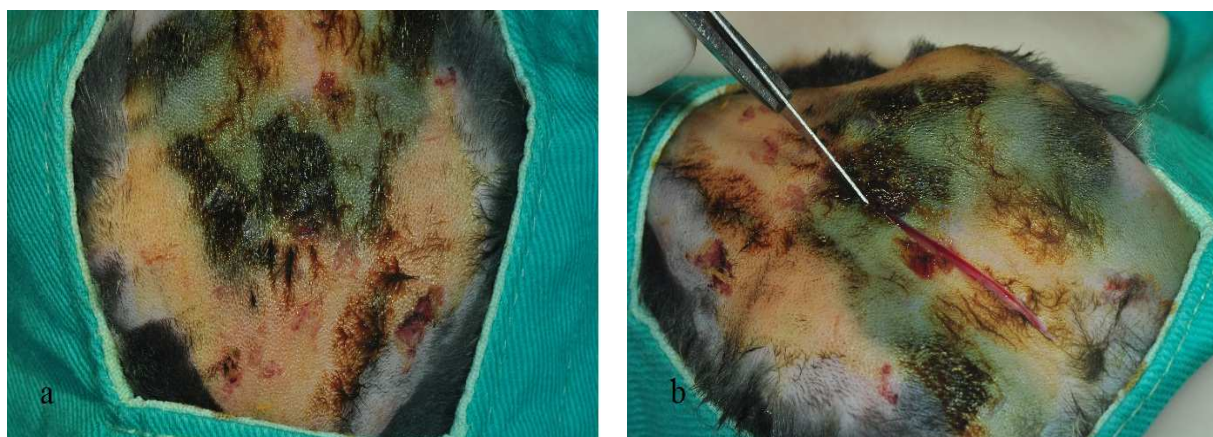
Eksperimentalni model kritičnog defekta kostnog tkiva

Rad na eksperimentalnom modelu kritičnog defekta kostnog tkiva čini hirurška procedura na parijetalnoj kosti kalvarije kunića. Imajući u vidu da se radi o *in vivo* eksperimentu, hirurška procedura je rađena u kontrolisanim, bezbolnim uslovima za hiruršku intervenciju, odnosno u opštoj injekcionoj anesteziji postignutoj sa intramuskularnom primenom tiletamina i zolazepama u dozi 15 mg/kg, uz neophodnu rehidrataciju fiziološkim rastvorom i.v. putem. U toku intervencije, vršen je monitoring vitalnih parametara (ritmičnost srčane radnje i respiratorni pokreti grudnog koša, vrednovano inspekcijom). Pored primene opšte injekcione anestezije, na

mestu hirurške intervencije dat je i rastvor lokalnog anestetika (2 ml 2% lidokain sa 1/100 000 adrenalina) u cilju prevencije intraoperativnog krvarenja i hidrostatske disekcije mekog tkiva.

Hirurška procedura sprovedena je u aseptičnim uslovima uz preoperativnu pripremu operative regije pre aplikacije rastvora lokalnog anestetika, i to brijanjem kože glave kunića i njenom dezinfekcijom rastvorom povidon jodida (Slika 4a).

Potom je izvedena incizija dužine 5 cm, duž medijalne linije kalvarije kunića koja se protezala od parijetalne kosti do frontalne kosti (Slika 4b). Koža, potkožno tkivo i periost su bili presečeni u celosti, tako da je od kostnog tkiva odvojen režanj pune debljine, kako bi se u celosti eksponirale parijetalne kosti i njene kostne suture.



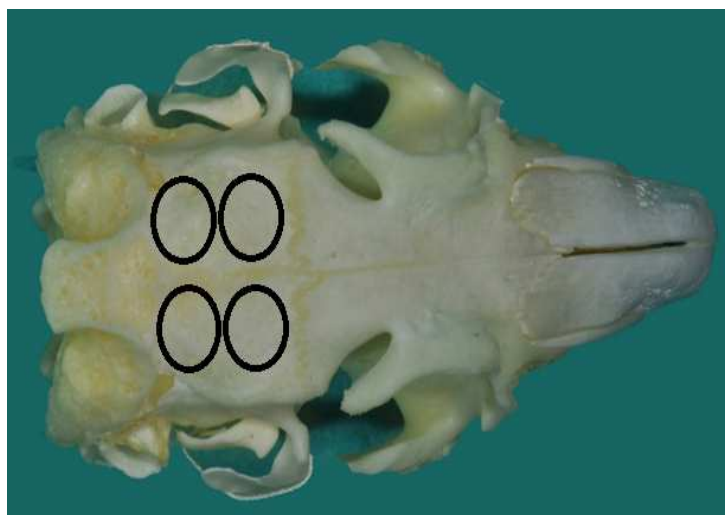
Slika 4a. Priprema kože kalvarije kunića na mestu izvođenja hirurške intervencije

Slika 4b. Izgled hirurške incizije kože kalvarije kunića na mestu kreiranja hirurškog modela

Od posebne važnosti je bilo sprečiti cepanje periosta, kako bi po zatvaranju operative regije periost ostao intaktan (Slika 5a, 5b). Na parijetalnoj kosti su bila formirana 4 kostna bikortikalna defekta, po 2 defekta sa svake strane medijalne linije, lokalizovana 2 mm od medijalne kostne suture, sa prečnikom od 8 mm (Slika 6).



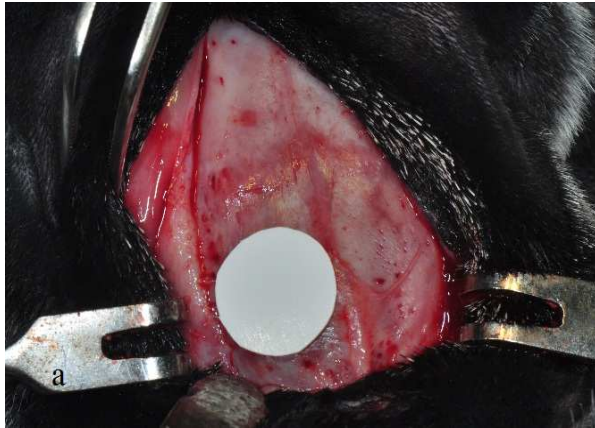
Slika 5a, 5b. Izgled eksponirane parijetalne kosti kalvarije kunića



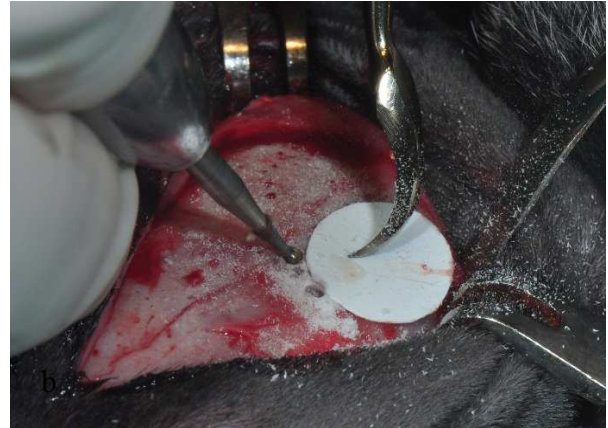
Slika 6. Šematski izgled pozicije 4 kritična defekta kosti kalvarije kunića prečnika veličine 8 mm

Na osnovu rezultata preliminarne studije, defekti su kreirani karbidnim hirurškim svrdlom prečnika glave 2 mm, uz pomoć sterilnog hirurškog šablona prečnika 6 mm, čime je dobijen kostni defekt promera od ukupno 8 mm (Slika 7a). Hirurški šabloni postavljani su na kostno tkivo u projekciji budućeg defekta, a zatim je okruglim svrdlom po periferiji šablona urađena osteotomija do nivoa tvrde moždane opne, vodeći računa da se ona u toku rada ne povredi (Slika 7b). Takođe se vodilo računa o prevenciji povrede intrakranijalnog venskog pleksusa sa lateralne

strane parijetalne kosti, čija povreda dovodi do izraženog intraoperativnog krvarenja i mogućeg letalnog ishoda eksperimentalne životinje.



Slika 7a. Hirurški šablon postavljen na kost u projekciji budućeg kritičnog defekta kosti

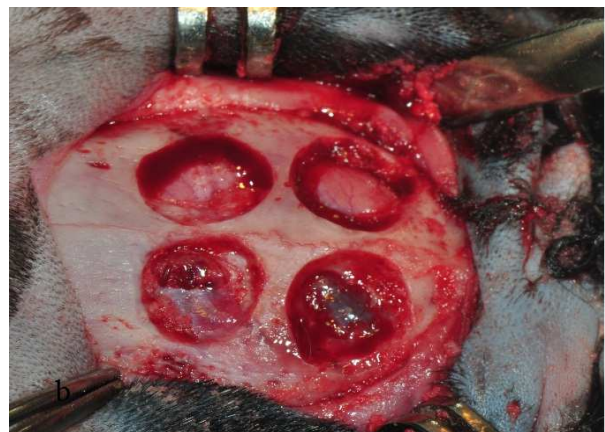


Slika 7b. Postupak trepanacije kosti čeličnim borerom uz pomoć hirurškog šablona

Takođe, na osnovu rezultata preliminarne studije, dubina osteotomije sa medijalne strane iznosila je 2 mm, a sa lateralne strane do 1,5 mm. U toku rada sa mašinskim instrumentima, koristio se fiziološki rastvor za ispiranje i hlađenje operativne regije. Po završenoj osteotomiji, kostne pločice parijetalne kosti su pažljivo uklonjene raspatorijumom, oštre ivice kosti su bile zaobljene i urađen je debridman rane fiziološkim rastvorom (Slika 8a, 8b).



Slika 8a. Izgled trepanacionih linija za 4 kritična defekta kosti kalvarije kunića



Slika 8b. Veličina, oblik i pozicija kritičnih defekata kosti kalvarije kunića

Randomizacija ispitivanih materijala izvršena je tako što su materijali postavljeni rotacionom metodom, naizmenično, u pravcu kazaljke na satu, da bi se obezbedila balansirana distribucija materijala između prednjih i zadnjih regiona kosti kalvarije. Materijal je postavljan u kostne defekte tako da ih je u celosti popunjavao, od eksponirane dure kaudalno, do nivoa kostnih ivica defekta kranijalno. β TKF kao i β TKF/HA su primenjeni u fabričkom obliku, uzeti iz sterilnog pakovanja za jednokratnu primenu. Primena autotransplantata omogućena je prethodnim sečenjem kostnih bikortikalnih blokova uzetih sa površine defekata u manje parčiće veličine 2 do 4 mm, zbog čega je u njegovom sastavu bio prisutan i kortikalni i spongiozni deo kosti. Četvrti defekt je ostavljen prazan, nepopunjen, kao kontrolni defekt kosti (Slika 9).



Slika 9. Model kritičnog defekta kosti kalvarije kunića sa postavljenim materijalima za regeneraciju kosti i kontrolni, nepopunjen kostni defekt

Nakon postavljanja materijala u kostne defekte, operativna regija je bila ušivena pojedinačnim šavovima sa resorptivnim koncem (Slika 10).

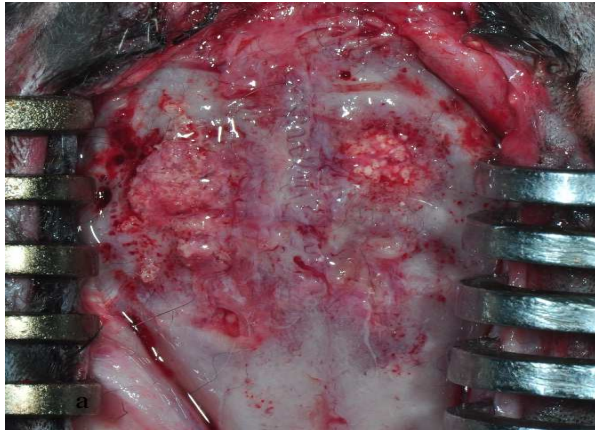


Slika 10. Izgled ušivene hirurške rane

Postoperativna kontrola, žrtvovanje životinja i uzimanje uzorka kosti

Postoperativno, kunići su bili smešteni u individualnim kavezima i kontrolisani po prethodno utvrđenom protokolu istraživanja. Za kontrolu postoperativnog bola ordiniran je buforfanol u dozi 0,6 mg/kg, a za kontrolu infekcije oksitetraciklin 15 mg/kg, u trajanju od tri dana. Eksperimentalne životinje su žrtvovane nakon 4 nedelje, intravenskom injekcijom rastvora pentobarbitala u dozi 100 mg/kg. Neposredno posle žrtvovanja, pristupilo se otvaranju operativne regije i deskriptivnoj analizi regenerisanih defekata kosti (Slika 11a). Potom se pristupilo uzimanju biološkog materijala za planirane analize, mašinskim sečenjem (dijamantski disk) kalvarije kunića, uz obilnu irigaciju i hlađenje tkiva fiziološkim rastvorom, tako što su uzorci uzeti u četiri bloka, koji su odgovarali regenerisanim defektima kosti (Slika 11b).

Žrtvovane životinje su dalje tretirane po protokolu za zbrinjavanje biološkog materijala od strane nadležne veterinarske ustanove.



Slika 11a. Regenerisani kritični defekti kalvarije kunića 4 nedelje posle primene materijala za regeneraciju kosti



Slika 11b. Osteotomija regenerisane kosti radi uzimanja materijala za laboratorijske analize

Priprema tkiva za histološku analizu

- Fiksacija nedekalcifikovanih uzoraka:

Priprema uzoraka za histološku analizu započeta je procesom fiksacije nedekalcifikovanih uzoraka kosti potapanjem u 10% pufervisani formaldehid, uz prethodno uklanjanje mekog tkiva i periosta sa uzetih parijetalnih kostnih blokova.

- Dehidracija, infiltracija i kalupljenje uzoraka:

Materijal fiksiran u 10% puferisanom formaldehidu, dobro je ispran pod tekućom i destilovanom vodom. Zatim su nedekalcifikovani uzorci bili podvrgnuti dehidraciji i infiltraciji, ukalupljeni u metil metakrilat, sledećim procedurama.

Postupak dehidracije je obuhvatao primenu različitih koncentracija alkohola po sledećem protokolu:

- 30% etanol 2 dana na sobnoj temperaturi
- 50% etanol 2 dana na sobnoj temperaturi
- 70% etanol 2 dana na sobnoj temperaturi

- 80% etanol 2 dana na sobnoj temperaturi
- 6.96% etanol 2 puta po 2 dana na sobnoj temperaturi
- 7.100% aceton 2 puta po 2 dana na sobnoj temperaturi
- 8.100% metanol 2 puta po 2 dana na sobnoj temperaturi
- pre-infiltracija 100% metil metakrilatom 2 puta po 2 dana,

Potom faza infiltracije koja je obuhvatala sledeće postupke:

- pripremanje tečnosti za infiltraciju, koja se takođe koristi i u fazi kalupljenja, i naziva se *Mešavina za infiltraciju i kalupljenje*. Mešavina je pripremljena prema preskripciji (Shenk 1965, Burkhardt 1966).
- postupak infiltracije koji je obuhvatao filtriranje mešavine za infiltraciju kroz filter papir sa velikim porama. Potom su uzorci potopljeni u infiltracionu tečnost, postavljeni pod vakuum u trajanju od 15 minuta, do pojave mehurića na površini tečnosti. Posle zatvaranja valvule na disekatoru, vakum je bio isključen i uzorci su bili ostavljeni pod vakuumom u disekatoru narednih sat vremena. Posle otvaranja valvule na disekatoru vakum je oslobođen i uzorci su bili izvađeni i ostavljeni u frižideru na temperaturi između 4-10°C tri dana. Kompletно infiltrirani uzorci izgledali su sjajni i transparentni.

Postupak kalupljenja i polimerizacije se sastojao iz:

- postavljanja uzoraka u pomenutu mešavinu za infiltraciju i kalupljenje, koji su čuvani u frižideru na temperaturi od 4-10°C preko noći. Posle toga uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi da bi se polimerizovali.
- Sečenje i fiksiranje sekcija

Transverzalne sekcije debljine 5µm sečene su mikrotomom, kroz sredinu eksperimentalne površine svakog uzorka. Po svakom uzorku urađeno je ukupno pet preseka. Sekcije su potom postavljane na kap 65% alkohola na mikroskopsku pločicu, u trajanju od 1-2 minuta. Posle uklanjanja viška alkohola, preko sekcija je bila postavljena tanka polietilenska folija. Sekcije su, potom, postavljane u posebnu presu u trajanju od minimum 12 sati pre procedure bojenja.

- Bojenje sekcija

Ukupno pet preseka po uzorku bojeno je Hematoksilin-eozin metodom prema navedenoj proceduri:

- Hematoksilin (Harris's hematoxylin) 3 minuta
- Ispiranje u tekućoj vodi 3 minuta
- Bazna tečnost (Scott's tap water-alkaline medium) 1 minut
- Ispiranje u tekućoj vodi 3 minuta
- Eozin (1% W/v aq.) 1 minut
- Ispiranje u tekućoj vodi 3 minuta
- Sušenje sekcija radi dehidracije

U cilju prikazivanja različitog stepena sazrevanja regenerisanog kostnog tkiva, rađena je i metoda Goldner-trihrom bojenja uzoraka prema navedenoj proceduri:

- Destilovana voda, dva puta po 15 minuta
- Weigert's hematoxylin 20 minuta
- Ispiranje u tekućoj vodi
- Diferencijacija sa 0,5% kiselog alkohola
- Ispiranje u tekućoj vodi 20 minuta
- Kisela tečnost (Ponceau/acid fuchsin/azophloxine) 5 minuta
- Ispiranje u 1% sirćetnoj kiselini 10 sekundi
- Kisela tečnost (Phosphomolybdic acid/orange G) 20 minuta
- Ispiranje u 1% sirćetnoj kiselini 10 sekundi
- *Light green* 5 minuta
- Ispiranje u tekućoj vodi
- Sušenje
- Ispiranje u alkoholu dva puta
- Ispiranje u metil cikloheksanu dva puta

Po završenom bojenju, na mikroskopsku ploču je bila postavljena kap neutralnog medijuma za fiksiranje, nakon čega je postavljena sekcija uzorka, a preko nje još jedna kap neutralnog medijuma. Pripremljena sekcija je zatim pažljivo prekrivena plastičnom folijom. Mikroskopske

pločice sa sekcijama su ostavljene na sobnoj temperaturu da bi se materijal vezao i čvrsto prionuo za sekcije.

Histološka analiza kostnog tkiva

Histološka analiza uzoraka kostnog tkiva uzetih 4 nedelje posle primene materijala za regenerativnu terapiju, korišćena je u svrhu kvalitativne analize uspešnosti regeneracije kosti (deskriptivna analiza strukture kostnog tkiva). Histološka analiza je urađena na mikroskopu Olympus BX-51. Centralna sekcija svakog uzorka, ocenjivana je na prisustvo novoformiranog kostnog tkiva, kostne srži, vezivnog tkiva, neresorbovanog materijala za regeneraciju i novoformiranih krvnih sudova kao i vizualizacije ćelija u regenerisanom tkivu, i to pri različitim uveličanjima. Analiza panoramskih fotografija je prikazala prisustvo ukupne površine augmentacije, kao i originalne kosti na ivicama defekata. Ukupna površina augmentacije se sastoji od tkiva koja se nalaze između granica defekta, kao što su novoformirana kost, vezivno tkivo, krvni sudovi, kostna srž i neresorbovani ostaci materijala za regeneraciju (Lim i sar. 2009, Hwang i sar. 2012) (Slika 12).



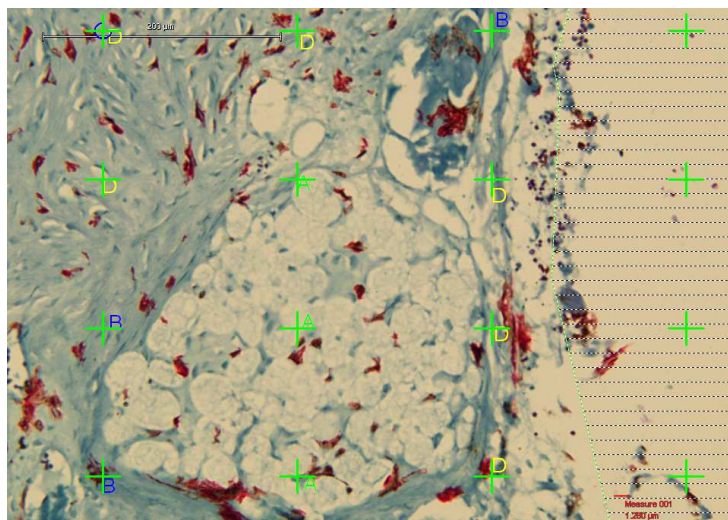
Slika 12. Šematski prikaz analiziranih panoramskih fotografija

Histomorfometrijska analiza kostnog tkiva

Histomorfometrijska analiza je obuhvatala kvantitativnu procenu uspešnosti regenerativne terapije merenjem procentualne zastupljenosti različitih struktura kosti, kao i prisustvo materijala za regenerativnu terapiju. S tim u vezi, registrovano je: novoformirano mineralizovano kostno tkivo, kostna srž, vezivno tkivo, krvni sudovi i neresorbovani materijal za regeneraciju.

Histomorfometrijska analiza je urađena u Odeljenju citologije, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, primenom NewCAST stereološkog softverskog paketa (VIS – Visiopharm Integrator System, version 2.12.1.0; Visiopharm; Denmark). Od laboratorijske opreme za histomorfometriju korišćeni su: mikroskop (Olympus BX-51), opremljen motorizovanim stočićem (Prior) sa preciznošću pomeranja po x-y osi od 1 μm i pomeranjem stočića po z osi sa preciznošću od 0.2 μm , kontrolisano mikrokatorom (Heidenhain MT1201), zatim CCD video kamera (PixeLink), koja je povezana za 19" kompjuterski monitor i mikroskop. Pri analizi korišćeni su planahromatski objektivni visoke numeričke aperture, uvećanja 4x, 20x i 100x. Rad NewCAST stereološkog sistema je zasnovan na generisanju interaktivne stereološke mrežice i disektorskog rama na kojem je merena procentualna zastupljenost analiziranog tkiva, na ukupno četiri zone izabrane slučajnim izborom na jednom fotografisanom preseku (Slika 13). Po uzorku su analizirane četiri centralne sekcije, sa razmakom od 50 μm između sekcija. Morfometrijsko merenje je urađeno korišćenjem konačnog uvećanja od 490 x.

Procentualna zastupljenost (V_v) analiziranog tkiva i materijala za regeneraciju izračunata je na osnovu formule $V_v(\%) = P_p/P_t \times 100$, gde P_p predstavlja broj pogodaka u određeno tkivo, a P_t ukupan broj pogodaka u testiranu referentnu zonu. Procentualna zastupljenost je izračunata za svaku merenu komponentu po analiziranoj sekciji tkiva. Zatim je izračunata srednja vrednost za sve četiri sekcije, predstavljajući procentualne vrednosti za jedan uzorak.



Slika 13. Stereološka mrežica i disektorski ram kod histomorfometrijske analize

Priprema uzoraka za određivanje VEGF-a i BMP2

Četiri nedelje posle primene materijala za regeneraciju, biološki materijal iz uzetog uzorka je stavljen u individualne ependorf epruvete, trenutno je zamrznut u tečnom azotu, a zatim čuvan na temperaturi od -70°C do naredne laboratorijske faze. U narednoj fazi, nakon odmrzavanja, prikupljeni uzorci, zbog prisustva kostnog tkiva, su se pripremili postupcima demineralizacije (1.2M HCL na 4°C , tokom noći), kao i ekstrakcije (6M guanidin HCL+100ml Tris+0.125M EDTA, na 4°C , 72 sata) i precipitacije (acetona) proteina. U individualne epruvete sa uzorcima, ubačena je odgovarajuća količina (500 μl /10mg tkiva- uputstvo proizvođača) pufera za lizu tkiva, obezbeđenim u kompletima za analize VEGF (RayBiotech Inc, Norcross, GA, USA). Tkivo je zatim manuelno homogenizovano staklenim štapićima odgovarajuće veličine, u individualnim epruvetama, na temperaturi od 4°C . Nakon ovoga, lizat je centrifugiran na 5000 obrtaja u trajanju od 10 min u mikrocentrifugi Heraeus*Biofuge Primo R (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Izdvojeni supernatant za svaki uzorak je zatim podeljen u dve ependorf posude: a) alikot za analizu nivoa VEGF i b) alikot za analizu nivoa BMP-2. Do pomenutih analiza, supernatanti su čuvani na -70°C .

Određivanje nivoa VEGF i BMP2 urađeno je u Laboratoriji za eksperimentalni rad na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Za kvantitativno merenje nivoa VEGF i

BMP2 u novoformiranom regenerisanom kostnom tkivu korišćen je komercijalni ELISA kit za VEGF (Human VEGF Quantikine[®] ELISA Kit, R&D Systems Inc, Norcross, GA, USA) i BMP2 (Quantikine[®] Immunoassay, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA).

Eksperimentalni protokol za ELISA

ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) je vrsta biohemijske analize koja se koristi za kvalitativno i kvantitativno određivanje supstanci, obično proteina, u heterogenim rastvorima. Ukoliko ispitivana supstanca nije u rastvoru (npr. nalazi se u tkivu), ona se mora prevesti u tečnu fazu da bi mogao da se primeni ELISA metod. U osnovi ovog analitičkog postupka je imunohemijska reakcija antigen-antitelo. Esej se obično dizajnira da se ispitivana supstanca ponaša kao antigen koji se tokom analize vezuje za njemu specifično primarno antitelo prisutno u analitičkom sistemu formirajući kompleks antigen-antitelo. Količina stvorenih kompleksa proporcionalna je količini prisutnog antigena koji se ispituje. Da bi se utvrdilo prisustvo i količina kompleksa antigen-antitelo uvodi se sekundarno antitelo za koje je vezan (konjugovan) enzim kao *reporterni molekul*. Funkcija enzima je da učini ovaj kompleks detektabilnim. Naime, u reakcionom rastvoru se u ovoj fazi dodaje enzimu specifičan supstrat koji u reakciji menja boju. Intenzitet boje je izraženiji što je veća količina prisutnog enzima. Obzirom da je intenzitet enzimske reakcije definisan količinom stvorenog kompleksa primarno antitelo-antigen-sekundarno antitelo ovo predstavlja osnovu za preciznu kvantitativnu procenu posmatrane supstance. Meranjem intenziteta svetlosti određene talasne dužine propuštene kroz reakcionu rastvor dobija se fizička osnova za izračunavanje prisustva ili koncentracije posmatrane supstance.

Za kvantitativno merenje nivoa VEGF i BMP2 u novoformiranom regenerisanom kostnom tkivu korišćen je komercijalni ELISA kit za VEGF (Human VEGF Quantikine[®] ELISA Kit, R&D Systems Inc, Norcross, GA, USA) i BMP2 (Quantikine[®] Immunoassay, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). Postupak je sproveden u svemu prema uputstvu proizvođača. Biohemijske reakcije su se odvijale na mikrotitracionim pločicama obezbeđenim u okviru korišćenih kompleta. Svaka mikrotitraciona pločica je imala 96 reakcionih komora pokrivenih imobilisanim primarnim antitelima za odgovarajući faktor rasta. U svaku komoru je ubačena propisana količina uzorka ili standarda. Nakon propisanog vremena inkubacije u reakcione komore uliveno je i sekundarno antitelo i ponovo inkubirano. U BMP2 kompletima sekundarno

antitelo proizvođač je konjugovao enzimom peroksidaza iz rena. U VEGF kompletima sekundarno antitelo nije prethodno konjugovano enzimom već je vezano za biotin. Zato postoji dodatni korak kada se dodaje enzim, takođe peroksidaza rena, konjugovana sa streptavidinom koji ima veliki afinitet za biotin i tako se vezuje za prethodno formirani kompleks. Nakon ispiranja dodat je rastvor peroksidaznog supstrata, a to je u svim korišćenim esejima 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidin. Pod dejstvom enzima ovo jedinjenje menja boju u plavu, pri čemu intenzitet boje zavisi od koncentracije posmatranog faktora rasta u uzorku. U poslednjem koraku svih korišćenih eseja enzimska reakcija je prekidana 2N sumpornom kiselinom, pri čemu se boja reakcionih rastvora menjala iz različitih intenziteta plave u različite intenzitete žute boje. Očitavanje absorbanci, odnosno optičkih gustina (OD) rastvora urađeno je odmah po prekidu reakcija na aparatu Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Izračunavanje koncentracija posmatranih faktora rasta izvršeno je na osnovu standardnih kriva konstruisanih za svaki izvedeni esej. Naime, u odgovarajuće reakcione komore mikrotitracionih pločica pipetirani su i rastvori analiziranih faktora rasta poznatih koncentracija u serijskom razblaženju i dobijene njihove OD. Korišćenjem programa Sigma Plot 12 (SyStat Software Inc, IL, USA) određena je formula standardne krive koja najbolje reprezentuje dobijene vrednosti i pomoću nje su na osnovu izmerenih OD izračunate nepoznate koncentracije posmatranih faktora rasta u uzorcima. Za svaki uzorak (i standard) su sprovedena dva merenja i krajnja koncentracija uzorka (standarda) izračunata je kao njihova srednja vrednost.

Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani u obliku procenata, srednjih vrednosti \pm standardna devijacija. Za analizu dobijenih razlika između ispitivanih grupa korišćen je statistički program (SPSS 10.0, SPSS, Chicago).

Obzirom da vrednosti posmatranih parametara vezanih za histomorfometrijsko ispitivanje nisu pokazivale normalnu raspodelu (Kolmogorov-Smirnov test, $p < 0.05$), za njihovu analizu upotrebljeni su neparametarski statistički testovi. Za analizu procentualne zastupljenosti novoformiranog kostnog tkiva, kostne srži, vezivnog tkiva, neresorbovanog materijala za regeneraciju i krvnih sudova u okviru grupa, zdravih i DM, korišćen je Friedman test i post-hoc Wilcoxon Signed Ranks test. Poređenje između grupa zdravih i DM, urađeno je Mann-Whitney testom.

Vrednosti posmatranih koncentracija VEGF i BMP2 pokazivale su normalnu raspodelu (Kolmogorov-Smirnov test, $p > 0.05$). Razlike u koncentraciji VEGF i BMP2 u okviru grupa su analizirane Anova testom i post-hoc Tuckey testom, dok je u analizi između grupa (zdravih i DM) korišćen t-test. Vrednosti $p < 0.05$ su se smatrale statistički značajnim.

REZULTATI

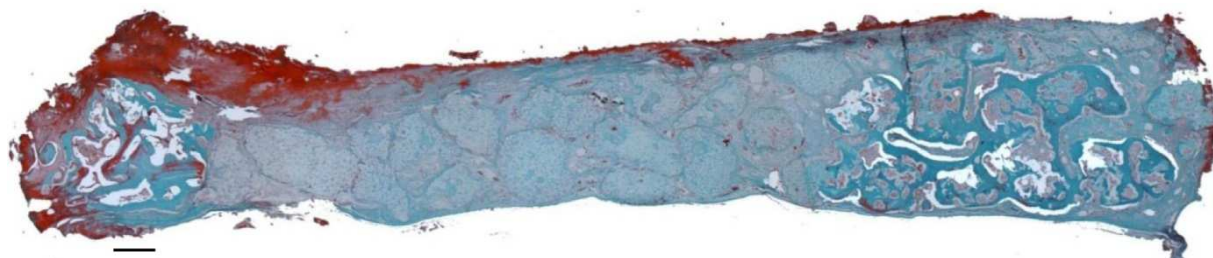
Preliminarna studija

Imajući u vidu protokol kontrolisane studije, koji je obuhvatao komparativnu analizu više materijala za regenerativnu terapiju, kao eksperimentalni model je predložen model sa četiri kritična defekta kosti kalvarije kunića. Rezultati analize preliminarnе studije, koji su obuhvatali analizu modela sa dva defekta regenerisana sa β TKF i autotransplantatom, bili su uključeni u analizu rezultata kontrolisane komparativne studije.

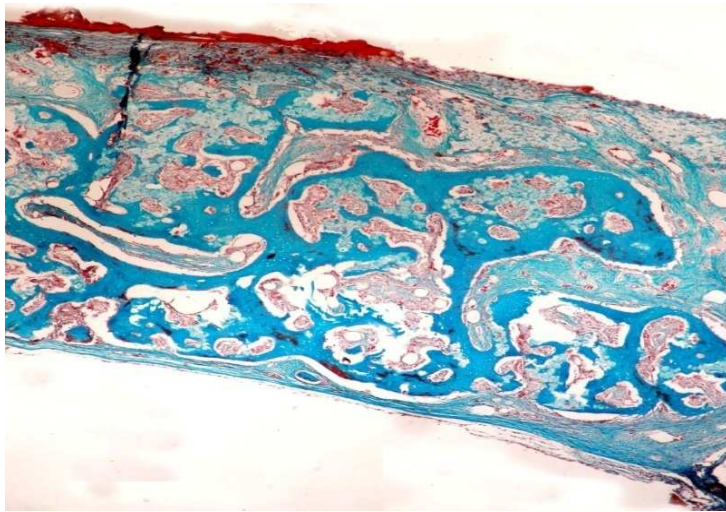
Rezultati histološke i histomorfometrijske analize u okviru preliminarnе studije, u kojoj je učestvovalo ukupno 8 životinja, pokazali su potpunu uspešnost preživljavanja životinja sa eksperimentalno izazvanim DM tip I. Analiza intraoperativnih i postoperativnih eksperimentalnih faza nije pokazala značajnu razliku u pojavi neželjenih efekata kod dijabetičnih kunića, bez obzira na broj i veličinu kritičnih defekata kosti kalvarije.

Histološka analiza

Histološka analiza 4 nedelje posle primene β TKF kod dijabetičnih kunića je pokazala partikule ovog materijala u centralnom delu defekta okruženih vezivnim tkivom, dok je novoformirano kostno tkivo bilo prisutno na periferiji defekta i u kontaktu sa kosti kalvarije (Slika 14). Novoformirano, nemineralizovano kostno tkivo sa retkim osteoblastima, registrovano je na većem uveličanju unutar poroznog sistema materijala ili u vidu ostrva novoformirane kosti u vezivnom tkivu (Slika 15).



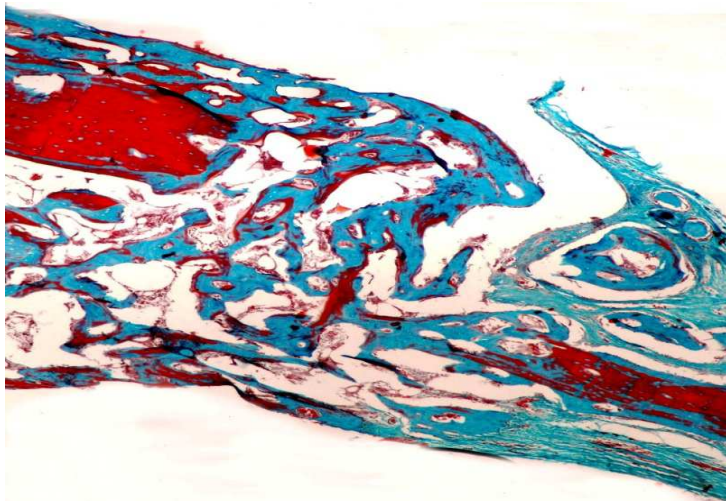
Slika 14. Panoramski prikaz defekta sa β TKF kod kunića sa DM. Goldner-trichrome, bar-400 μ



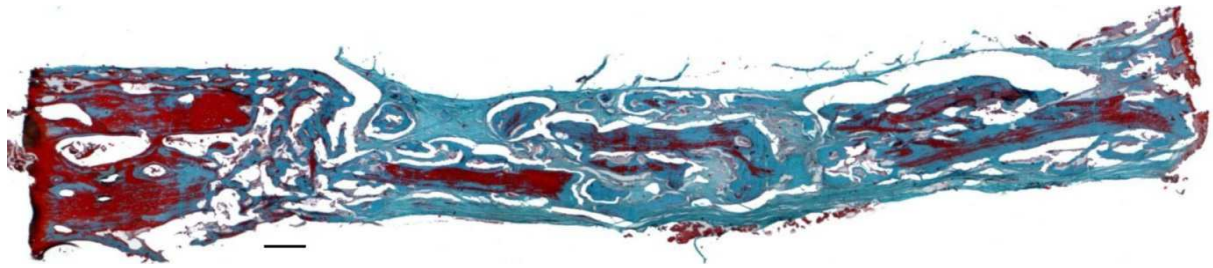
Slika 15. Novoformirano kostno tkivo sa retkim osteoblastima i malom količinom kostne srži. Goldner-trichrome, bar-200 μ

Rezidualne granule β TKF su uglavnom inkorporirane u nezrelo kostno tkivo. Goldner-trichrome, bar-200 μ

Defekti regenerisani sa autotransplantatom su pokazali trabekularnu strukturu koju formira nezrela novoformirana kost i široke intertrabekularne prostore sa vezivnim tkivom (Slika 16). Analiza je pokazala i da je autotransplantat, koji je u najvećoj meri opisan sa proširenim lakunama bez prisutnih osteocita, dobro inkorporiran u novoformiranu kost koja je bila okružena osteoblastima (Slika 17).



Slika 16. Defekt regenerisan autotransplantatom. Prisutna je nezrela novoformirana kost, okružena kostnom srži i ostacima autotransplantata. Goldner-trichrome, bar-200 μ



Slika 17. Panoramski prikaz defekta sa autotransplantatom kod kunića sa DM. Goldner-trichrome, bar-400 μ

U kontrolnoj grupi, male količine novoformirane kosti su registrovane na periferiji defekta, dok su centralni delovi defekta bili popunjeni fibroznim vezivnim tkivom sa retkim ostrvima novoformirane kosti (Slika 18).



Slika 18. Panoramski prikaz kontrolnog defekta kod kunića sa DM. Goldner-trichrome, bar-400 μ

Histomorfometrijska analiza

Rezultati histomorfometrijske analize su prikazani u Tabeli 2. Značajno veći procenat regenerisane kosti je bio registrovan u grupama u kojima je primenjen autotransplantat i β TKF u odnosu na kontrolnu grupu, kao i između defekata tretiranih autotransplantatom i β TKF. Defekti popunjeni sa oba primenjena materijala, β TKF i autotransplantat, su imala značajno manji procenat vezivnog tkiva u odnosu na kontrolne defekte. Analiza unutar grupa je pokazala značajno više nove kosti i neresorbovanog materijala u odnosu na vezivno tkivo u grupi sa autotransplantatom, dok je ova značajna razlika uočena samo za novoformiranu kost u odnosu na vezivno tkivo u grupi sa β TKF-om (Tabela 2).

Tabela 2. Histomorfometrijski rezultati preliminarnog istraživanja

Parametri	AUTO	β TKF	AUTO	p
Kost	53,15 \pm 10,82	30,15 \pm 5,71	7,32 \pm 8,40	0,030 ^a 0,008 ^b 0,000 ^c
Vezivno tkivo	14,41 \pm 7,24	22,39 \pm 11,57	92,68 \pm 5,63	0,000 ^b 0,000 ^c
Materijal	32,44 \pm 9,17	47,46 \pm 6,92	0	ns
p	0,004 ^d 0,021 ^e	0,042 ^e	0,000 ^d	

Statistička značajnost između grupa (Friedman test, *post hoc* Wilcoxon signed ranks test): ^aAUTO vs β TKF; ^b β TKF vs KON; ^cAUTO vs KON. Statistička značajnost u okviru grupe (Friedman test, *post hoc* Wilcoxon signed ranks test): ^dkost vs vezivno tkivo; ^evezivno tkivo vs materijal. β TKF-beta trikalcijum fosfat; AUTO-autotransplantat; KON-kontrola.

Kontrolisana, komparativna studija

U studiju je bilo uključeno ukupno 20 životinja (9 zdravih i 11 sa DM). U prvih 7 dana posle indukcije DM tip I, letalan ishod je registrovan kod 1 zdravog i 3 kunića sa indukovanim DM tip I, tako da je u daljoj analizi rezultata uključeno 8 zdravih i 8 kunića sa indukovanim DM. Praćenjem glikemije kod kunića, DM tip I je bio razvijen u formi nekontrolisanog DM čije vrednosti nisu prelazile vrednosti date u protokolu rada. Kod svih životinja nisu zabeleženi drugi neželjeni efekti, značajan gubitak u težini, kao ni prisutna infekcija posle hirurške intervencije.

Deskriptivne makroskopske karakteristike uzorka

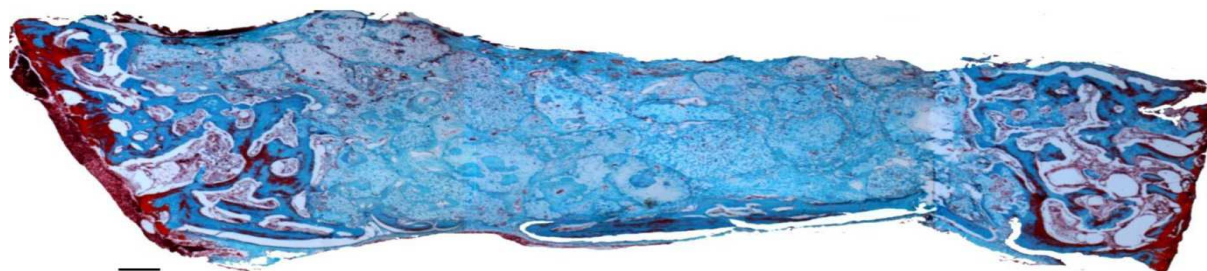
Makroskopska analiza uzoraka je pokazala regeneraciju defekata kosti u obe ispitivane grupe, kako kod zdravih tako i kod kunića sa indukovanim DM tip I, pri čemu u obe grupe, kontrolni defekti nisu bili u celosti ispunjeni kostnim tkivom, već se u centralnim delovima uočavalo vezivno tkivo. Nadalje, kod zdravih i kod DM kunića, kod kojih je primenjen β TKF i kombinacija β TKF/HA, bili su prisutne vidljive partikule materijala u centralnim delovima defekta, što nije bio slučaj sa defektima popunjenim autotransplantatom.

Histološka analiza

Histološka analiza panoramskih fotografija defekata kritične veličine je pokazala da nijedan defekt nije u potpunosti zarastao kostnim tkivom, 4 nedelje nakon primene materijala za regeneraciju. Takođe, primenjeni materijali nisu pokazali znakove inflamatorne reakcije.

Kostni defekti tretirani sa β TKF

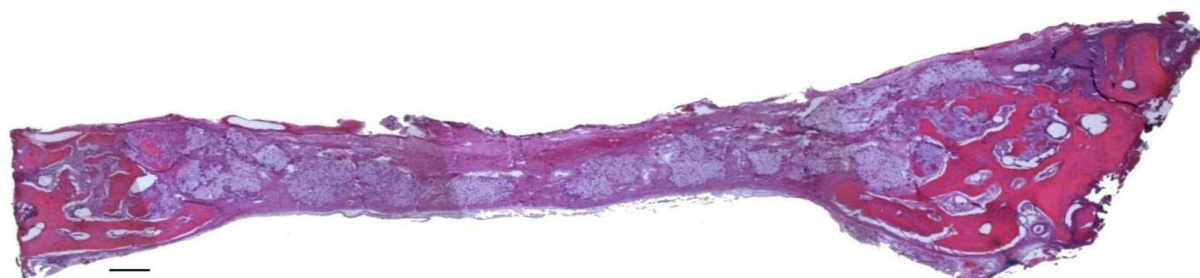
Histološkom analizom panoramskih fotografija defekata tretiranih sa β TKF, pokazano je prisustvo neresorbovanih granula materijala i vezivnog tkiva u augmentiranoj regiji, kao i mineralizovane kosti koja se nalazi na ivicama defekta (Slika 19, 20). Veća količina vezivnog tkiva je registrovana u centralnim delovima defekata kod eksperimentalnih životinja sa indukovanim DM (Slika 21).



Slika 19. Panoramski izgled defekta sa β TKF kod zdravih kunića. Goldner-trichrome, bar-400 μ

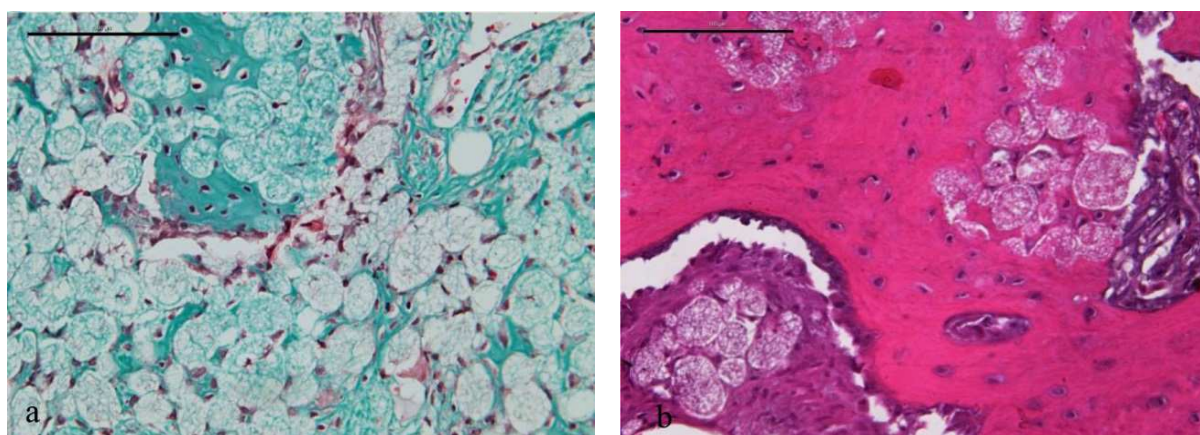


Slika 20. Panoramski izgled defekata tretiranih sa β TKF kod zdravih kunića. HE, bar-400 μ



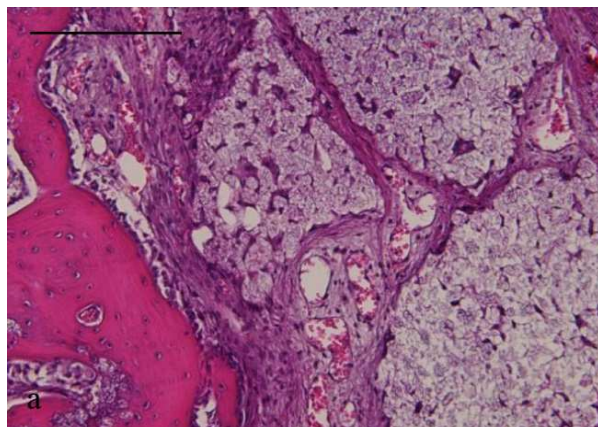
Slika 21. Panoramski izgled defekata tretiranih sa β TKF kod kunića sa DM. HE, bar-400 μ

U okviru augmentiranih regija zapažene su neresorbovane granule β TKF, između kojih su bila prisutna ostrvca novoformirane kosti, kao i aktivni osteoblasti koji produkuju osteoid (Slika 22a). Novoformirana kost, kao i aktivni osteoblasti su takođe primećeni na periferiji defekta u kontaktu sa kosti primajuće regije (nativna kost) (Slika 22b). Unutar novoformirane mineralizovane kosti nalazile su se inkorporirane granule neresorbovanog materijala (Slika 22b). Veći broj novoformiranih krvnih sudova je bio prisutan u vezivnom tkivu i između neresorbovanih granula β TKF (Slika 23a, 23b). Kod životinja sa eksperimentalno izazvanim DM je primećena veća količina vezivnog tkiva u augmentiranoj regiji. Takođe je uočeno da je pored osteogeneze, sa prisutnim centrima stvaranja nove kosti na periferiji i između neresorbovanih granula β TKF, bila prisutna i angiogeneza (Slika 24a i 24b).

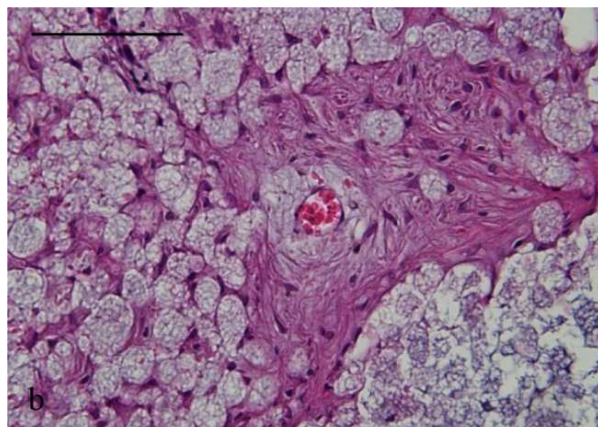


Slika 22a. Između neresorbovanih granula β TKF, uočavaju se ostrvca novoformirane kosti (zelene boje), kao i aktivni osteoblasti koji produkuju osteoid (crvene boje). Goldner-trichrome, bar-100 μ m

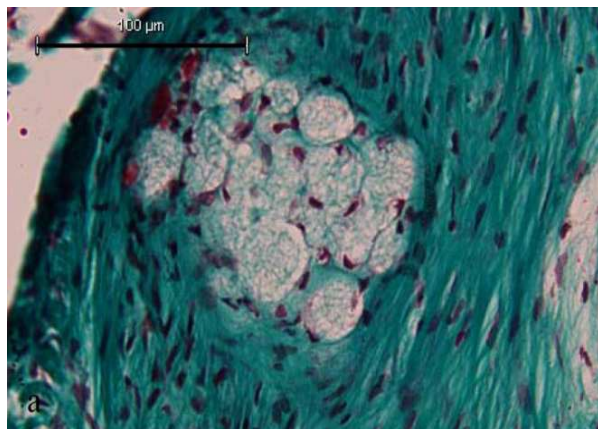
Slika 22b. Zapažaju se granule β TKF koje su inkorporirane u deo nativne kosti. HE bar-100 μ m



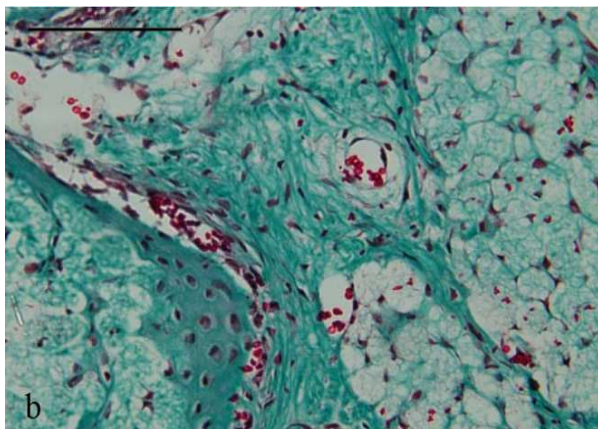
Slika 23a. Veći broj novoformiranih krvnih sudova u okviru augmentirane regije i aktivna osteogeneza na granici sa nativnom kosti. HE, bar-100 μm



Slika 23b. Novoformirani krvni sud koji prolazi između neresorbovanih granula βTKF. HE, bar-100 μm



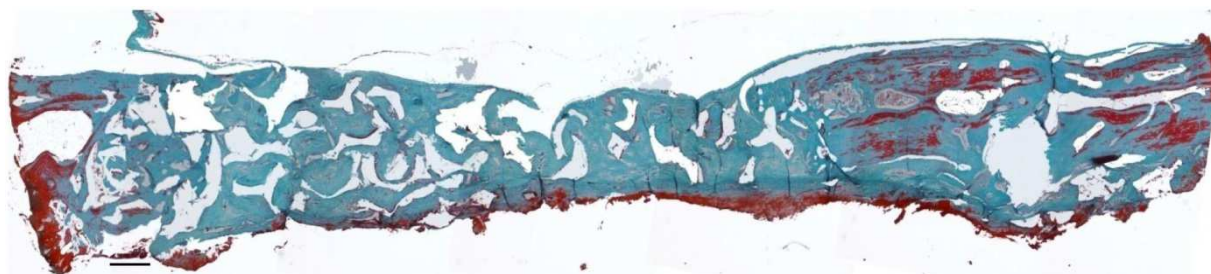
Slika 24a. U okviru fibroznog vezivnog tkiva uočavaju se granule βTKF. Na periferiji, kao i između granula postoje aktivni centri stvaranja nove kosti, kod kunića sa DM. Goldner-trichrome bar-100 μm



Slika 24b. Prisutna angiogeneza kod kunića sa DM. Goldner-trichrome bar-100 μm

Kostni defekti tretirani sa β TKF/HA

Deskriptivna histološka analiza defekata tretiranih sa β TKF/HA pokazala je postojanje praznih prostora nepravilnog oblika u augmentiranoj regiji koje odgovaraju neresorbovanim ostacima materijala, koji je se ne vidi zbog procesa histološke pripreme i demineralizacije. Takođe se uočava vezivno tkivo, kao i novoformirano kostno tkivo. Na ivicama defekta je prisutna nativna kost (Slika 25, 26). Slično kao i u prethodnoj grupi, primećena je veća količina vezivnog tkiva, kod eksperimentalnih životinja sa indukovanim DM (Slika 27).



Slika 25. Panoramski izgled defekta sa β TKF/HA kod zdravih kunića. Goldner-trichrome bar-400 μ m

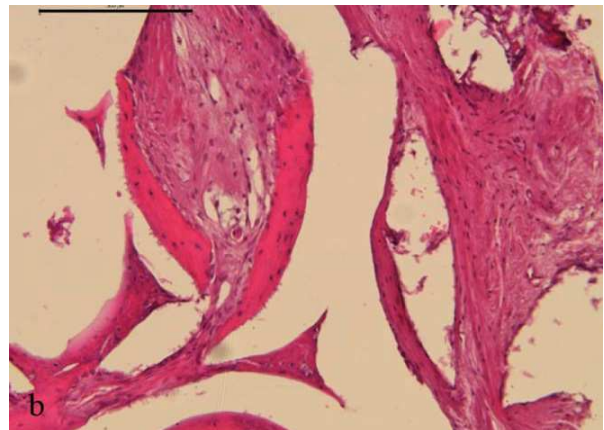
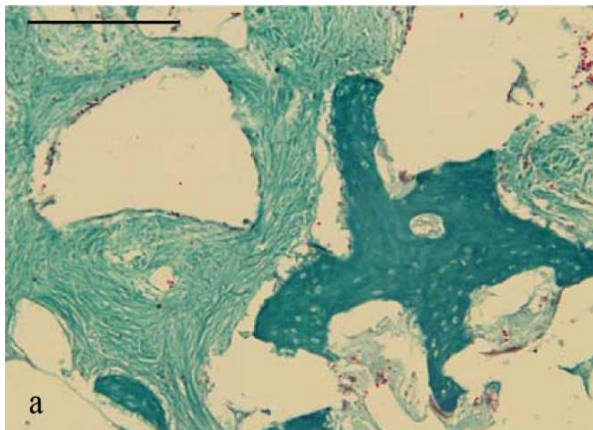


Slika 26. Panoramski izgled defekta sa β TKF/HA kod zdravih kunića. HE bar-400 μ m



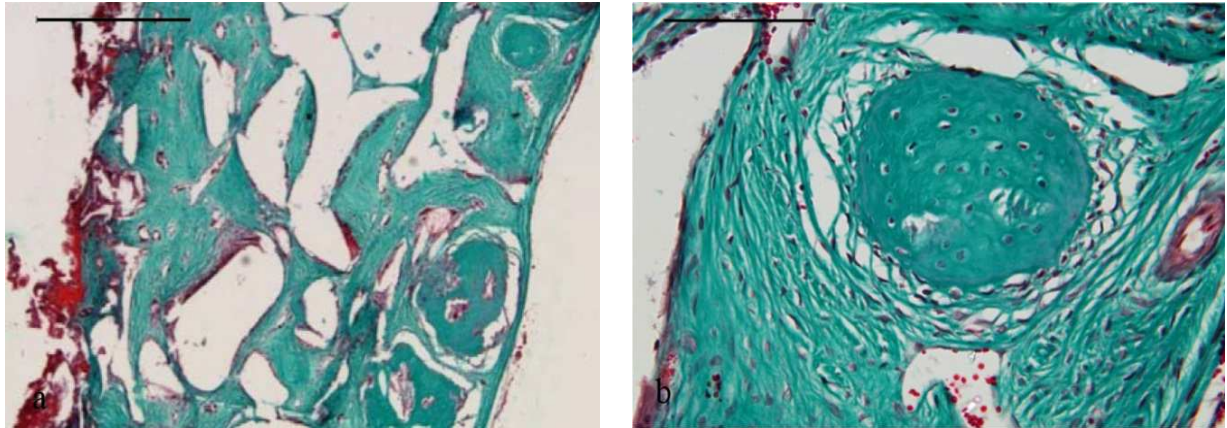
Slika 27. Panoramski izgled defekta sa β TKF/HA kod kunića sa DM. Goldner-trichrome bar- 400 μ m

Ostrva novoformirane kosti, kao i vezivno tkivo sa manjim brojem krvnih sudova su bili prisutni između neresorbovanih ostataka materijala (Slika 28a, 28b). Novoformirana kost je zalazila u prazne prostore, nepravilnog, nareckanog izgleda, koji odgovaraju neresorbovanim delovima β TKF/HA (Slika 28b). Primećene su i aktivne ćelije na granici vezivnog tkiva i neresorbovanog materijala, odgovorne za stvaranje nove kosti (Slika 28b). Kod eksperimentalnih životinja sa indukovanim DM, ostrvca novoformirane kosti su bila okružena sa većom količinom vezivnog tkiva (Slika 29a, 29b).



Slika 28a. Uočavaju se ostrvca novoformirane kosti i vezivno tkivo sa krvnim sudovima. Prazni prostori odgovaraju materijalu (β TKF/HA), koji je procesom demineralizacije uklonjen. Goldner-trichrome, bar-200 μ m

Slika 28b. Ostrva novoformirane kosti zalaze u prostore koji odgovaraju neresorbovanom β TKF/HA. HE, bar-200 μ m



Slika 29a. Ostrvca novoformirane kosti su okružena vezivnim tkivom i neresorbovanim ostacima materijala, kod kunića sa DM. Goldner-trichrome bar-100 μm .

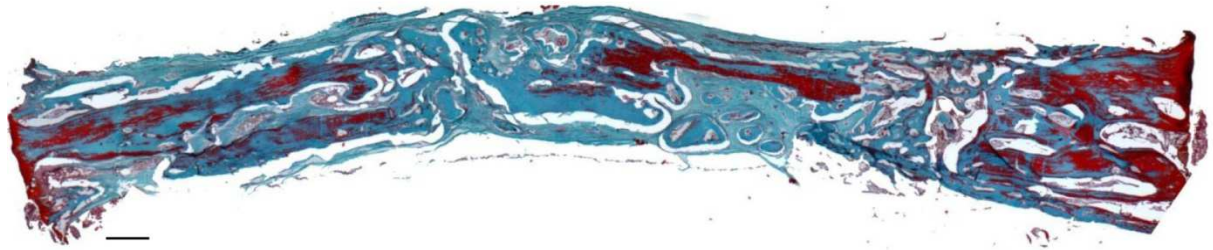
Slika 29b. Detalj sa prethodne fotografije. Uočavaju se aktivne ćelije na periferiji kostnog ostrvca, kao i prema neresorbovanim delovima materijala. Goldner-trichrome, bar-100 μm .

Kostni defekti tretirani sa AUTO

Panoramske fotografije kostnih defekata popunjanih AUTO pokazuju prisustvo lamelarne kosti sa praznim lakunama (što odgovara autotransplantatu), novoformiranog kostnog tkiva, vezivnog tkiva i nativne kosti (Slika 30, 31). Vezivno tkivo u augmentiranoj regiji je bilo zastupljenije kod eksperimentalnih životinja sa indukovanim DM (Slika 32)



Slika 30. Panoramski izgled defekta sa AUTO kod zdravih kunića. HE, bar-400 μm .

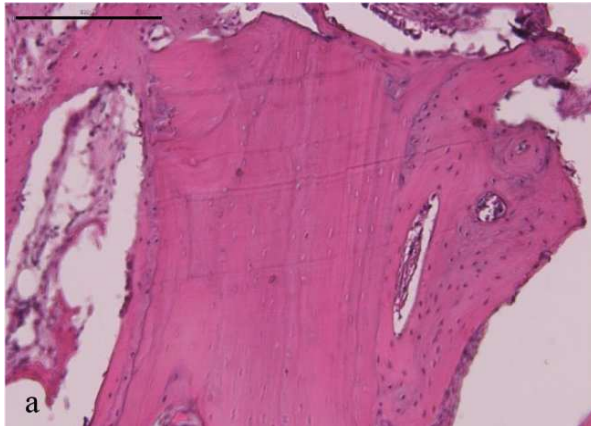


Slika 31. Panoramski izgled defekta sa AUTO kod zdravih kunića. Goldner-trichrome, bar- 400 μm .

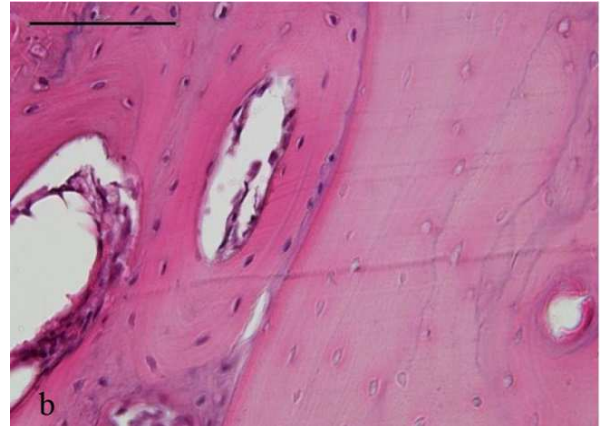


Slika 32. Panoramski izgled defekta sa AUTO životinja sa indukovanim DM. HE, bar- 400 μm

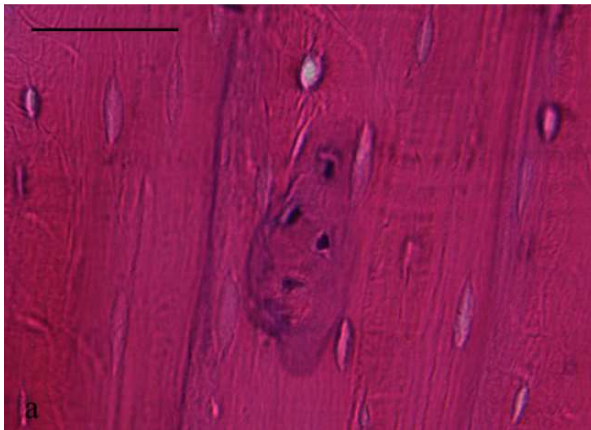
Histološkom analizom kostnog tkiva kod AUTO je uočeno odsustvo osteocita u lakunama (Slika 33a). Primećeni su aktivni osteoblasti koji proizvode osteoid, na granici autotransplantata sa nativnom kosti i sa vezivnim tkivom (Slika 33b). Aktivni centri osteogeneze su bili prisutni i unutar samog AUTO (Slika 34a, 34b). U grupi sa indukovanim DM, zapažena je veća količina vezivnog tkiva oko autotransplantata (Slika 35a, 35b).



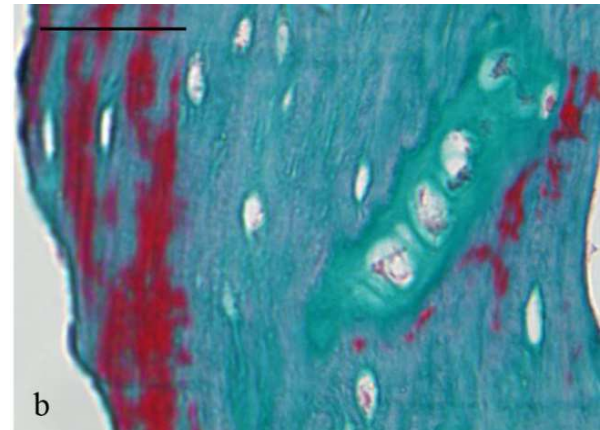
Slika 33a. Karakterističan izgled AUTO sa praznim osteocitnim lakunama. HE, bar-200 μ m.



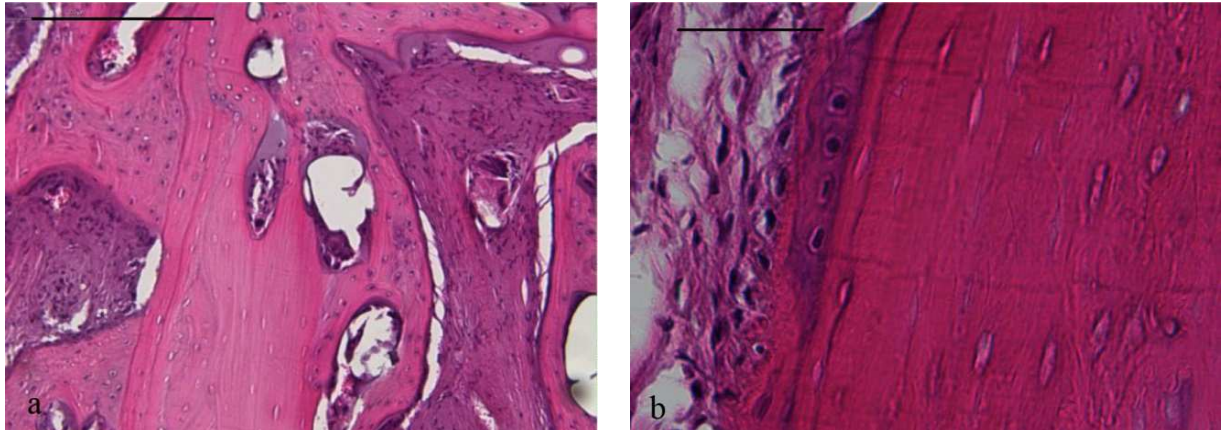
Slika 33b. Zapažaju se aktivni osteoblasti koji proizvode osteoid na granici između AUTO i native kosti. HE bar-100 μ m.



Slika 34a. Aktivni osteoblasti unutar autotransplantata. HE, bar- 100 μ m.



Slika 34b. Aktivan proces osteogeneze u okviru autotransplantata. Goldner-trichrome bar-100 μ m.

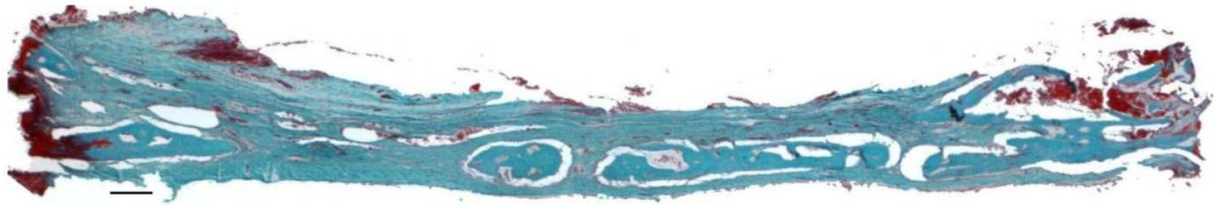


Slika 35a. Kod DM uočava se veća količina vezivnog tkiva oko autotransplantata. HE, bar-200 μm .

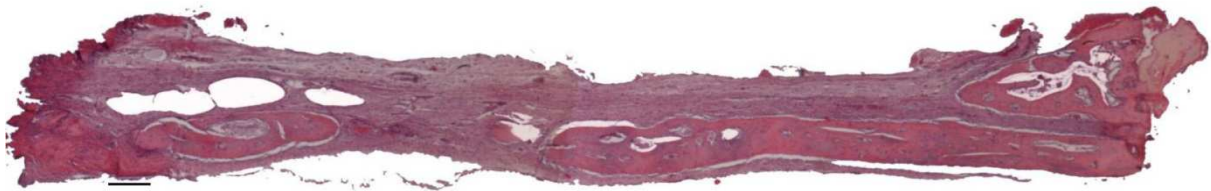
Slika 35b. Aktivni osteoblasti proizvode osteoid na mestu kontakta AUTO i vezivnog tkiva. HE, bar- 100 μm .

Kontrolni kostni defekti

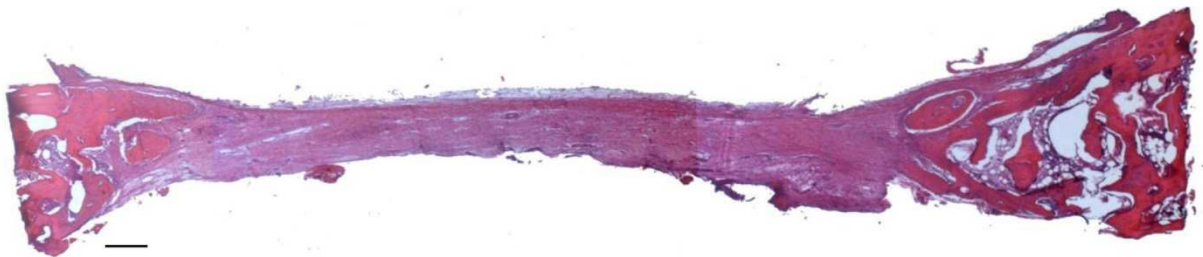
Histološka analiza praznih (kontrolnih) defekata pokazala je postojanje veće količine vezivnog tkiva, dok je novoformirana kost bila prisutna uglavnom na ivicama defekta. Ostrvca novoformirane kosti u centralnim delovima defekata su se mogla zapaziti samo kod zdravih eksperimentalnih životinja (Slika 36, 37), za razliku od dijabetičnih, gde je dominiralo vezivno tkivo (Slika 38, 39, 41). Novoformirano kostno tkivo je bilo prisutno uz nativnu kost (Slika 40a), kao i delimično u centralnim delovima defekta u vidu kostnih ostrvaca (Slika 40b).



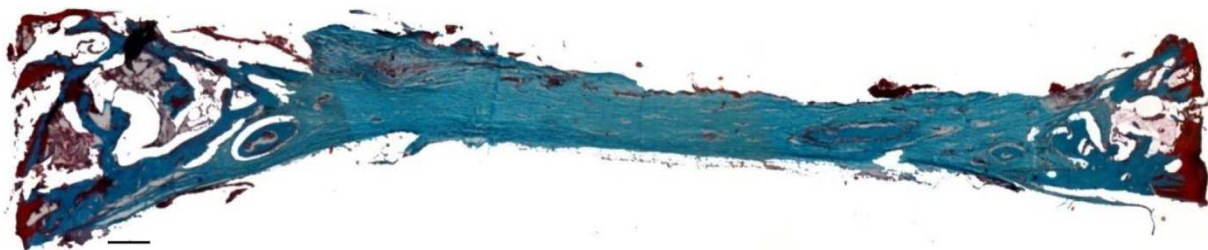
Slika 36. Panoramski izgled kontrolnog defekta kod zdravih kunića. Goldner-trichrome, bar-400 μm



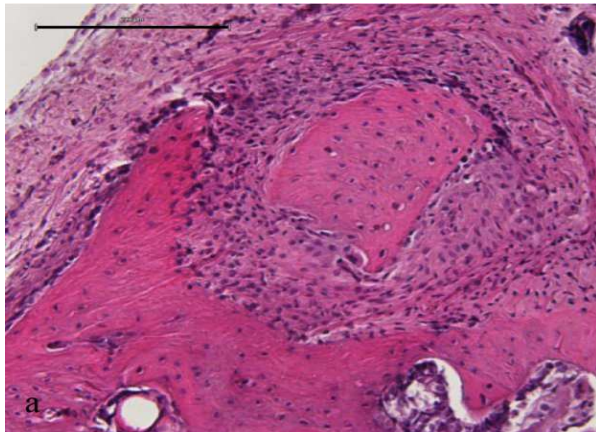
Slika 37. Panoramski izgled kontrolnog defekta kod zdravih kunića. HE, bar-400 μm .



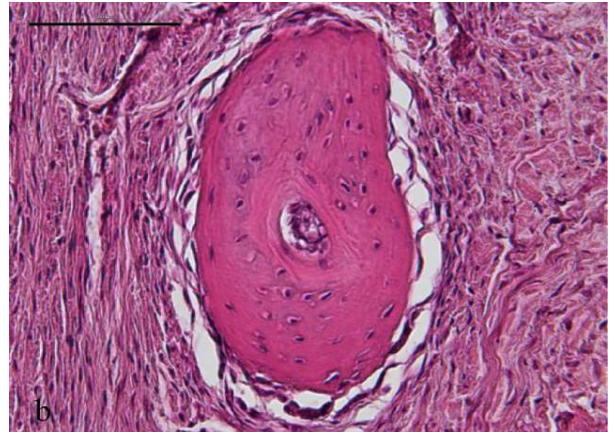
Slika 38. Panoramski izgled kontrolnog defekata kod kunića sa indukovanim DM. HE, bar- 400 μm .



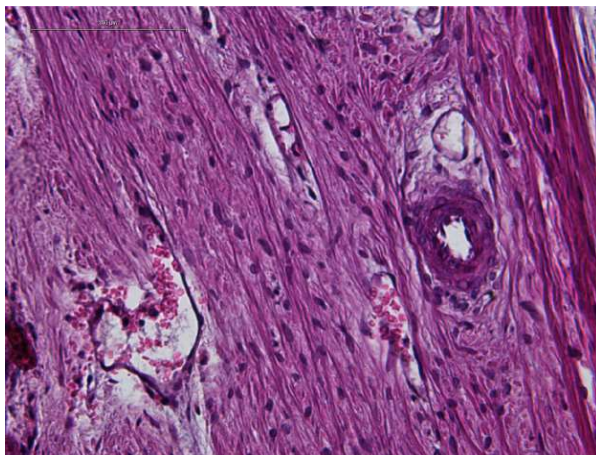
Slika 39. Panoramski izgled kontrolnog defekta kod kunića sa DM. Goldner-trichrome, bar-400 μm .



Slika 40a. Novoformirano kostno tkivo nalazi se na ivici defekta uz nativnu kost i u vezivnom tkivu. HE, bar-200 μm .



Slika 40b. Zapažaju se aktivne ćelije na površini kostnog ostrvaca u centralnom delu defekta. HE, bar-100 μm .



Slika 41. Vezivno tkivo sa novoformiranim krvnim sudovima, bez znakova stvaranja nove kosti, kod kunića sa DM. HE bar-100 μm .

Histomorfometrijska analiza

Rezultati histomorfometrijske analize su prikazani u tabeli 3, dok su rezultati statističke *post-hoc* analize prikazani u tabelama 4 i 5.

Dobijeni rezultati unutar grupe kunića sa eksperimentalno indukovanim DM tip I, 4 nedelje posle regenerativne terapije, pokazali su značajno povećanje novoformirane kosti i kostne srži u defektima tretiranim AUTO u odnosu na rezultate dobijene u defektima posle primene β TKF, β TKF/HA i kontrolnoj grupi. Značajna razlika u pomenutim strukturama regenerisane kosti uočena je i između β TKF i β TKF/HA. S druge strane, značajna razlika nije bila prisutna kada je analizirano vezivno tkivo i novoformirani krvni sudovi, čija je zastupljenost bila znatno niža u defektima regenerisanim AUTO u odnosu na druge defekte. Značajno manje vezivnog tkiva registrovano je i u defektima sa β TKF u odnosu na defekte tretirane sa β TKF/HA. Analiza prisustva neresorbovanih partikula materijala je pokazala značajnu razliku između β TKF/HA grupe i ostalih ispitivanih grupa, dok je procenat materijala bio podjednak u AUTO i β TKF (Tabela 3, 4).

Rezultati regeneracije kosti zdravih kunića, 4 nedelje posle primene regenerativne terapije, pokazali su značajno više novoformirane kosti i kostne srži, kao i značajno manje vezivnog tkiva i novoformiranih krvnih sudova u defektima regenerisanim AUTO u odnosu na defekte kod kojih je korišćen β TKF, β TKF/HA i kontrolne, nepopunjene defekte. Isto tako, značajna razlika uočena je i između β TKF i β TKF/HA defekata. Razlika u procentu neresorbovanog materijala nije bila uočena između analiziranih grupa (Tabela 4, 5).

Komparativna analiza u uspešnosti regenerativne terapije između defekata kosti zdravih kunića i kunića sa indukovanim DM tip I je pokazala da dijabetes melitus značajno redukuje procenat novoformirane kosti na nivou regeneracije kritičnih kosntih defekata kada se kao materijal koristio AUTO i β TKF, što nije bio slučaj posle primene β TKF/HA. Međutim, u dijabetičnim defektima regenerisanim sa β TKF/HA, bilo je prisutno značajno više neresorbovanog materijala u odnosu na iste defekte kod zdravih kunića, a što nije bio slučaj registrovan u drugim ispitivanim grupama. Procenat kostne srži je bio značajno redukovano u dijabetičnim uslovima, posle primene AUTO i u spontanom zarastanju neregnerisanih kontrolnih defekata, u odnosu na zdravu kost,

dok je procenat novoformiranih krvnih sudova bio značajno povećan kod zdravih β TKF i β TKF/HA u odnosu na DM β TKF i β TKF/HA (Tabela 4, 5).

Tabela 3. Histomorfometrijska analiza

Parametri	DM					ZDRAVI					P ^a
	βTKF	βTKF/HA	AUTO	KON	p	βTKF	βTKF/HA	AUTO	KON	p	
Kost	20,63 ± 3,78	9,82 ± 2,41	36,37 ± 4,93	5,11 ± 2,56	<0,001	28,46 ± 7,47	12,14 ± 1,49	47,09 ± 17,82	9,42 ± 2,21	<0,001	<0,05
Kostna srž	1,38 ± 0,79	0,05 ± 0,21	7,01 ± 6,36	0,71 ± 1,31	<0,05	0,43 ± 0,81	0,04 ± 0,20	18,31 ± 8,76	3,88 ± 2,99	<0,001	
Veživo tkivo	48,52 ± 5,71	53,81 ± 8,96	27,26 ± 10,91	93,13 ± 3,40	<0,001	33,65 ± 10,24	47,91 ± 8,99	4,6 ± 9,09	84,55 ± 4,32	<0,001	
Materijal	28,41 ± 5,49	35,68 ± 7,97	29,03 ± 9,78	0	<0,001	33,45 ± 9,36	38,61 ± 8,82	30,19 ± 17,52	0	<0,05	
Krvni sudovi	1,05 ± 0,78	0,64 ± 0,77	0,33 ± 0,69	1,05 ± 1,28	<0,05	4,00 ± 1,31	1,29 ± 1,23	0,04 ± 0,22	2,14 ± 2,35	<0,05	

p: značajnost unutar DM i zdravi (Friedman Test); p^a: značajnost između DM vs. zdravi (Friedman Test). βTKF: beta-trikalcijumfosfat; βTKF/HA: beta-trikalcijumfosfat u kombinaciji sa hidroksiapatitom; AUTO: autotransplantat; KON: kontrola.

Tabela 4. *Post hoc* test histomorfometrijske analize unutar DM i zdravih (Wilcoxon Signed Ranks Test)

	DM	ZDRAVI		DM	ZDRAVI
AUTO vs. β TKF			KON vs. β TKF		
Kost	<0,001	0,001	Kost	<0,001	<0,001
Kostna srž	<0,001	<0,001	Kostna srž	0,433	0,001
Vezivno tkivo	<0,001	<0,001	Vezivno tkivo	<0,001	<0,001
Materijal	0,741	0,768	Materijal	<0,001	<0,001
Krvni sudovi	0,01	<0,001	Krvni sudovi	1,000	0,004
AUTO vs. β TKF/HA			KON vs. β TKF/HA		
Kost	<0,001	<0,001	Kost	<0,001	<0,001
Kostna srž	<0,001	<0,001	Kostna srž	0,03	0,001
Vezivno tkivo	<0,001	<0,001	Vezivno tkivo	<0,001	<0,001
Materijal	0,002	0,106	Materijal	<0,001	<0,001
Krvni sudovi	0,05	0,001	Krvni sudovi	0,179	0,227
AUTO vs. KON			β TKF vs. β TKF/HA		
Kost	<0,001	<0,001	Kost	<0,001	<0,001
Kostna srž	<0,001	<0,001	Kostna srž	0,02	0,05
Vezivno tkivo	<0,001	<0,001	Vezivno tkivo	<0,001	<0,001
Materijal	<0,001	<0,001	Materijal	0,002	0,02
Krvni sudovi	0,03	0,001	Krvni sudovi	0,70	<0,001

Tabela 5. *Post hoc* test histomorfometrijske analize između DM i zdravih (Mann-Whitney U Test)

	β TKF	β TKF/HA	AUTO	KON
	DM vs. ZDRAVI	DM vs. ZDRAVI	DM vs. ZDRAVI	DM vs. ZDRAVI
Kost	<0,001	0,56	0,017	<0,001
Kostna srž	0,881	0,97	<0,001	<0,001
Vezivno tkivo	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Materijal	0,134	0,01	0,811	0
Krvni sudovi	<0,001	0,012	0,079	0,075

Kvantitativna analiza VEGF i BMP2

Kvantitativna analiza regenerativne terapije četiri nedelje posle primene materijala za regeneraciju kosti (β TKF, β TKF/HA, AUTO) je pokazala blago, ali ne značajno povećanje koncentracije VEGF i BMP2 u defektima kunića sa indukovanim DM tip I u odnosu na zdrave kuniće. Međutim, značajno povećanje koncentracije VEGF i BMP2 je registrovano u kontrolnim defektima dijabetičnih kunića, kod kojih nije primenjena regenerativna terapija, u odnosu na zdrave. Analiza značajnosti unutar grupa je pokazala jedino značajno povećanje koncentracije VEGF kod zdravih kunića tretiranih sa β TKF u odnosu na kontrolne defekte (Tabela 5).

Tabela 6. Koncentracije VEGF i BMP2 u regenerisanoj kosti

Faktori rasta (pg/ml)	DM					ZDRAVI					P ^a
	βTKF	βTKF/HA	AUTO	KON	p	βTKF	βTKF/HA	AUTO	KON	p	
BMP2	318,01 ± 32,72	310,02 ± 49,71	344,01 ± 16,74	374,02 ± 26,13	NS	248,04 ± 8,42	230,03 ± 10,02	258,02 ± 16,41	250,02 ± 28,33	NS	<0,001
VEGF	0,36 ± 0,11	0,37 ± 0,81	0,29 ± 0,12	0,31 ± 0,88	NS	0,24 ± 0,78	0,14 ± 0,28	0,17 ± 0,47	0,14 ± 0,43	0,034	0,008

p: značajnost unutar DM i zdravi (one way ANOVA) za βTKF vs. KON zdravi VEGF (post hoc Tukey test 0,044); p^a: značajnost između DM i zdravi (t-test) za BMP2 i VEGF u KON DM vs. KON zdravi. βTKF: beta-trikalcijumfosfat; βTKF/HA: beta-trikalcijumfosfat u kombinaciji sa hidroksiapatitom; AUTO: autotransplantat; KON: kontrola

DISKUSIJA

Dijabetes melitus (DM) je hronično metaboličko oboljenje, koje je pored vaskularnih komplikacija, praćeno poremećajem u metabolizmu kostnog tkiva, što u velikoj meri utiče na proces regeneracije kosti (Claro i sar. 2005). Mehanizam otežanog zarastanja kostnog tkiva kod dijabetesa zasnovan je na različitim promenama funkcije na tkivnom i ćelijskom nivou, što je direktna posledica prisutne hiperglikemije, mikrovaskularnih i makrovaskularnih promena. S obzirom da DM smanjuje osteoklastogenezu, redukuje proces formiranja kostnog tkiva i dovodi do prevremene apoptoze osteoblasta, jasno je da hiperglikemički status značajno povećava resorpciju kosti i remeti proces remodelacije (He i sar. 2004, Krakauer i sar. 1995). Poremećaj u procesu formiranja osteoida, smanjena sinteza osteokalcina, manja procentualna zastupljenost osteoklasta i osteoblasta, kao i poremećaj u metabolizmu kolagena i odložena ćelijska proliferacija su direktne posledice dijabetesa koje značajno remete procese zarastanja kostnog tkiva (Nevins i sar. 1998, Fiorellini i sar. 1999, Falanga i sar. 2005, Maruyama i sar. 2007). Tako na primer, Hamann i sar. (2011) su na animalnom modelu analizirali uticaj DM tip 2 na fiziologiju i regeneraciju kostnog tkiva. Autori su pokazali da je kod dijabetičnih pacova značajno smanjena gustina mineralne kosti. Takođe su pronašli i poremećaj u procesu diferencijacije osteoblasta koji je rezultirao u smanjenju nivoa alkalne fosfataze i formacije mineralizovanog matriksa. Autori takođe navode da je proces regeneracije kosti poremećen naročito u okviru prvih 6 nedelja, što može da ukaže na defekt u procesu diferencijacije osteoblastnih prekursorskih ćelija u uslovima DM. Hiperglikemija ima negativan uticaj na diferencijaciju osteoblasta i menja metabolizam fosfora i kalcijuma koji je regulisan od strane paratiroidnog hormona (Santana i sar. 2003). Zatim, ima štetan uticaj na formiranje kostnog matriksa jer ometa adherenciju, rast i akumulaciju ekstracelularnog matriksa (Weiss i sar. 1981), remeti mineralnu homeostazu i produkciju osteoida (Nyomba i sar. 1989).

Imajući u vidu pomenute mehanizme kojima DM nepovoljno utiče na proces kostnog zarastanja veoma je važno ukazati na odgovarajuće regenerativne terapijske pristupe koji bi u uslovima DM dali zadovoljavajuće rezultate. S tim u vezi, Vieira i sar. (2008) su na modelu kritičnih defekata kalvarije kunića (8mm) sa indukovanim DM, pratili proces regeneracije kostnog tkiva, koristeći politetrafluoretilensku membranu (PFTE) i zaključili da je proces regeneracije kosti značajno usporen u dijabetičnoj grupi i da primena PFTE membrane dovodi do povećanja novoformiranog kostnog tkiva u uslovima DM. Među prvim radovima vezanim za ovu problematiku jeste i rad Gomes i sar. (2008) koji su na istom modelu pratili terapijske efekte homogenizovanog

demineralizovanog dentinskog matriksa i PFTE membrane na proces regeneracije kostnog tkiva. U rezultatima su pokazali da primenjeni materijali u uslovima DM povećavaju optički gustinu novoformirane kosti u poređenju sa kontrolnim grupama, što ukazuje da ovaj terapijski koncept regeneracije korišćenjem bioloških membrana (vođena i kontrolisana regeneracija tkiva, *guided bone regeneration*), ima pozitivan efekat na regeneraciju kosti u uslovima DM. Slično prethodnim autorima, Redzepi i sar. (2010) su na mandibuli pacova sa indukovanim DM pratili efekte vođene i kontrolisane regeneracije tkiva na proces kostnog zarastanja i zaključili da primena ove metode značajno doprinosi procesu regeneracije kostnog tkiva u dijabetičnim uslovima.

S druge strane, u ovoj doktorskoj disertaciji, metodološki pristup prilikom definisanja najoptimalnijeg terapijskog metoda u regeneraciji kostnog tkiva, nije uključivao primenu bioloških membrana, imajući u vidu značajan uticaj periosta na proces regeneracije kosti. Naime, polazeći od istog koncepta kontrolisane i vođene regeneracije sa primenom regenerativnih materijala kao i prve publikovane studije Vieira i sar. (2008), Gomes i sar. (2008), Redzepi i sar. (2010), dobijeni rezultati u ovom istraživanju su pokazali da primena materijala za regeneraciju kosti (β TKF, β TKF/HA i AUTO) u kombinaciji sa periostom reznja, povećava uspešnost regenerativne terapije kosti kod DM tip I. Imajući u vidu sve biološke prednosti periosta u regeneraciji kostnog tkiva, kao što su povećan nivo osteogenih progenitornih ćelija i faktora rasta, u ovom istraživanju analiziran je uticaj autotransplantata i kalcijum-fosfatnih biomaterijala (β TKF i β TKF/HA) na proces regeneracije kostnog tkiva u uslovima DM, na modelu kritičnog defekta kalvarije kunića. U obzir treba uzeti i činjenicu da je u istraživanju korišćen model nekontrolisanog DM tip I uz primenu aloksana u cilju eksperimentalne indukcije dijabetesa, zbog svoje selektivne citotoksičnosti prema β ćelijama Langerhansovih ostrvaca pankreasa i sledstvene redukcije u sekreciji insulina, što je dovelo do povećanja nivoa glukoze u krvi eksperimentalnih životinja (Gerritsen i sar. 2000).

Veliki broj prirodnih i sintetičkih materijala se koristi u regenerativnoj terapiji kostnog tkiva. S obzirom da je proces regeneracije kosti kod dijabetesa značajno poremećen, veoma je važno pronaći odgovarajući regenerativni materijal koji bi u uslovima DM imao pozitivan efekat na regeneraciju kosti. U okviru ovog istraživanja, primenjeni su sintetički, aloplastični kostni zamenici β TKF i β TKF/HA, kao i prirodni, autotransplantat kostnog tkiva. Jedan od bitnih

faktora koji utiču na uspešnost regenerativne terapije kosti jesu i biološke i morfološke karakteristike materijala. S tim u vezi, autotransplantat sa značajnim biološkim osteogenim i osteoinduktivnim karakteristikama predstavlja "zlatni standard" u regenerativnoj terapiji. S druge strane, β TKF i β TKF/HA su osteokonduktivni materijali čije morfološke karakteristike poroznosti, veličine granula i pora, fizičko-hemijske osobine i stepen resorpcije, značajno utiču na proces regeneracije kosti. U idealnim uslovima materijal za regeneraciju bi trebalo da omogući formiranje nove kosti, da ima bezbednu biodegradaciju i da omogući funkcionalno opterećenje novoformirane kosti (Coelho i sar. 2009). Kada se materijal za regeneraciju postavi u kostni defekt, dolazi do njegovog prožimanja od strane krvnog ugruška, u okviru kojeg se nalaze trombociti čije α granule sadrže proteine i faktore rasta neophodne za adheziju ćelija za površinu materijala (Tovar i sar. 2013). Dos Santos i sar. (2009) su u *in vitro* studiji pronašli da, topografske karakteristike površine β TKF imaju ključnu ulogu u adsorpciji proteina i adheziji ćelija, što može imati efekat na diferencijaciju osteoblasta. Dakle, na površini osteokonduktivnih materijala započinje inicijalna reakcija sa sledstvenim biološkim procesima koji će dovesti do regeneracije kosti, tako da je karakteristika površine kao što je makroporoznost, bitan faktor koji utiče na osteokonduktivnost kalcijum-fosfatnih zamenika za kost, jer pore omogućavaju formiranje krvnih sudova i direktno prorastanje novoformiranog kostnog tkiva (LeGeros 2002). Dakle, morfologija granula obezbeđuje prostor za odvijanje procesa angiogeneze i invaziju osteoprogenitornih ćelija. U ovom istraživanju, korišćeni kalcijum fosfatni materijali β TKF veličine pora od 100 do 400 μ m i β TKF/HA veličine pora 400 do 700 μ m, su pokazali zadovoljavajuće osteokonduktivne karakteristike. Takođe, veličina pora od 200 do 400 μ m je poželjna za podršku rasta i diferencijacije osteoblasta (Boyan i ar. 1996). Male pore stvaraju hipoksične uslove i indukuju stvaranje osteohondralnih formacija, dok veće pore omogućavaju brzo formiranje krvnih sudova i sledstveno urastanje mekih tkiva (Sawada i sar. 2011). U ovom istraživanju, procenat novoformiranog kostnog tkiva, kao i novoformiranih krvnih sudova je bio zastupljeniji u defektima tretiranim sa β TKF-om i kod zdravih i kod dijabetičnih kunića. Ovaj rezultat se može objasniti činjenicom da pored makroporoznosti i stepen i brzina resorpcije materijala utiču na regenerativnu terapiju. Poznato je da se β TKF brže resorbuje u odnosu na β TKF/HA. U saglasnosti sa ovim je rezultat dobijen u ovom istraživanju gde je procenat neresorbovanog materijala bio veći u defektima, 4 nedelje posle primene posle β TKF/HA. Sličan rezultat su dobili i Hwang i sar. (2012) koji su na modelu kritičnih defekata kalvarije kunića

(8mm) pratili efekte HA, β TKF i β TKF/HA na regeneraciju kosti. Histološka i histomorfometrijska merenja posle 4 nedelje su pokazala da je količina novoformirane kosti bila veća posle primenjenih materijala u odnosu na kontrolnu grupu. Isto tako su pokazali da je stepen resorpcije β TKF bio veći u odnosu na ostale materijale. Artzi i sar. (2004) su poredili efekte anorganske goveđe kosti i β TKF u različitim vremenskim periodima nakon aplikacije na animalnom eksperimentalnom modelu. Pokazano je da su granule β TKF resorbovane 86,5% za 24 meseca, dok su granule anorganske goveđe kosti bile prisutne u znatno većoj količini u augmentiranoj regiji. Štaviše, Szabo i sar. (2001) su pokazali da je β TKF u potpunosti resorbovan 12 do 18 meseci, nakon primene za augmentaciju maksilarnog sinusa i da je novoformirana kost slična nativnoj kosti u funkcionalnom i anatomskom pogledu. Pored pomenutog, značajno bolja regeneracija kritičnih defekata posle primene β TKF može da se objasni i činjenicom da usled brže resorpcije β TKF, dolazi do stvaranja nezrelog kostnog tkiva kao i vezivnog tkiva bogatog novoformiranim krvnim sudovima, na šta su ukazali i histološki i histomorfometrijski rezultati u ovoj doktorskoj disertaciji.

U ovoj studiji autotransplantat i β TKF su pokazali dobar regenerativni potencijal u dijabetičnim uslovima, jer su značajno uticali na kvantitet i kvalitet novoformirane kosti na modelu kritičnih defekata kalvarije kunića sa indukovanim DM. Sličan rezultat su dobili i Jensen i sar. (2006) koji su pokazali na zdravom animalnom modelu, da je primena autotransplantata i β TKF rezultirala u većoj količini novoformirane kosti u odnosu na anorgansku goveđu kost, 8 nedelja nakon njihove primene. U okviru ove studije histomorfometrijska analiza je pokazala da su defekti tretirani sa autotransplantatom i β TKF imali značajno veću količinu novoformiranog kostnog tkiva u odnosu na ostale defekte, i kod zdravih i kod dijabetičnih eksperimentalnih životinja. Međutim procenat novoformiranog kostnog tkiva je bio značajno veći posle primene autotransplantata, što se može objasniti procesom osteogeneze, koji se aktivno odvija u okviru autotransplantata. Naime, transplantacijom autologne kosti obezbeđuje se prisustvo osteogenih ćelija i osteoinduktivnih faktora rasta u augmentiranoj regiji (Burchardt 1983), što nije slučaj kada su u pitanju sintetički materijali. Autotransplantat korišćen u ovoj studiji se sastojao od kortikalnog i spongioznog dela kosti, koja zahvaljujući svojoj poroznoj strukturi favorizuje proces revaskularizacije, difuzije i osteogeneze (Glowacki 2005). Osteokonduktivnost autotransplantata potiče od kortikalnog dela jer se formiranje nove kosti dešava urastanjem iz susedne kosti (Glowacki 2005). Pored ovoga, pokazano je u literaturi da i veličina parčića kostnog autotransplantata utiče na proces formiranja

kosti u ranoj fazi zarastanja, do 4 nedelje (Pallesen i sar. 2002). Autori su pokazali da manja veličina parčića kosti (do 2 mm) doprinosi većoj količini novoformiranog kostnog tkiva, usled veće površine kontakta, što je u saglasnosti sa dimenzijama autotransplantata korišćenim u ovoj studiji.

Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatom Esteves i sar. (2008) koji su na modelu tibie pacova pratili efekte autotransplantata na regeneraciju kostnog tkiva u uslovima DM. U zaključku istraživanja autori navode da je proces regeneracije kosti počeo ranije u defektima sa autotransplantatom u odnosu na prazne (kontrolne defekte), kao i da je kvantitet novoformiranog kostnog tkiva nakon primene autotransplantata bio sličan kod zdrave i dijabetične grupe, dok je kvalitativno kost bila bolja u kontrolnoj (zdravoj) grupi. Sličan rezultat, Nagata i sar. (2009) na modelu kritičnog defekta kalvarije zdravih kunića (15mm) su pokazali da primena autotransplantata značajno doprinosi procesu regeneracije kostnog tkiva. Četiri nedelje posle hirurške intervencije procenat novoformiranog kostnog tkiva iznosio je 46,88%. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatom dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji (47%), iako ne treba isključiti i značajan doprinos plazme bogate trombocitima koja je korišćena u studiji Nagata i sar. (2009).

Veća količina novoformiranog kostnog tkiva u okviru regenerativne terapije autotransplantatom, može se objasniti i njegovim osteoinduktivnim karakteristikama zbog prisutnih faktora rasta koji značajno povećavaju njegov regenerativni potencijal. S tim u vezi Mariano i sar. (2010) su na modelu kritičnog defekta kalvarije pacova sa indukovanim DM, pokazali da plazma bogata trombocitima (PRP) dovodi do značajnog povećanja u kvalitetu i kvantitetu novoformirane kosti u uslovima DM. Naime, dodatak plazme bogate trombocitima u materijale za regeneraciju, obezbeđuje visoku koncentraciju trombocita u kostnom defektu, što povećava lokalnu koncentraciju faktora rasta i ubrzava inicijalni proces kostnog zarastanja (Plachokova i sar. 2008). U saglasnosti sa ovim su rezultati Gomes i sar. (2016) koji su na modelu kritičnog defekta kalvarije kunića sa indukovanim DM, pokazali da plazma bogata trombocitima povećava proces vaskularizacije u toku regeneracije kostnog tkiva.

U okviru ove studije procenat novoformiranog kostnog tkiva posle primene β TKF/HA je bio značajno manji u odnosu na autotransplantat i β TKF. Ovaj rezultat bi se mogao tumačiti strukturnim karakteristikama, kao i stepenom resorpcije, koji je kod ovog materijala znatno manji u odnosu na β TKF, što utiče na proces angiogeneze u ranim fazama kostnog zarastanja. Rokn i

sar. (2012) su na modelu kritičnih defekata kalvarije kunića (6,5 mm; 4 nedelje) pokazali da nema statistički značajne razlike između β TKF/HA i anorganske goveđe kosti. Autori su histološkom analizom primetili veći stepen inflamatorne reakcije u defektima tretiranim sa β TKF/HA, i zaključili da je usled zbijenosti granula materijala, onemogućena adekvatna angiogeneza, a samim tim i formiranje kostnog tkiva, 4 nedelje posle primene materijala. Na ovaj fenomen ukazuju istraživanja uticaja veličine pora i njihove međugranularne povezanosti koja definišu mikroporoznost i makroporoznost β TKF i β TKF/HA (Ghanaati i sar. 2012). U inflamatornoj fazi zarastanja kostnog defekta pod uticajem inflamatornih medijatora prevashodno citokina i kiselih glikoproteina, indukuju se brojni tkivni i ćelijski transdukcionni mehanizmi koji regulišu popunjavanje intergranularnih prostora i samih pora materijala ćelijskim elementima, vezivnim i granulacionim tkivom već u ranoj fazi regeneracije od 3. do 10. dana (Anderson i sar. 2008, Alsberg i sar. 2003). Sledstveno tome u intergranularnim prostorima dolazi do maturacije vaskularne mreže i povećanja koncentracije monocita, limfocita i makrofaga, čime započinje proces biodegradacije tj. resorpcije materijala. Što je stepen resorpcije materijala i veličine pora i intergranularnih prostora veći, to je veća i veličina vaskularne mreže odgovorne za povećanje nivoa prekursornih mononuklearnih ćelija, makrofaga i njihove diferencijacije u multinuklearne džinovske ćelije odgovorne za proces fagocitoze materijala (Anderson i sar. 2011, Anderson i sar. 2008). Ove promene su značajnije kod primene β TKF u odnosu na kombinaciju β TKF/HA (Ghanaati i sar. 2012). Paralelno sa povećanjem vaskularne mreže, povećan je i stepen adhezije osteoblasta usled povećanja površine za njihovu atherenciju i proliferaciju (Elias i sar. 2000, Khang i sar. 2008). Rezultati histološke analize u ovoj studiji koja je pokazala stvaranje kostnog tkiva unutar pora i između granula materijala kao i kasnije registrovanu dobru inkorporaciju materijala u novoformirano kostno tkivo, upravo je potvrda pomenutih fizioloških regenerativnih mehanizama. Druga bitna činjenica od značaja za uspešnost regenerativne terapije jeste i razmena Ca i P jona sa površine materijala u intergranularno vezivno tkivo. Naime, povećana koncentracija Ca i P jona u tkivu, povećava i stepen indukcije ćelija osteogeneze, što je pokazano posle promene β TKF (Lazary i sar. 2007).

Nasuprot ovome, Park i sar. (2010) su poredili efekte dva oblika β TKF/HA, β TKF i anorganske goveđe kosti na modelu kritičnog defekta kalvarije kunića (8mm) i pokazali da je procenat novoformirane kosti bio veći posle primene β TKF/HA. Hwang i sar. (2012) su analizirali efekat HA, β TKF i β TKF/HA na regeneraciju kosti, na modelu kritičnog defekta kalvarije zdravih

kunića. U rezultatima studije navode da je defekt tretiran sa β TKF pokazao najmanju količinu novoformiranog kostnog tkiva, 4 nedelje posle primene. Ovaj rezultat nije u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u okviru ovog istraživanja, a može se objasniti činjenicom da su autori koristili sintetičke blokove β TKF, za razliku od naše studije gde je korišćen materijal u granulama. Naime, u eksperimentalnim animalnim studijama je pokazano da sintetički kostni blokovi pokazuju minimalan stepen resorpcije i ograničenu količinu novoformirane kosti na kritičnom modelu kalvarije pacova (Kim i sar. 2011), kao i kod lateralne augmentacije alveolarnog grebena (Schwarz i sar. 2008). Kada je stepen biodegradacije materijala suviše spor, kostni zamenik može fizički da spreči proces kostne regeneracije (Sawada i sar. 2011).

Pored histomorfometrijske analize koja je pokazala dobar efekat autotransplantata i β TKF na regeneraciju kosti u uslovima dijabetesa melitusa, deskriptivnom histološkom analizom je potvrđen pozitivan efekat ovih materijala u stvaranju novoformiranog kostnog tkiva, 4 nedelje posle njihove primene. Histološka analiza je pokazala novoformiranu kost koja je bila u intimnom kontaktu i dobro inkorporirana sa primenjenim materijalima, sugerišući da je mehanizam uključen u regeneraciju zasnovan na osteokonduktivnim svojstvima oba materijala. Ovi podaci su u saglasnosti sa studijom Zerbo i sar. (2003) koji su pokazali da se β TKF ponaša kao osteokonduktivan materijal, odnosno da obezbeđuje osnovu za urastanje ćelija i krvnih sudova, produkciju faktora rasta u okviru materijala i sledstveno povećanje u količini novoformiranog kostnog tkiva. Štaviše, Murai i sar. (2006) su primetili da su osteoblasti, kao i osteoid prisutni na površini granula β TKF, što je takođe uočeno u histološkoj analizi u okviru ove studije.

Chazono i sar. (2004) su pokazali da direktna apozicija lamelarne kosti na površini materijala dovodi do njegove potpune inkorporacije u trabekularnu kost, kao i da kolagena vlakna koja produkuju osteoblasti prodiru kroz mikropore β TKF, 2 nedelje nakon implantacije u femur eksperimentalne životinje. Ovaj nalaz se slaže sa histološkim rezultatima našeg istraživanja. Međutim, histološka analiza je pokazala i da je većina novoformiranog kostnog tkiva, stvorena na ivicama defekta, kao i u kontaktu sa periostom. Ova činjenica takođe, govori u prilog osteokonduktivnim karakteristikama primenjenih materijala, regenerativnom potencijalu periosta i induktivnom efektu native kosti, i u saglasnosti je sa prethodno objavljenim podacima na zdravim animalnim modelima (Priatnanont i sar. 2007, Humber i sar. 2010).

Prema Rodrigezu i sar. (2006), vaskularizacija ima ključnu ulogu u razvoju i regeneraciji kostnog tkiva. Vaskularizacija na mestu augmentacije materijala obezbeđuje protok hranjivih materija, eliminaciju metaboličkih produkata, kao i ćelije i faktore rasta neophodne za normalan proces osteogeneze. Santana i sar. (2003) navode da odložena revaskularizacija kod dijabetesa redukuje proces zarastanja kostnog tkiva za 60%. S tim u vezi, u ovom istraživanju je pokazana veća procentualna zastupljenost krvnih sudova nakon primene β TKF, što je bitan parametar koji govori o osteokonduktivnosti ovog materijala, kao i o njegovoj primeni u uslovima dijabetesa melitusa gde je proces vaskularizacije značajno poremećen. Naime povećanje koncentracije multinuklearnih ćelija fagocitoze odnosno osteoklasta u intergranularnim prostorima materijala, povećava i sekreciju VEGF, kao ključnog faktora rasta i održavanja vaskularne mreže, imajući u vidu činjenicu da same multinuklearne ćelije luče VEGF (Anderson i sar. 2008). Povećan nivo vaskulogeneze i značajno veći stepen gustine krvnih sudova uočava se već trećeg dana posle regenerativne terapije β TKF u odnosu na β TKF/HA, i takav odnos se zadržava do tridesetog dana kostnog zarastanja (Ghanaati i sar. 2012). Rezultati kvantitativne analize krvnih sudova u ovoj studiji su pokazali njihovo značajno prisustvo u defektima regenerisanim sa β TKF. Ovaj histomorfometrijski rezultat je potvrđen i histološkom analizom gde su uočeni novoformirani krvni sudovi između neresorbovanih granula β TKF, kod dijabetičnih i kod zdravih eksperimentalnih životinja. Štaviše, Yamada i sar. (2009) su na modelu kritičnog defekta kalvarije kunića (8 mm) pratili efekte vođene regeneracije tkiva primenom titanijumske membrane i β TKF na proces angiogeneze. U rezultatima istraživanja navode da se proces angiogeneze odvija aktivno između granula β TKF, mesec dana nakon primene ovog materijala, što je u saglasnosti sa rezultatom dobijenim u ovoj studiji. S tim u vezi može se tumačiti i rezultat dobijen u ovom istraživanju gde je pokazano da je koncentracija faktora rasta VEGF-a bila veća kod zdravih eksperimentalnih životinja nakon primene β TKF-a.

Angiogeneza ima važnu ulogu u procesu osteogeneze posebno u segmentu kostne srži gde novoformirani krvni sudovi omogućavaju migraciju angiogenih i osteogenih ćelija u kostni defekt (Buser i sar. 1996). Kako je kostna srž mesto gde se odvija hematopoeza i predstavlja rezervoar progenitornih stem ćelija, pokazano je da je u uslovima DM smanjena mobilizacija stem ćelija iz kostne srži (Fadini 2012). S tim u vezi može se tumačiti rezultat dobijen u našem istraživanju koje je pokazalo da je procenat kostne srži bio veći kod zdravih eksperimentalnih životinja nakon primene autotransplantata u odnosu na dijabetične.

Imajući u vidu da je u uslovima DM proces kostnog zarastanja promenjen zbog oslabljene funkcije osteoblasta, smanjene produkcije kolagena i promena u mineralnom metabolizmu (Rico i sar. 1989, Spanheimer i sar. 1988, Hough i sar. 1981), bitno je analizirati i količinu vezivnog tkiva u okviru defekata posle primene materijala za regeneraciju. Naime, procentualna zastupljenost vezivnog tkiva je bila manja u defektima gde su primenjeni materijali za regeneraciju u odnosu na kontrolne defekte, što znači da njihova primena u uslovima DM značajno doprinosi procesu regeneracije kosti.

Pokazano je u literaturi da hiperglikemija kod DM negativno utiče na diferencijaciju i funkciju mezenhimalnih stem ćelija, što značajno remeti proces formiranja kostnog tkiva (Yan i sar. 2013). Naime, poremećaj u zarastanju kostnog tkiva nastaje zbog smanjene produkcije mezenhimalnih ćelija i posledičnog efekta na smanjenje u količini endotelnih progenitornih ćelija, sa sledstvenim poremećajem procesa angiogeneze i osteogeneze (Mao i sar. 2014). U uslovima dijabetesa melitusa, smanjena je i produkcija faktora rasta (Galiano i sar. 2004). Imajući u vidu da je histološka i histomorfometrijska analiza u okviru ove studije pokazala mnoštvo aktivnih ćelija u kontaktu sa granulama β TKF-a, kao i aktivne osteoblaste koji produkuju osteoid na površini materijala, može se pretpostaviti da primena ovog regenerativnog materijala ima snažnu hemotaksičnu aktivnost značajno doprinoseći invaziji osteoprogenitornih ćelija. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa podacima iz literature koji su pokazali da primena kalcijum-fosfatnih materijala zbog hemotaksičnog efekta Ca i P jona, omogućava migraciju, proliferaciju i fenotipsku ekspresiju ćelija kosti, dovodeći do apozicije novoformiranog kostnog tkiva u direktnom kontaktu sa površinom primenjenog materijala (Trombelli i sar. 2002).

Klinički uspeh primenjenih materijala za regeneraciju zavisi od inflamatornog odgovora organizma, koji je kontrolisan od strane različitih regulatornih mehanizama. Ovi mehanizmi su značajno poremećeni kod DM, što može da dovede do poremećaja u revaskularizaciji, inkorporaciji i supstituciji materijala za regeneraciju (Esteves i sar. 2008). Hiperglikemija kod DM dovodi do promena u celularnom i humoralnom imunitetu (Galkowska i sar. 2006), povećava rizik od postoperativnih infekcija (Abdulwassie i sar. 2002, Desmouliere i sar. 1995) i remeti proces mikrocirkulacije u toku zarastanja. DM ima direktan uticaj na kostno zarastanje jer smanjuje proces mineralizacije, resorpcije i remodelacije kosti (Shyng i sar. 2001). U ovoj studiji je pokazano da je u defektima kod eksperimentalnih životinja sa indukovanim DM procenat

vezivnog tkiva bio značajno veći, a procenat novoformiranih krvnih sudova značajno manji u odnosu na zdrave eksperimentalne životinje, što ukazuje na činjenicu da DM remeti proces kostnog zarastanja. Takođe, manji procenat novoformiranog kostnog tkiva kod dijabetičnih životinja je rezultat koji ukazuje na oslabljene mehanizme kostnog zarastanja kod DM.

Zarastanje kostnog tkiva predstavlja integrativni kompleks tkivnih i molekularnih procesa koji se odvija u nekoliko faza. Prva inflamatorna faza podrazumeva različite komponente tkivnog zarastanja, kao što su inflamacija, hemostaza i formiranje krvnog ugruška. Ovu fazu zarastanja odlikuje hemotaksa neutrofila, makrofaga i limfocita koji oslobadjaju više od 30 proangiogenih faktora rasta značajnih za zarastanje rane, medju kojima je jedan od najvažnijih VEGF (Nissen i sar. 1998). Lokalna hipoksija izazvana prekidom cirkulacije usled povrede predstavlja osnovni stimulus za stvaranje ovog faktora rasta. Najznačajnija uloga VEGF je regulacija angiogeneze i rasta granulacionog tkiva u rani, čime se obezbeđuju oksigenacija i ishrana oštećenih tkiva uz taloženje fibrinske mreže neophodne za zarastanje rane (Kumar i sar. 2009). Vaskularizacija je druga faza u zarastanju, koja počinje neposredno po postavljanju materijala za regeneraciju, dok se zreli krvni sudovi formiraju posle 2 do 3 nedelje. Treća faza se preklapa sa fazom revaskularizacije i traje do 6 nedelja, a podrazumeva kolonizaciju ćelija, hranjivih materija i faktora rasta neophodnih za formiranje nove kosti. Završna faza remodelacije počinje između 4. i 6. nedelje, traje nekoliko meseci i uključuje remodelaciju i mineralizaciju nezrele kosti. Poslednje dve faze su takođe praćene resorpcijom materijala za regeneraciju (Goldberg i sar. 1989).

U toku procesa regeneracije kostnog tkiva, važnu ulogu imaju dva faktora, a to su osobine kostnog zamenika i osobine mesta prijema transplantata (Koerdt i sar. 2013). Smatra se da kostne ćelije mogu da prežive do 24 časa u uslovima hipoksije, pa je stoga brza i efikasna revaskularizacija kostnog transplantata, bitan faktor koji utiče na uspeh transplantacije (Gord i Alberius 1999). Revaskularizacija kostnog zamenika je osnovni preduslov za njegovu uspešnu inkorporaciju, dok je angiogeneza proces koji je preduslov za odvijanje osteogeneze. S tim u vezi, BMP2 i VEGF su primarni faktori u ćelijskoj komunikaciji u toku procesa angiogeneze i osteogeneze (Grellier i sar. 2009). BMP2 igra važnu ulogu u kaskadi ćelijskih događaja koji regulišu formiranje i regeneraciju kostnog tkiva, indukujući diferencijaciju i proliferaciju mezenhimalnih stem ćelija i sintezu ekstracelularnog matriksa (Bolander 1992, Urist 2009). VEGF kao potentni angiogeni faktor, deluje direktno na osteoblaste, stimulišući njihovu migraciju, diferencijaciju i proliferaciju (Hsiong i sar. 2000). Sa druge strane je pokazano da

kostni morfogenski proteini (BMP2, -4, -6), kao osteogeni faktori, stimulišu proces angiogeneze tako što povećavaju produkciju VEGF od strane osteoblasta (Ripamonti 1996). Takođe je pokazano da su vaskularne endotelijalne ćelije glavni izvor BMP2 u procesu distrakcije osteogeneze (Matsubara i sar. 2012).

Od značaja je i činjenica da je nastanak vaskularnih kalcifikacija kod DM povezan sa aktivacijom diferencijacije osteogenih ćelija (Sage i sar. 2010, Woo i sar.2007). S tim u vezi, kostni morfogenski proteini (BMP2 i BMP4), kao inflamatorni medijatori u vaskularnom endotelu odgovorni za poremećen protok krvi, povećan oksidativni stres i inflamaciju (Csiszar i sar. 2006), pokazuju povećanu aktivnost u procesu ateroskleroze i vaskularne kalcifikacije (Yao i sar. 2010, Hruska i sar. 2005). Pokazano je u literaturi na različitim animalnim modelima da hiperglikemija ima snažan uticaj na BMP2. S tim u vezi, primećeno je da ćelije vaskularnih glatkih mišića sekretuju veću količinu BMP2 kada su izložene visokoj koncentraciji glukoze (Chen i sar. 2006), kao i da je vaskularna ekspresija BMP2 povećana u ranom autoimunom dijabetesu (Nett i sar. 2006). Boström i sar. (2012) u zaključku svoje studije navode da hiperglikemija povećava aktivnost BMP2 u endotelnim ćelijama krvnih sudova, kao i da supresija aktivnosti ovog faktora rasta može da predstavlja novu strategiju u prevenciji i terapiji vaskularnih komplikacija kod DM.

Postoje brojni eksperimentalni i klinički podaci koji su pokazali da se u raznim tkivima, a posebno u krvnim sudovima nivoi i dejstva VEGF i BMP-2 značajno menjaju pod uticajem DM (Wirotko i sar.2008, Nett i sar. 2006, Duh i sar. 1999, Flyvbjerg i sar. 2004). Povećana ekspresija VEGF, progresivno povezana sa stepenom hiperglikemije, dokazana je u tkivu aorti pacova kao eksperimentalnih modela kako za DM tip 1 tako i za DM tip 2 (Boström i sar. 2011). Štaviše, uočeno je da čak i blaga hiperglikemija u kratkom vremenskom periodu od 24 sata dovodi do značajnih povećanja koncentracija VEGF u kulturi ljudskih aortnih endotelnih ćelija (Boström i sar. 2011). Ilić i sar. (2012) su pokazali veću koncentraciju VEGF i BMP2 u pulpi pacijenata sa dijabetesom u odnosu na zdrave pacijente.

Patel i sar. (2008) su analizirali efekte VEGF i BMP2 na regeneraciju kostnog tkiva na modelu kritičnog defekta kalvarije kunića (8mm) i pokazali da njihov sinergetski efekat ima važnu ulogu u ranoj fazi kostnog zarastanja. Slično prethodnim autorima Mattar i sar. (2013) su pronašli da lokalna administracija VEGF i BMP2 u alotransplantat stimuliše angiogenezu i proces aktivacije

osteoblasta. Takođe, Jung i sar. (2008) su pokazali da dodatak BMP2 granulama β TKF/HA značajno povećava količinu novoformiranog kostnog tkiva, 8 nedelja nakon njegove primene.

Prisustvo faktora rasta u autotransplantatu je pokazano u nekoliko studija (Schmidmaier i sar. 2006, Takemoto i sar. 2010), kao i njihova ekspresija u toku procesa distrakcione osteogeneze (Campisi i sar. 2003, Kroczek i sar. 2010) i procesa zarastanja kosti nakon fraktura (Barnes i sar. 1999). Guskuma i sar. (2013) su analizirali ekspresiju VEGF-a i BMP 2 u autotransplantatu na modelu kalvarije pacova, 7 i 30 dana nakon nakon žrtvovanja životinja. Histomorfometrijski rezultati su pokazali značajno veću količinu novoformirane kosti u defektima popunjenim autotransplantatom, dok je imunohistohemijska analiza pokazala da su faktori rasta bili zastupljeniji u kontrolnim (praznim) defektima u oba vremenska intervala, što je u saglasnosti sa našim rezultatima, gde je ekspresija faktora rasta takođe bila veća u kontrolnim defektima. Ovaj rezultat se može tumačiti činjenicom da je u sastavu autotransplantata dominirala kortikalna kost. Naime, poznato je da se kortikalna i spongiozna kost ne razlikuju samo po makroskopskim karakteristikama. Veći stepen vaskularizacije, zastupljenost ćelija i faktora rasta (Schmidmaier i sar. 2006, Takemoto i sar. 2010) u okviru spongiozne kosti favorizuju brži proces regeneracije kosti, dok gusta struktura kortikalnog dela ograničava proces vaskularizacije (Day i sar. 2000). Kod spongiozne kosti proces regeneracije se inicijalno dešava putem osteogeneze koja je zatim praćena resorpcijom (Kenzora i sar. 1978), dok je kod kortikalne kosti inicijalno zastupljena resorpcija koja je zatim praćena osteogenezom. Veća ekspresija faktora rasta u kontrolnoj grupi može se tumačiti činjenicom da su formirani defekti bili bikortikalnog tipa, gde su eksponirani periost i dura mater. U vezi sa ovim, Ma i sar. (2011) su pokazali da periost ima značajnu ulogu u osteoindukciji, kao i da dura mater predstavlja izvor osteogenih ćelija i faktora rasta (Gosian i sar. 2003). De Marco i sar. (2012) su primetili veću ekspresiju BMP2 na ivicama autotransplantata, na kontaktu autotransplantata sa originalnom kosti, u vezivnom tkivu i na mestu prijema autotransplantata, dok je u samom autotransplantatu ekspresija bila manja. Takođe su pokazali da je ekspresija BMP2 najveća između 3. i 21. dana nakon postavljanja autotransplantata u defekt.

Nasuprot našem rezultatu, Matsumoto i sar. (2012) su poredili efekte bioaktivnog stakla i autotransplantata na modelu kritičnog defekta kalvarije kunića. Imunohistohemijska analiza je pokazala povećanu ekspresiju VEGF u defektima tretiranim materijalima za regeneraciju do 30-tog dana nakon njihove primene, u odnosu na kontrolni defekt. Autori navode da je

diferencijacija osteoblasta i angiogeneza stimulisana od strane primenjenih materijala, što je u koleraciji sa osteogenezom i lokalnom vaskularizacijom. Koerdt i sar. (2013) su na animalnom modelu pokazali povećanu ekspresiju VEGF i BMP2 u kostnim defektima tretiranim sa kombinacijom autotransplantata, anorganske goveđe kosti i kolagene membrane, u odnosu na defekte koji su tretirani samo autotransplantatom.

U našem istraživanju pokazana je povećana koncentracija faktora rasta VEGF i BMP2 u kontrolnim (praznim defektima) kod eksperimentalnih životinja sa indukovanim DM. Slično rezultatima ove studije, Tanaka i sar. (2007) su pokazali da je ekspresija VEGF bila veća u kontrolnim (praznim) defektima, u odnosu na defekte gde je primenjena vođena regeneracija tkiva (PTFE membrana), 10 dana nakon operacije, na modelu tibije pacova. Faria i sar. (2008) su na animalnom modelu analizirali efekat ilijačnog autotransplantata, sa ili bez perforacije kosti na mestu prijema, na proces regeneracije kosti. Imunohistohemijska analiza je pokazala da je ekspresija VEGF bila veća u grupi gde su urađene perforacije kosti, sugerišući da je ova procedura pospešila proces angiogeneze. Pedrosa i sar. (2009) su na istom modelu analizirali autotransplantat kalvarije i pokazali da je ekspresija VEGF dostigla maksimum 10. dana, zatim se smanjila 20. dana, da bi dostigla statistički značajan porast 60. dana nakon operacije.

U studiji Younis i sar. (2013) su analizirani molekularni mehanizmi uključeni u proces zarastanja ekstrakcione alveole kod kunića sa indukovanim DM. Autori su pokazali da je ekspresija VEGF od strane endotelnih ćelija i endotelnih progenitornih ćelija bila visoka u ranom periodu zarastanja (2-10 dana), i da je postepeno opadala do 30-tog dana. Takođe su pronašli da je količina krvnih sudova i endotelnih progenitornih ćelija bila veća kod zdravih životinja, iako nije postojala statistički značajna razlika kada je u pitanju ekspresija VEGF. U rezultatima navode i da je ekspresija BMP4 u osteoblastima i osteocitima bila intenzivna 10-tog i 20-tog dana, dok je 30-tog dana bila manja, pri čemu je ekspresija BMP4 je bila veća kod zdravih kunića.

U ovom istraživanju efekat primenjenih materijala za regeneraciju je analiziran na modelu kritičnog defekta kalvarije kunića veličine 8 mm, i to na ranu fazu kostnog zarastanja (4 nedelje). Kreiranjem četiri defekta na kalvariji kunića omogućena je komparativna analiza primenjenih materijala za regeneraciju na ranu fazu kostnog zarastanja, pri čemu su izbegnute individualne varijacije (Sohn i sar. 2010).

U cilju da se postigne standardizacija u procesu evaluacije materijala za regeneraciju kosti, definisan je model kritičnog defekta kostnog tkiva (Shmitzh i Hollinger 1986). Jedan od faktora koji utiče na proces kostnog zarastanja jeste i dimenzija kritičnog defekta. Analiza podataka iz literature je pokazala da defekti manjeg prečnika (<15mm) imaju osobine kritičnog defekta ako im je observacioni period skraćen (Marden i sar. 1994, Sohn i sar. 2010, Borie i sar. 2011, Calvo-Guirado i sar. 2012). Štaviše, predstavljaju koristan model za određivanje efekata osteoindukcije (Hammerle i sar. 1992, Lundgren i sar. 1992) i evaluacije rane faze regeneracije kostnog tkiva (Hammerle i sar. 1992). Osim toga, faza remodelacije kosti kod kunića je tri puta brža u poređenju sa čovekom, zbog čega se period od 2 do 4 nedelje smatra adekvatnim za procenu rane faze zarastanja kostnog tkiva (Sohn i sar. 2010, Xu i sar. 2008, Calvacanti i sar. 2008, Torres i sar. 2008, Lundgren i sar. 1992).

U okviru ovog istraživanja je korišćen defekt veličine 8 mm. Imajući u vidu da nijedan defekt nije u potpunosti zarastao kostnim tkivom 4 nedelje nakon primene materijala za regeneraciju, može se zaključiti da defekt od 8 mm ima osobine kritičnog defekta, što je pokazala histomorfometrijska i histološka analiza.

U ovoj studiji nisu zapažene imunološke i inflamatorne reakcije organizma na primenjene materijale što govori u prilog njihovoj biokompatibilnosti.

ZAKLJUČCI

1. Regenerativna terapija kritičnog defekta kosti, četiri nedelje posle primene autotransplantata, pokazala je uspešnu regeneraciju celog defekta novoformiranom trabekularnom strukturom kosti kod zdravih i kunića sa DM.
2. Regenerativna terapija kritičnog defekta kosti, četiri nedelje posle primene β -trikalcijum fosfata, samog, ili u kombinaciji sa hidroksiapatitom, pokazala je uspešnu regeneraciju kosti na periferiji i delimičnu regeneraciju kosti u centralnom delu defekta, kako kod zdravih, tako i kunića sa DM.
3. Spontano zarastanje defekta u opservacionom periodu od četiri nedelje nije pokazalo uspešnu regeneraciju kritičnog defekta kosti kalvarije zdravih i kunića sa DM.
4. Regeneracija kosti kritičnog defekta kalvarije kunića novoformiranim kostnim tkivom je značajno povećana četiri nedelje posle primene autotransplantata, nego posle primene β -trikalcijum fosfata, samog ili u kombinaciji sa hidroksiapatitom, i spontanog zarastanja defekta, kako kod zdravih, tako i kod kunića sa DM.
5. Regeneracija kosti kritičnog defekta kalvarije zdravih i kunića sa DM novoformiranim kostnim tkivom je značajno povećana četiri nedelje posle primene β -trikalcijum fosfata u odnosu na β -trikalcijum fosfat u kombinaciji sa hidroksiapatitom.
6. Prisustvo vezivnog tkiva u kritičnim defektima kosti zdravih i kunića sa DM bilo je značajnije četiri nedelje posle regeneracije defekta β -trikalcijum fosfatom u kombinaciji sa hidroksiapatitom u odnosu na sam β -trikalcijum fosfat.
7. Najmanje vezivnog tkiva je bilo prisutno četiri nedelje posle regenerativne terapije autotransplantatom, kako kod zdravih, tako i kod kunića sa DM.
8. Prisustvo neresorbovanog materijala u kostnim defektima kunića sa DM je bilo značajno posle regenerativne terapije β -trikalcijum fosfatom u kombinaciji sa hidroksiapatitom u odnosu na primenu autotransplantata i β -trikalcijum fosfata.

9. U uslovima DM, zastupljenost neresorbovanog β -trikalcijum fosfata je bila podjednaka kao i zastupljenost autotransplantata, četiri nedelje posle njihove primene u regeneraciji kritičnog defekta kalvarije kunića.
10. Prisustvo neresorbovanog materijala u regenerisanim kostnim defektima zdravih kunića je bilo podjednako bez obzira na primenjen materijal za regeneraciju kosti.
11. Komparativnom kvantitativnom analizom je pokazano da je u uslovima postojanja DM prisutno značajno smanjenje uspešnosti regeneracije kritičnog defekta kosti novoformiranim kostnim tkivom četiri nedelje posle regenerativne terapije defekta autotransplantatom i β -trikalcijum fosfatom, u odnosu na zdrave kuniće.
12. Komparativnom kvantitativnom analizom uspešnosti regenerativne terapije kod zdravih i kunića sa DM je pokazano značajno smanjenje broja krvnih sudova u regenerisanom defektu kosti četiri nedelje posle primene β -trikalcijum fosfata samog, ili u kombinaciji sa hidroksiapatitom, u uslovima DM.
13. Regenerativna terapija kritičnog defekta kosti kombinovanom primenom β -trikalcijum fosfata i hidroksiapatita je pokazala značajno prisustvo neresorbovanog materijala i podjednaku zastupljenost novoformirane kosti kod dijabetičnih u odnosu na zdrave kuniće.
14. Kvantitativna analiza faktora rasta, VEGF i BMP2, pokazala je značajno povećanje njihove koncentracije posle četiri nedelje u kontrolnim defektima dijabetičnih kunića, kod kojih nije primenjena regenerativna terapija, u odnosu na zdrave.
15. Kvantitativna analiza regenerativne terapije četiri nedelje posle primene β TKF, pokazala je značajno povećanje koncentracije VEGF kod zdravih kunića.

LITERATURA

1. Abdulwassie H, Dhanrajani PJ. Diabetes mellitus and dental implants: a clinical study. *Implant Dent* 2002;11(1):83-6.
2. Alam S, Ueki K, Marukawa K, Ohara T, Hase T, Takazakura D, Nakagawa K. Expression of bone morphogenetic protein 2 and fibroblast growth factor 2 during bone regeneration using different implant materials as an onlay bone graft in rabbit mandibles. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:16-26.
3. Alsberg E, Kong HJ, Hirano Y, Smith MK, Albeiruti A, Mooney DJ. Regulating bone formation via controlled scaffold degradation. *J Dent Res* 2003;82:903-908.
4. Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE et al. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *American Journal of Pathology* 2009;174:239–247.
5. Anderson JM, Rodriguez A, Chang D. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 2008;20:86-100.
6. Anderson JM, McNally A. Biocompatibility of implants: lymphocyte/macrophage interactions. *Semin Immunopathol* 2011;33:221-233.
7. Artzi Z, Weinreb M, Givol N, Rohrer MD, Nemcovsky CE, Prasad HS, Tal H. Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: A 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19:357–368.
8. Aszódi A, Bateman JF, Gustafsson E, Boot-Handford R, Fässler R. Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix: what can we learn from knockout mice? *Cell Structure and Function* 2000;25;2:73–84.

9. Ayers RA, Simske SJ, Nunes CR, Wolford LM. Long-term bone ingrowth and residual microhardness of porous hydroxyapatite implants in humans. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1998;56:1297–1301.
10. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC: Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999;14:(11):1805-1815.
11. Bagambisa FB, Joos U, Schilli W. Mechanisms and structure of the bond between bone and hydroxyapatite ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research* 1993;27:1047–1055.
12. Barrere F, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomed* 2006;1:317-332.
13. Bates DO, Harper SJ. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vasc Pharmacol* 2002;39:225-237.
14. Baumgartner-Parzer SM, Wagner L, Pettermann M, Grillari J, Gessl A, Waldhäusl W. High-glucose-triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes* 1995;44:1323-1327.
15. Bidic SMS, Calvert JW, Marra K, Kumta P, Campbell P, Mitchell R et al. Rabbit calvarial wound healing by means of seeded Caprotite® scaffolds. *J Dent Res* 2003;82 (2):131-135.
16. Block MS. Horizontal ridge augmentation using particulate bone. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2006;14:27–38.
17. Block J. The role and effectiveness of bone marrow in osseous regeneration. *Med Hypotheses* 2005;65:740–747.
18. Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;200:165-70.

19. Boström KI, Jumabay M, Matveyenko A, Nicholas SB, Yao Y. Activation of Vascular Bone Morphogenetic Protein Signaling in Diabetes Mellitus. *Circ Res* 2011;108(4):446–457.
20. Borie E, Fuentes R, del Sol M, Oporto G, Engelke W. The influence of FDBA and autogenous bone particles on regeneration of calvarial defects in the rabbit: a pilot study. *Ann Anat* 2011;193:412-417.
21. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *The Journal of Craniofacial Surgery* 1998;9:310–316.
22. Botolin S, McCabe LR. Bone loss and increased bone adiposity in spontaneous and pharmacologically induced diabetic mice. *Endocrinology* 2007;148:198-205.
23. Bouillon R. Diabetic bone disease. *Calcified Tissue International* 1991;49:155–160.
24. Boyan BD, Hummert TW, Dean DD et al: Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 1996;17(2):137-46.
25. Boyne PJ. Bone induction and the use of HTR polymer as a vehicle for osseous inductor materials. *Compendium* 1988;10:337–341.
26. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest* 2007;117:1219-1222.
27. Brown LF, KT Yeo, B Berse, TK Yeo, D Senger, H Dvorak, L et al. Angiogenesis induction and regression in human surgical wounds. *Wound Repair Regen* 2002;10:245-51.
28. Burkhardt R. Preparatory conditions for clinical histology of human bone marrow. 2. A new procedure for histological preparation of bone and bone marrow biopsies. 1966;14:30-46.

29. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1983;174:28–42.
30. Buser D, Dula K, Hirt HP, Schenk RK. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1996;54:420–432.
31. Buser D, Hoffmann B, Bernard JP, Lussi A, Mettler D, Schenk RK. Evaluation of filling materials in membrane—Protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. *Clin Oral Implants Res* 1998;9:137–150.
32. Busik JV, Tikhonenko M, Bhatwadekar A et al. Diabetic retinopathy is associated with bone marrow neurophaty and a depressed peripheral clock. *J Exp Med* 2009;206:2897-2906.
33. Calvo-Guirado JL, Delgado-Ruiz RA, Ramirez-Fernandez MP, Mate-Sanchez JE, Ortiz-Ruiz A, Marcus A. Histomorphometric and mineral degradation study of Ossceram: a novel biphasic B-tricalcium phosphate, in critical sized defects in rabbits. *Clin Oral Implant Res* 2012;23:667-675.
34. Campisi P, Hamdy RC, Lauzier D: Expression of bone morphogenetic proteins during mandibular distraction osteogenesis. *Plast Reconstr Surg* 2003;111(1):201-208.
35. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2014;561:3–12.
36. Carofino BC, Lieberman JR. Gene therapy applications for fracture-healing. *J Bone Jt Surg Am* 2008;90:99-110.

37. Cavalcanti SC, Pereira CL, Mazzonetto R, de Moraes M, Moreira RW. Histological and histomorphometric analyses of calcium phosphate cement in rabbit calvaria. *J Craniomaxillofac Surg* 2008;36:354-359.
38. Chang SC, Hoang B, Thomas JT et al. Cartilage derived morphogenetic proteins: new members of the transforming growth factor- β superfamily predominantly expressed in long bones during human embryonic development. *J Biol Chem*. 1994;269:28227–28234.
39. Chazono M, Tanaka T, Komaki H, Fuji K. Bone formation and bioresorption, after implantation of injectable beta-tricalcium phosphate granules hyaluronate complex in rabbit bone defects. *J Biomed Mater Res* 2004;70:542–549.
40. Chen NX, Duan D, O’Neill KD, Moe SM. High glucose increases the expression of Cbfa1 and BMP-2 and enhances the calcification of vascular smooth muscle cells. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:3435–3442.
41. Claro FA, Lima JR, Salgado MAC, Gomes MF. Porous Polyethylene for tissue engineering applications in diabetic rats treated with calcitonin: histomorphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20(2):211-219.
42. Coelho PG, Coimbra ME, Ribeiro C, Fancio E, Higa OZ, Suzuki M et al. Physico/chemical characterization and preliminary human histology assessment of a β -TCP particulate material for bone augmentation. *Mater Sci Eng C* 2009;29:2085–2091.
43. Cooper G, Mooney M, Gosain A, Campbell P, Losee J, Huard J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2010;125:1685–1692.
44. Cornell CN. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am* 1999;30:591–598.

45. Cozen L. Does diabetes delay fracture healing? *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1972;82:134–140.
46. Crofford OB. Diabetes control and complications. *Annu Rev Med* 1995;46:267-79.
47. Csiszar A, Ahmad M, Smith KE, Labinskyy N, Gao Q, Kaley G, Edwards JG, Wolin MS, Ungvari Z. Bone morphogenetic protein-2 induces proinflammatory endothelial phenotype. *Am J Pathol* 2006;168:629–638.
48. Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg* 1996;35:413–417.
49. Day S, Ostrum R, Clinton R: Bone injury, regeneration, and repair. In: Buckwalter J, Einhorn T, Simon S. *Biology and biomechanics of the musculoskeletal system*. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons 2000, 388.
50. Delgado-Ruiz RA, Calvo-Guirado JL, Romanos GE. Critical size defects for bone regeneration experiments in rabbit calvariae: systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clin Oral Impl Res* 2014;00:1–16.
51. De Marco AC, Jardim MAN, Modolo F, Nunes FD, de Lima LAPA. Immunolocalization of bone morphogenetic protein 2 during the early healing events after guided bone regeneration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012;113:533-541.
52. Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 1995;146:56-66.
53. Dietrich EM, Antoniades K. Bone-vasculature interactions in the mandible: is bone an angiogenic tissue? *Medical Hypotheses* 2012; 79: 582-584.

54. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine* 2011;9:1-10.
55. Donahue HJ, McLeod KJ, Rubin CT et al. Cell-to-cell communication in osteoblastic networks: cell line-dependent hormonal regulation of gap junction function. *Journal of Bone and Mineral Research* 1995;10:881–889.
56. Dos Santos EA, Farina M, Soares GA, Anselme K. Chemical and topographical influence of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate surfaces on human osteoblastic cell behavior. *J. Biomed. Mater. Res.* 2009;89:510–520.
57. Duh E, Aiello LP. Vascular endothelial growth factor and diabetes - The agonist versus antagonist paradox. *Diabetes* 1999;48:1899-1906.
58. Elias KE, Price RL, Webster TJ. Enhanced functions of osteoblasts on nanometer diameter carbon fibers. *Biomaterials* 2000;23:3279-3287.
59. Erdogan Ö, Charudilaka S, Tatli U, Damlar I. A review on alveolar bone augmentation and dental implant success in diabetic patients. *Oral Surgery* 2010;3:115–119.
60. Esposito M, Grusovin MG, Kwan S, Worthington HV, Coulthard P. Interventions for replacing missing teeth: Bone augmentation techniques for dental implant treatment. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;3:36-42.
61. Esteves JC, Aranega AM, Borrasca AG, Fattah CMRDES, Garcia-Junior IR. Repair process of surgical defects filled with autogenous bone grafts in tibiae of diabetic rats. *J Appl Oral Sci* 2008;16(5):316-20.
62. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 2005;366:1736–43.

63. Fadini GP, Avogaro A. It Is All in the Blood: The Multifaceted Contribution of Circulating Progenitor Cells in Diabetic Complications. *Experimental Diabetes Research* 2012;1-8.
64. Fadini GP, Sartore S, Schiavon M et al. Diabetes impairs progenitor cell mobilization after hindlimb ischaemia-reperfusion injury in rats. *Diabetologia* 2006;49:3075-3084.
65. Faria PEP, Okamoto R, Bonihla RM, Xavier SP, Santos AC, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. *Clin Oral Impl Res* 2008;19:393-401.
66. Ferrara N, Gerber H, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.
67. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews* 2004;25:581-611.
68. Festing MFW, Douglas GA. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR journal* 2002;43(4):244-258.
69. Fiorellini JP, Nevins ML, Norkin A, Weber HP, Karimbux NY. The effect of insulin therapy on osseointegration in a diabetic rat model. *Clin Oral Implants Res* 1999;10(5):362-8.
70. Fok TC, Jan A, Peel SA, Evans AW, Clokie CM, Sandor GK. Hyperbaric oxygen results in increase vascular endothelial growth factor (VEGF) protein expression in rabbit calvarial critical-sized defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:417-422.
71. Follak N, Kloting I, Wolf E, Merk H. Histomorphometric evaluation of the influence of the diabetic metabolic state on bone defect healing depending on the defect size in spontaneously diabetic BB/OK rats. *Bone* 2004;35:144-152.

72. Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg* 1980;38, 176–180.
73. Flyvbjerg A, Khatir DS, Jensen LNJ, Dagnaes-Hansen F, Gronbaek H, Rasch R. The involvement of growth hormone (GH), insulin-like growth factors (IGFs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in diabetic kidney disease. *Current Pharmaceutical Design* 2004;10:3385-3394.
74. Galkowska H, Wojewodzka U, Olszewski WL. Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen* 2006;14:558-65.
75. Ghanaati S, Barbeck M, Detsch R, Deisinger U, Hilbig U, Rausch V, Sader R, Unger RE, Ziegler G, Krikpatrick CJ. The chemical composition of synthetic bone substitutes influences tissue reactions *in vivo*: Histological and histomorphometrical analysis of the cellular inflammatory response to hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate ceramics. *Biomed Mater* 2012;015005 (14pp).
76. Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N et al. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J Pathol* 2004;164:1935-1947.
77. Gerritsen M, Lutterman JA, Jansen JA. Wound healing around bone-anchored percutaneous devices in experimental diabetes mellitus. *Biomed Mater Res* 2000;53(6):702-9.
78. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005;36:20–27.
79. Glowacki J, Zhou S, Mizuno S. Mechanisms of osteoinduction/ chondroinduction by demineralized bone. *Journal of Craniofacial Surgery* 2009;20:634–638.

80. Grellier M, Bordenave L and Amedee J. Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2009;27:562–571.
81. Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop Relat Res* 1987;23:7–16.
82. Goldberg VM. Selection of bone grafts for revision total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 2000;381:68–76.
83. Gomes MF, Valva VN, Vieira EMM, Giannasi LC, Salgado MAC, Vilela-Goulart MG: Homogenous demineralized dentin matrix and platelet-rich plasma for bone tissue engineering in cranioplasty of diabetic rabbits: biochemical, radiographic, and histological analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2016;45:255–266.
84. Gomes MF, Destro MFSS, Banzi ECF, Vieira EMM, Morosolli ARC, Goulart MG. Optical density of bone repair after implantation of homogenous demineralized dentin matrix in diabetic rabbits. *Braz Oral Res* 2008;22(3):275-80.
85. Gordh M, Alberius, P. Some basic factors essential to autogenic nonvascularized onlay bone grafting to the craniofacial skeleton. *Scandinavian Journal Plastic Reconstructive Hand Surgery* 1999;33:129–146.
86. Gosain AK, Santoro TD, Song LS, Capel CC, Sudhakar PV, Matloub HS: Osteogenesis in calvarial defects: contribution of the dura, the pericranium, and the surrounding bone in adult versus infant animals. *Plast Reconstr Surg* 2003;112:515-527.
87. Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, Sogayar MC, Taga R. Bone morphogenic proteins: form structure to clinical use. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:1463-1473.

88. Graves DT, Liu R, Alikhani M, Al-Mashat H, Trackman PC. Diabetes enhanced inflammation and apoptosis – impact on periodontal pathology. *J Dent Res* 2006; 85: 15-21.
89. Gilsanz V, Roe TF, Gibbens DT, Schulz EE, Carlson ME, Gonzalez O et al. Effects of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. *Am J Physiol* 1988;255:416-421.
90. Guskuma MH et al. Evaluation of the presence of VEGF, BMP2 and CBFA1 proteins in autogenous bone graft: Histometric and immunohistochemical analysis. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2013;42(4):333-339.
91. Haddad AJ, Peel SA, Clokie CM, Sándor GK. Closure of rabbit calvarial critical-sized defects using protective composite allogeneic and alloplastic bone substitutes. *J Craniofac Surg* 2006;17(5):926–34.
92. Han T, Carranza FA Jr, Kenney EB. Calcium phosphate ceramics in dentistry: A review of the literature. *J West Soc Periodontol Periodontal Abstr* 1984;32:88–108.
93. Hannink G, Arts JJ. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration? *Injury* 2011;42:22–25.
94. Hamada Y, Kitazawa S, Kitazawa R, Fujii H, Fukagawa M. Histomorphometric analysis of diabetic osteopenia in streptozotocin-induced diabetic mice: a possible role of oxidative stress. *Bone* 2007;40:1408-1414.
95. Hamada Y, Fujii H, Fukagawa M. Role of oxidative stress in diabetic bone disorder. *Bone* 2009;45:35-38.
96. Hamann C, Goettsch C, Mettelsiefen J, Henkenjohann V, Rauner M, Hempel U, Bernhardt R, Fratzl-Zelman N, Roschger P, Rammelt S, Günther KP, Hofbauer LC. Delayed bone regeneration

and low bone mass in a rat model of insulin-resistant type 2 diabetes mellitus is due to impaired osteoblast function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;301:1220–1228.

97. Hämmerle CH, Schmid J, Olah AJ, Lang NP. Osseous healing of experimentally created defects in the calvaria of rabbits using guided bone regeneration. A pilot study. *Clin Oral Implants Res* 1992;3:144–147.

98. He H, Liu R, Desta T, Leone C, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinology* 2004;145(1):447-52.

99. Heckman JD, Ehler W, Brooks BP, Aufdemorte TB, Lohmann CH, Morgan T, Boyan BD. Bone morphogenetic protein but not transforming growth factor- β enhances bone formation in canine diaphyseal nonunions implanted with a biodegradable composite polymer. *J Bone Joint Surg* 1999;81(12):1717-29.

100. Hench LL. Bioactive materials: The potential for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res* 1998;41:511–518.

101. Hiatt WH, Schallhorn RG, Aaronian AJ. The induction of new bone and cementum formation. Iv. Microscopic examination of the periodontium following human bone and marrow allograft, autograft and nongraft periodontal regenerative procedures. *J Periodontol* 1978;49:495–512.

102. Hiatt WH, Schallho R. Intraoral transplants of cancellous bone and marrow in periodontal lesions. *J Periodontol* 1973;44:194–208.

103. Hing KA. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Phil Trans R Soc Lond A* 2004;362:2821-2850.

104. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *The Journal of Craniofacial Surgery* 1990;1:60–68.
105. Hough S, Avioli LV, Bergfeld MA, Fallon MD, Slatopolsky E, Teitelbaum SL. Correction of abnormal bone and mineral metabolism in chronic streptozotocin-induced diabetes *mellitus* in the rat by insulin therapy. *Endocrinol* 1981;108(6):2228-34.
106. Hruska KA, Mathew S, Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res* 2005;97:105–114.
107. Hsiong SX, Mooney DJ. Regeneration of vascularized bone. *Periodontol* 2000.2006;41:109–12.
108. Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling FH. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed Mater Res* 1970;4:433–456.
109. Humber CC, Sandor GKB, Davis JM, Peel SAF, Brkovic BMB, Kim YD, Holmes HI. Bone healing with an in situ-formed bioresorbable polyethylene glycol hydrogel membrane in rabbit calvarial defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:372-384.
110. Hou JC, Zernicke RF, Barnard RJ. Effects of severe diabetes and insulin on the femoral neck of the immature rat. *J Orthop Res* 1993;11:23-271.
111. Hwang JW, Park JS, Lee JS, Jung UW, Kim CS, Cho KS, Lee YK, Choi SH. 2012. Comparative evaluation of three calcium phosphate synthetic block bone graft materials for bone regeneration in rabbit calvaria. *J Biomed Mater Res Part B* 2012;100B:2044–2052.

112. Ilic J, Radovic K, Roganovic J, Brkovic B, Stojic D. The Levels of Vascular Endothelial Growth Factor and Bone Morphogenetic Protein 2 in Dental Pulp Tissue of Healthy and Diabetic Patients. *J Endod* 2012;38:764–768.
113. Ishidou Y, Isao Kitajima L, Obama H, et al. Enhanced expression of type I receptors for bone morphogenetic proteins during bone formation. *J Bone Miner Res* 1995;10:1651–1659.
114. Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *American Journal of Epidemiology* 2007;166:495–505.
115. Jensen SS, Brogini N, Hjorting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:237–243.
116. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification – Pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circulation Research* 2006;99:1044-1059.
117. Jung RE, Weber FE, Thoma DS, Ehrbar M, Cochran DL, Hammerle CHF. Bone morphogenetic protein-2 enhances bone formation when delivered by a synthetic matrix containing hydroxyapatite/tricalciumphosphate. *Clin Oral Impl. Res* 2008;19:188–195.
118. Kempen DH, Lu L, Heijink A, Hefferan TE, Creemers LB, Maran A and Yaszemski MJ, et al. Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration. *Biomaterials* 2009;30:2816–2825.
119. Kanczler JM, Oreffo ROC. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mat* 2008;15:100-114.

120. Kenney EB, Lekovic V, Han T, Carranza FA Jr, Dimitrijevic B. The use of a porous hydroxyapatite implant in periodontal defects. I. Clinical results after six months. *Journal of Periodontology* 1985;56:82–88.
121. Kenzora JE, Steele RE, Yosipovitch ZH, Glimcher MJ: Experimental osteonecrosis of the femoral head in adult rabbits. *Clin Orthop Relat Res* 1978;130:8-46.
122. Khang D, Lu J, Yao C, Haberstroh KM, Webster TJ. The role of nanometer and submicron surface features on vascular and bone cell adhesion on titanium. *Biomaterials* 2008;29:97-983.
123. Khoury F, Buchmann R. Surgical therapy of peri-implant disease: A 3-year follow-up study of cases treated with 3 different techniques of bone regeneration. *J Periodontol* 2001;72:1498–1508.
124. Kim JW, Choi KH, Yun JH, Jung UW, Kim CS, Choi SH, Cho KS. Bone formation of block and particulated biphasic calcium phosphate lyophilized with *Escherichia coli*-derived recombinant human bone morphogenetic protein 2 in rat calvarial defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:298–306.
125. Kloting N, Follak N, Kloting I. Is there an autoimmune process in bone? Gene expression studies in diabetic and nondiabetic BB rats as well as BB rat-related and -unrelated rat strains. *Physiol Genomics* 2005;24:59–64.
126. Koerdt S, Ristow O, Wannhoff A, Kübler AC, Reuther T. Expression of growth factors during the healing process of alveolar ridge augmentation procedures using autogenous bone grafts in combination with GTR and an anorganic bovine bone substitute. An immunohistochemical study in the sheep. *Clin Oral Invest* 2013;18(1):179-88.
127. Kotsovilis S, Karoussis IK, Fourmoussis I. A comprehensive and critical review of dental implant placement in diabetic animals and patients. *Clin Oral Impl Res* 2006;17:587–599.

128. Krakauer JC, Mckenna MJ, Buderer NF, Rao DS, Whitehouse FW, Michael Parfitt AM. Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes* 1995;44:775-782.
129. Krocze A, Park J, Birkholz T, Neukam FW, Wiltfang J, Kessler P: Effects of osteoinduction on bone regeneration in distraction: results of a pilot study. *J Craniomaxillofac Surg* 2010;38(5):334-344.
130. Kumar I, Staton CA, Cross SS, Reed MWR, Brown NJ: Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and its receptors in human surgical wounds. *British J Surg* 2009;96:1484-91.
131. Lai C, Tang S, Wang Y, Wei K. Formation of calcium phosphate nanoparticles in reverse microemulsions. *Materials Letters* 2005;59:210–214.
132. Lazary A, Balla B, Kosa JP, Bacsı K, Ngy Z, Takacs I, Varga PP, Speer G, Lakatos P. Effect of Gypsum on proliferation and differentiation of MC3T3E1 mouse osteoblastic cells. *Biomaterials* 2007;28:393-399.
133. Lancaster GA, Dodd S, Williamson PR. Design and analysis of pilot studies: recommendations for good practice. *Journal of Evaluation in Clinical Practice* 2004;10;2:307–312.
134. Langenfeld EM, Langenfeld J. Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. *Mol Cancer Res* 2004;2(3):141-149.
135. Lecomte A, Gautier H, Bouler JM, Gouyette A, Pegon Y, Daculsi G, Merle C. Biphasic calcium phosphate: a comparative study of interconnected porosity in two ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research B* 2008: Applied Biomaterials 84:1–6.
136. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res* 2002:81–98.

137. LeGeros RZ, Li S, Rohanizadeh R, Mijares D, LeGeros JP. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 2003;14:201–209.
138. LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev* 2008;108:4742–4753.
139. LeGeros RZ. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clin Mater* 1993;14:65–88
140. Liu R, Bal HS, Desta T, et al. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res* 2006;85:510-514.
141. Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* 2009;21:154-65.
142. Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology* 2003;144:346-352.
143. Lundgren D, Nyman S, Mathisen T, Isaksson S, Klinge B. Guided bone regeneration of cranial defects, using biodegradable barriers: an experimental pilot study in the rabbit. *J Craniomaxillofac Surg* 1992;20:257-260.
144. Loots MA, Lamme EN, Zeegelaar J, Mekkes JR, Bos JD, Middelkoop E. Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *J Invest Dermatol* 1998;111:850-857.

145. Ma D, Yao H, Tian W, Chen F, Liu Y, Mao T, et al: Enhancing bone formation by transplantation of a scaffold-free tissue-engineered periosteum in a rabbit model. *Clin Oral Implants Res* 2011;22,1193–1199.
146. Mardas N, Dereks X, Donos N, Dard M. Experimental model for bone regeneration in oral and cranio-maxillofacial-surgery. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2014;27:32–49
147. Makinen T, Veikkola T, Mustjoski S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC et al. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migration signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J* 2001;3:4762-4773.
148. Marden LJ, Hollinger JO, Chaudhari A, Turek T, Schaub RG, Rone E. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats. *J Biomed Mater Res* 1994;28:1127-1138.
149. Maruyama K, Asai J, Ii M, Thorne T, Losordo DW, D'Amore PA. Decreased macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel formation and contribute to impaired diabetic wound healing. *Am J Pathol* 2007;170:1178–1191
150. Mao L, Kawao N, Tamura Y, Okumoto K, Okada K, Yano M, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 is involved in impaired bone repair associated with diabetes in female mice. *PLOS ONE* 2014;9:92686.
151. Manolagas SC. Choreography from the tomb: an emerging role of dying osteocytes in the purposeful, and perhaps not so purposeful, targeting of bone remodeling. *Bonekey-Osteovision* 2006;3(1):5–14.

152. Mariano R, Messori M, de Moraes A, Nagata M, Furlaneto F, Avelino C et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in the calvaria of diabetic rat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:72-78.
153. Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, Quarto R. Role of scaffold internal structure on *in vivo* bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials* 2006;27,3230–3237.
154. Mathieu D, Linke JC, Wattel F. Non-healing wounds. In: *Handbook on hyperbaric medicine*, Mathieu DE, editor. Springer 2006;pp 401-427.
155. Matsubara H, Hogan DE, Morgan EF, Mortlock DP, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Vascular tissue are a primary source of BMP2 expression during bone formation induced by distraction osteogenesis. *Bone* 2012;51:168-180.
156. Mattar T, Friedrich PF, Bishop AT. Effect of rhBMP-2 and VEGF in a Vascularized Bone Allograft Experimental Model Based on Surgical Neoangiogenesis. *Inc. J Orthop Res* 2013;31:561–566.
157. McCabe LR. Understanding the pathology and mechanisms of type I diabetic bone loss. *J Cell Biochem* 2007;102:1343-1357.
158. Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM, Jee WSS. Bone lining cells: structure and function, *Scanning Microscopy* 1989;3:953–961.
159. Miley D, Terezhalmay G. The patient with diabetes mellitus: Etiology, epidemiology, principles of medical management, oral disease burden, and principles of dental management. *Quintessence International* 2005;36:779-794.

160. Murai M, Sato S, Fukase Y, Yamada Y, Komiyama K, Ito K. Effects of different sizes of β -tricalcium phosphate particles on bone augmentation within a titanium cap in rabbit calvarium. *Dental Materials Journal* 2006;25(1):87–96.
161. Nagata MJH, Melo LGN, Messoria MR, Bomfim SRM, Fucini SE, Garcia VG, Bosco AF, Okamoto T. Effect of platelet-rich plasma on bone healing of autogenous bone grafts in critical-size defects. *J Clin Periodontol* 2009;36:775–783.
162. Nett PC, Ortmann J, Celeiro J, Haas E, Hofmann-Lehmann R, Tornillo L, et al. Transcriptional regulation of vascular bone morphogenetic protein by endothelin receptors in early autoimmune diabetes mellitus. *Life Sciences* 2006;78:2213-2218.
163. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovich S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9-22.
164. Nevins ML, Karimbux NY, Weber HP, Giannobile WV, Fiorellini JP. Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13(5):620-629.
165. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 1998;152:1445-52.
166. Nyomba BL, Verhaegue J, Tomaste M, Lissens W, Bouillon RB. Bone mineral homeostasis in spontaneously diabetic BB rats: abnormal vitamin D metabolism and impaired active intestinal calcium absorption. *Endocrinology* 1989;124:565–572.
167. Oikawa A, Siragusa M, Quaini F et al. Diabetes mellitus induces bone marrow microangiopathy. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2010;206:498-508.

168. Pallesen L, Schou S, Aaboe M, Hjørting-Hansen E, Nattestad A, Melsen F. Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:498–506.
169. Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD. Angiogenesis – a new target for future therapy. *Vasc Pharamcol* 2006;44:265-274.
170. Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong MEK, Mikos AG. Dual Delivery of an Angiogenic and an Osteogenic Growth Factor for Bone Regeneration in a Critical Size Defect Model. *Bone* 2008;43(5):931–940.
171. Park JW, Kim ES, Jang JH, Suh JY, Park KB, Hanawa T. Healing of rabbit calvarial bone defects using biphasic calcium phosphate ceramics made of submicron-sized grains with a hierarchical pore structure. *Clin Oral Impl Res* 2010;21:268–276.
172. Plachokova AS, Nikolidakis D, Mulder J, Jansen JA, Creugers NH. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review. *Clinical Oral Implants Research* 2008;19:539–545.
173. Pedrosa Jr WF, Okamoto R, Faria PEP, Arnez MFM, Xavier SP, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone grafts remodeling. Part II: calvarial bone. *Clin Oral Impl Res* 2009;20:1254–1264.
174. Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Vongvatcharanon S. Proportion of deproteinized bovine bone and autogenous bone affects bone formation in the treatment of calvarial defects in rabbits. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2009;38:356–362.
175. Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Vongvatcharanon S, Limlertmongkol S. Osteoconductive Effects of 3 Heat-Treated Hydroxyapatites in Rabbit Calvarial Defects. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65:2418-2424.

176. Rico H, Hernandez ER, Cabranes JA, Gomez-Castresana F. Suggestion of a deficient osteoblastic function in diabetes *mellitus*: the possible cause of osteopenia in diabetics. *Calcif Tissue Int* 1989;45(2):71-73.
177. Ripamonti U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials*. 1996;17:31–35.
178. Retzepi M, Donos N. The effect of diabetes mellitus on osseous healing. *Clinical Oral Implants Research* 2010;21:673–681.
179. Retzepi M, Lewis MP, Donos N. Effect of diabetes and metabolic control on de novo bone formation following guided bone regeneration. *Clin Oral Impl Res* 2010;21:71–79.
180. Rochefort GY, Pallu S, and Benhamou CL. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporosis International* 2010;21(9):1457–1469.
181. Rohilla A, Ali S. Alloxan induced diabetes: mechanisms and effects. *Int J Res Pharmacol Biomed Sci* 2012;3:819-823.
182. Rodriguez AP, Missana L, Nagatsuka H, Gunduz M, Tsujigiwa H, Rivera R, Nagai N. Efficacy of atelocollagen honeycomb scaffold in bone formation using KUSA/A1 cells. *J Biomed Mater Res A* 2006;77:707-717.
183. Rokn AR, Khodadoostan MA, Reza AA, Ghahroudi R, Motahhary P, Javad M, Fard K, De Bruyn H, Afzalifar R, Soolar E, SoolariA. Bone Formation with Two Types of Grafting Materials: A Histologic and Histomorphometric Study. *The Open Dentistry Journal* 2011;5:96-104.
184. Rosen V. BMP2 signaling in bone development and repair. *Cytokine and Growth Factor Review* 2009;20:475-480.

185. Sage AP, Tintut Y, Demer LL. Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nat Rev Cardiol* 2010;7:528–536.
186. Salerno M, Argenziano A, DiMaio S, Gasparini N, Formicola S, De Filippo G, Tenore A. Pubertal growth, sexual maturation, and final height in children with IDDM. Effects of age at onset and metabolic control. *Diabetes Care* 1997;20:721–724.
187. Sampath TK, Maliakal JC, Hausschka PV et al. Recombinant human osteogenic protein-1 (HOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem* 1992;267:20352-20362.
188. Santana RB, Xu L, Babakhanlou C, Chase HB, Amar S. et al. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes* 2003;52:1502–1510.
189. Sawada Y, Hokugo A, Yang Y, Kamitani M, Matsuda S, Mao T, Lei D, Chen F, Iseki T, Morita S. A novel hydroxyapatite ceramic bone substitute transformed by ostrich cancellous bone: Characterization and evaluations of bone regeneration activity. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2011;98:217–222.
190. Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomaterialia* 2013;9:8037–8045.
191. Schmidmaier G, Herrmann S, Green J: Quantitative assessment of growth factors in reaming aspirate, iliac crest, and platelet preparation. *Bone* 2006;39:1156-1163.
192. Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Ferrari D, Sager M, Becker J. Lateral ridge augmentation using particulated or block bone substitutes bio-coated with rhGDF-5 and rhBMP-2: An immunohistochemical study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:642–652.

193. Sheikh Z, Sima C, Glogauer M. Bone Replacement Materials and Techniques Used for Achieving Vertical Alveolar Bone Augmentation. *Materials* 2015;8:2953-2993.
194. Sheikh ZA, Javaid MA, Abdallah MN. Bone replacement graft materials in dentistry in *Dental Biomaterials (Principle and Its Application)*, 2nd ed.; Khurshid, Z., Zafar, S.Z., Eds.; Paramount Publishing Enterprise: Karachi, Pakistan, 2013.
195. Schenk R. On the histological processing of undecalcified bone. *Acta Anat* 1965; 60:3-19.
196. Schipani E, Maes C, Carmeliet G, Semenza GL. Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF. *J Bone Mineral Res* 2009;24:1347-1353.
197. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical sized defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthope Relat Res* 1986;205:299-308.
198. Shetty V, Han TJ. Alloplastic materials in reconstructive periodontal surgery. *Dent Clin North Am* 1991;35:521-530.
199. Shyng YC, Devlin H, Sloan P. The effect of streptozotocin-induced experimental diabetes mellitus on calvarial defect healing and bone turnover in the rat. *Int. J Oral Maxillofac Surg* 2001;30:70-74.
200. Sohn JY, Park JC, Um YJ, et al. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. *J Periodontal Implant Sci* 2010;40:180-187.
201. Sommerfeldt D, Rubin C. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J* 2001;10:86-95.
202. Spanheimer RG, Umpierrez GE, Stumpf V. Decreased collagen production in diabetic rats. *Diabetes* 1988;37(4):371-376.

203. Sterio TW, Katancik JA, Blanchard SB, Xenoudi P, Mealey BL. A prospective, multicenter study of bovine pericardium membrane with cancellous particulate allograft for localized alveolar ridge augmentation. *Int J Periodontics Restor Dent* 2013;33:499–507.
204. Street J, Bao M, Bunting S, Peale FV, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, Bruggen N. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(15):9656-9661.
205. Suzuki K, Miyakoshi N, Tsuchida T, Kasukawa Y, Sato K, Itoi E. Effects of combined treatment of insulin and human parathyroid hormone (I-34) on cancellous bone mass and structure in streptozotocin-induced diabetic rats. *Bone* 2003;33:108-114.
206. Szabo G, Suba Z, Hrabak K, Barabas J, Nemeth Z. Autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevations (2- and 3-dimensional computed tomographic, histologic, and histomorphometric evaluations): Preliminary results. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:681–692.
207. Takemoto RC, Fajardo M, Kirsch T, Egol KA: Quantitative assessment of the bone morphogenetic protein expression from alternate bone graft harvesting sites. *J Orthop Trauma* 2010;24:564-566.
208. Thangarajah H, Yao D, Chang E, Shi Y, Jazayeri L, Vial IN et al. The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in diabetic tissues. *PNAS* 2009;106:13505-13510.
209. Tanaka S, Matsuzaka K, Sato D, Inoue T. Characteristics of newly formed bone during guided bone regeneration: analysis of CBFA-1, osteocalcin, and VEGF expression. *Journal of Oral Implantology*. 2007;33:6:321-326.
210. Thoma, D.S. Jones, A. Yamashita, M. Edmunds, R. Nevins, M. Cochran, D.L. Ridge augmentation using recombinant bone morphogenetic protein-2 techniques: An experimental study in the canine. *J Periodontol* 2010;81:1829–1838.

211. Torres J, Tamimi FM, Tresguerres IF, et al. Effect of solely applied platelet- rich plasma on osseous regeneration compared to Bio-Oss: a morphometric and densitometric study on rabbit calvaria. *Clin Implant Dent Relat Res* 2008;10:106-12.
212. Tovar N et al. Evaluation of bone response to various anorganic bovine bone xenografts: an experimental calvaria defect study, *Int J Oral Maxillofac Surg* 2013;43:251-260.
213. Trombelli L, Heitz-Mayfield LJ, Needleman I, Moles D, Scabbia A. A systematic review of graft materials and biological agents for periodontal intraosseous defects. *J Clin Periodontol* 2002;29 (3):117–135.
214. Urist MR, Strates BS. The classic: bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res* 2009;467:3051-62.
215. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893.
216. Yamada Y, Tamura T, Hariu K, Asano Y, Sato S, Ito K. Angiogenesis in newly augmented bone observed in rabbit calvarium using a titanium cap. *Clin Oral Impl Res* 2008;19:1003–1009.
217. Yan W, Li X. Impact of diabetes and its treatments on skeletal diseases. *Front Med* 2013;7:81–90.
218. Yang C, Unursaikhan O, Lee JS, Jung UW, Kim CS, Choi SH. 2013. Osteoconductivity and biodegradation of synthetic bone substitutes with different tricalcium phosphate contents in rabbits. *J Biomed Mater Res Part B* 2014;102(1):80-88.
219. Yang YQ, Tan YY, WongR, Wenden A, Zhang LK, Rabie B. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci* 2012;4:64-68.

220. Yao Y, Bennett BJ, Wang X, Rosenfeld ME, Giachelli C, Lusis AJ, Bostrom KI. Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circ Res* 2010;107:485–494.
221. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989;3:192–195.
222. Younis WH, Al-Rawi NH, Mohamed MA, Yaseen NY. Molecular events on tooth socket healing in diabetic rabbits. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2013;51:932–936.
223. Wang F, Song Y, Li D, Li C, Wang Y, Zhang N, Wang B. Type 2 diabetes mellitus impairs bone healing of dental implants in GK rats. *Diabetes research and clinical practice* 2010;88:7–9.
224. Weiss RE, Gora A, Nimni ME. Abnormalities in the biosynthesis of cartilage and bone proteoglycans in experimental diabetes. *Diabetes* 1981;30:670–677.
225. Wilk RM. Bony reconstruction of the jaws. In *Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2nd ed.; Miloro, M., Ed. B C Decker Inc.: Hamilton, ON, Canada, 2004;785–787.
226. Weiss RE, Gora A, Nimni ME. Abnormalities in the biosynthesis of cartilage and bone proteoglycans in experimental diabetes, *Diabetes* 1981; 30: 670–677.
227. Woo K, Ayello EA, Sibbald RG. The edge effect: current therapeutic options to advance the wound edge. *Adv Skin Wound Care* 2007;20:99-117;quiz 118-119.
228. Wirostko B, Wong TY, Simo R. Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Progress in Retinal and Eye Research* 2008;27:608-621.
229. Wu KK, Huan Y. Diabetic atherosclerosis mouse models. *Atherosclerosis* 2007;191:241-249.

230. Xu S, Lin K, Wang Z, et al. Reconstruction of calvarial defect of rabbits using porous calcium silicate bioactive ceramics. *Biomaterials* 2008;29:2588-96.
231. Valentini P, Abensur D. Maxillary sinus floor elevation for implant placement with demineralized freeze-dried bone and bovine bone (bio-oss): A clinical study of 20 patients. *Int J Periodontics Restor Dent* 1997;17:232–241.
232. Vieira EMM, Ueno CSF, Valva VN, Goulart MG, Nogueira TO, Gomes M. Bone regeneration in cranioplasty and clinical complications in rabbits with alloxan-induced diabetes. *Braz Oral Res* 2008;22(2):184-91.
233. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev* 2004;25:612-28.
234. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996;93:1493-1495.
235. Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes –a meta-analysis. *Osteoporosis International* 2007;18:427-444.
236. Von Wilmowsky C, Stockmann P, Metzler P, Harsh IA, Amann K, Schlegel KA. Establishment of a streptozotocin-induced diabetic domestic pig model and a systemic evaluation of pathological changes in the hard and soft tissue over a 12-month period. *Clin Oral Implant Res* 2010;21:709-717.
237. Zerbo IR, Zijderveld SA, de Boer A, Bronckers ALJJ, de Lange G, ten Bruggenkate CM, et al. Histomorphometry of human sinus floor augmentation using a porous b-tricalcium phosphate: a prospective study. *Clin Oral Imp Res* 2003;15:724-732.

238. Zykova SN, Jenssen TG, Berdal M, Olsen R, Myklebust R, Seljelid R. Altered cytokine and nitric oxide secretion in vitro by macrophages from diabetic type II-like db/db mice. *Diabetes* 2000;49:1451-1458.

SKRAĆENICE

VEGF - Vaskularni endotelni faktor rasta

BMP 2 - Kostni morfo-genetski protein 2

DM - Dijabetes melitus

β TKF - Beta-trikalcijum fosfat

HA - Hidroksiapatit

β TKF/HA - Beta-trikalcijum fosfat/hidroksiapatit

AUTO - Autotransplantat

KON - Kontrolni defekt

N - Broj eksperimentalnih životinja

BIOGRAFIJA

Mr sci. dr Milka Živadinović (rođ. Maćešić), je rođena 31.07.1980. godine u Karlovcu u Republici Hrvatskoj, gde je završila osnovnu školu. Prvu beogradsku gimnaziju, prirodno-matematički smer, završila je u Beogradu sa odličnim uspehom. Diplomirala je na Stomatološkom fakultetu u Beogradu 2005. godine sa prosečnom ocenom 9,06. Tokom studija učestvovala je na domaćim i međunarodnim studentskim kongresima. Državni ispit je položila 2006. godine.

Magistarsku tezu iz oblasti oralne hirurgije pod nazivom „Efekat nesteroidnih antiinflamacijskih lekova na suzbijanje postoperativnog bola, edema i trizmusa nakon hirurškog vađenja impaktiranih donjih umnjaka” odbranila je 2009. godine na Stomatološkom fakultetu u Beogradu. Prvu godinu zdravstvene specijalizacije iz oblasti oralne hirurgije upisala je 2013. godine na Stomatološkom fakultetu u Beogradu.

Dr Milka Živadinović je objavila dva rada u časopisu sa SCI liste i saopštila četiri rada na domaćim i međunarodnim kongresima.

Od 2011. godine je zaposlena u stomatološkoj ordinaciji DentalPro, čiji je osnivač i vlasnik. Pohađala je veliki broj kurseva u okviru kontinuirane edukacije iz oblasti oralne hirurgije i implantologije.

Dr Milka Živadinović govori engleski, italijanski, španski i nemački jezik.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Милка Живадиновић

број досијеа 202/2014

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање успешности регенерације костног ткива на моделу критичног дефекта калварије кунџа са дијабетес мелитусом тип I

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

Потпис докторанда

У Београду, 31.05.2016.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милка Живадиновић

Број досијеа 202/2014

Студијски програм _____

Наслов рада Испитивање успешности регенерације костног ткива на моделу критичног дефекта калварије кунџа са дијабетес мелитусом тип I

Ментор проф. др Божидар Брковић

Потписани/а Милка Живадиновић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 31.05.2016.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Испитивање успешности регенерације костног ткива на моделу критичног дефекта калварије кунџа са дијабетес мелитусом тип I

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, 31.05.2016.
