

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković  
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij  
Molekularne bioznanosti

Matej Tomas

**ZNAČAJKE NOVONASTALE KOSTI ALVEOLARNOG  
GREBENA NAKON PRIMJENE INJEKCIJSKOG  
BIFAZNOG KALCIJEVA FOSFATA**

Doktorski rad

Osijek, 2023.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković  
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij  
Molekularne bioznanosti

Matej Tomas

**ZNAČAJKE NOVONASTALE KOSTI ALVEOLARNOG  
GREBENA NAKON PRIMJENE INJEKCIJSKOG  
BIFAZNOG KALCIJEVA FOSFATA**

*Doktorski rad predložen je Sveučilišnom vijeću za poslijediplomske studije u svrhu stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti na Poslijediplomskom interdisciplinarnom sveučilišnom studiju Molekularne bioznanosti – modul biomedicina*

Osijek, 2023.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorski rad

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

**Znanstveno područje:** Interdisciplinarno područje znanosti

**Znanstvena polja:** Temeljne medicinske znanosti i Biologija

### ZNAČAJKE NOVONASTALE KOSTI ALVEOLARNOG GREBENA NAKON PRIMJENE INJEKCIJSKOG BIFAZNOG KALCIJEVA FOSFATA

Matej Tomas

**Rad je izrađen u:** Laboratoriju BerlinAnalytix GmbH, Berlin, Njemačka i Laboratoriju  
Zavoda za anatomiju, Medicinski fakultet u Rijeci, Hrvatska

**Mentor 1:** izv. prof. dr. sc. Marko Matijević

**Mentor 2:** doc. dr. sc. Željka Perić Kačarević

**Kratki sažetak doktorskog rada:** Nakon ekstrakcije zuba alveolarna kost prolazi kroz dimenzionalne promjene. Smanjenje dimenzija alveolarne kosti klinički je značajno i utječe na postavljanje dentalnog implantata. Za suzbijanje resorpcije kosti mogu se koristiti različiti nadomjesni koštani biomaterijali. U tu svrhu, u ovoj studiji korišteni su injekcijski bifazni kalcijev fosfat i anorganska goveđa kost. Histopatološke, histomorfometrijske i imunohistokemijske analize pokazale su usporedive rezultate za ove biomaterijale te su dokazale da je injekcijski bifazni kalcijev fosfat isto tako prikladan i uspješan za augmentaciju alveolarnog grebena u odnosu na alternativu zlatnom standardu tj. anorgansku goveđu kost.

**Broj stranica:** 110

**Broj slika:** 44

**Broj tablica:** 8

**Broj literaturnih navoda:** 320

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** aloplast; augmentacija; histologija; imunohistokemija; ksenograft

**Datum obrane:** 26.05.2023.

#### Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof. dr. sc. Slavica Kvolik (predsjednik)
2. Prof. dr. sc. Predrag Knežević (član)
3. Prof. dr. sc. Vera Cesar (član)
4. Izv. prof. dr. sc. Davor Seifert (zamjena člana)

**Doktorski rad je pohranjen u:** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske  
bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24,  
Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**University of Dubrovnik**  
**Ruđer Bošković Institute**  
**University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of**  
**Molecular biosciences**

**PhD thesis**

**Scientific Area:** Interdisciplinary Area of Science  
**Scientific Fields:** Basic Medical Sciences and Biology

### **PROPERTIES OF NEW BONE FORMATION IN ALVEOLAR RIDGE AFTER THE INJECTABLE BIPHASIC CALCIUM PHOSPHATE APPLICATION**

Matej Tomas

**Thesis performed at:** Laboratory BerlinAnalytix GmbH, Berlin, Germany and Department of Anatomy laboratory, Faculty of Medicine, Rijeka, Croatia

**Supervisor 1:** Assoc. Prof. Marko Matijević, PhD

**Supervisor 2:** Assist. Prof. Željka Perić Kačarević, PhD

**Short abstract:** After tooth extraction, the alveolar bone undergoes dimensional changes. The reduction of alveolar bone dimensions is clinically significant and affects the placement of dental implants. Various bone substitute biomaterials can be used to suppress bone resorption. For this purpose, injectable biphasic calcium phosphate and anorganic bovine bone were used in this study. Histopathological, histomorphometric, and immunohistochemical analyzes showed comparable results for these biomaterials and proved that injectable biphasic calcium phosphate is as suitable and successful for alveolar ridge augmentation as the gold standard alternative, i.e., anorganic bovine bone.

**Number of pages:** 110

**Number of figures:** 44

**Number of tables:** 8

**Number of references:** 320

**Original in:** Croatian

**Keywords:** alloplast; augmentation; histology; immunohistochemistry; xenograft

**Date of the thesis defense:** 26.05.2023.

#### **Reviewers:**

1. Prof. Slavica Kvolik, PhD (president)
2. Prof. Predrag Knežević, PhD (reviewer)
3. Prof. Vera Cesar, PhD (reviewer)
4. Assoc. Prof. Davor Seifert, PhD (substitute)

**Thesis deposited in:** National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

## Zahvala

*Veliko hvala mojim mentorima izv. prof. prim. dr. sc. Marku Matijeviću i doc. dr. sc. Željki Perić Kačarević na motivaciji, nesebičnoj pomoći, strpljivosti i razumijevanju pri izradi ovog doktorskog rada. Zahvaljujem se na svim savjetima koje ste dijelili tijekom mog profesionalnog i znanstvenog puta.*

*Hvala prof. dr. sc. Olgii Cvijanović Pelozii i članovima laboratorija Zavoda za anatomiju Medicinskog fakulteta u Rijeci prilikom pomoći oko obrade histoloških uzoraka. Bila mi je izuzetna čast i zadovoljstvo učiti i raditi u Vašem okruženju.*

*Veliko hvala prof. dr. sc. Veri Cesar, mojoj studijskoj savjetnici, na potpori i vodstvu tijekom cijelog studija. Hvala na svim savjetima, kritikama i životnim mudrostima.*

*Zahvaljujem se svim kolegama s Katedre za dentalnu medicinu, koji su me ustrajno pratili tijekom cijelog studija. Hvala što mi uveseljavate svakodnevnice na poslu.*

*Hvala mojim prijateljima na riječima ohrabrenja i podrške tijekom svih ovih godina.*

*Ovaj rad posvećujem svojim roditeljima, bez čije nesebične podrške, ljubavi, razumijevanja i bezuvjetnog strpljenja ne bih postigao sve što jesam.*

*Hvala Vam što ste uvijek vjerovali u mene.*

*Matej*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Biološka i fiziološka obilježja kosti alveolarnog grebena .....	1
1.2. Razvoj i struktura kosti alveolarnog grebena .....	1
1.2.1. Koštane stanice i međustanična tvar.....	2
1.2.2. Pregradnja kosti alveolarnog grebena.....	5
1.2.3. Mehanizmi atrofije i gubitka volumena kosti alveolarnog grebena .....	6
1.3. Regeneracija kosti alveolarnog grebena .....	8
1.3.1. Biološki mehanizmi regeneracije kosti.....	8
1.3.2. Augmentacija kosti alveolarnog grebena .....	10
1.4. Nadomjesni koštani biomaterijali za augmentaciju alveolarnog grebena .....	12
1.4.1. Autogena kost.....	14
1.4.2. Alografti.....	15
1.4.3. Ksenografti .....	16
1.4.4. Sintetski biomaterijali - Aloplasti.....	17
1.4.4.1. Hidroksiapatit (HA).....	18
1.4.4.2. $\beta$ -trikalcijski fosfat ( $\beta$ -TCP).....	19
1.4.4.3. Bifazni kalcijev fosfat BCP (HA + $\beta$ -TCP).....	19
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	21
3. MATERIJALI I METODE.....	22
3.1. Nadomjesni koštani biomaterijal (NKBM) .....	22
3.2. Ispitanici .....	22
3.2.1. 1. faza.....	23
3.2.2. 2. faza.....	27
3.2.3. Kvalitativna analiza histoloških uzoraka biopsije kosti .....	27
3.2.4. Kvantitativna analiza histoloških uzoraka biopsije kosti.....	28
3.2.5. Imunohistokemijska analiza uzoraka biopsije kosti .....	28

3.3. Statističke metode.....	30
4. REZULTATI .....	31
4.1. Demografski podaci.....	31
4.2. Površine histoloških struktura kontrolne i ispitivane skupine .....	34
4.2.1. Udjeli novostvorene kosti, zaostatnoga biomaterijala i mekoga tkiva .....	34
4.2.2. Distribucija kontrolnih i ispitivanih skupina .....	35
4.2.2.1. Q-Q graf normalnosti prema kontrolnoj i ispitivanoj skupini .....	35
4.2.2.2. Histogram frekvencija kontrolne i ispitivane skupine .....	37
4.2.2.3. Normalnost distribucije kontrolne i ispitivane skupine .....	39
4.3. Patohistološki odgovor tkiva kontrolne i ispitivane skupine.....	40
4.3.1. Hemalaun-eozin histološko bojenje kontrolne i ispitivane skupine .....	40
4.3.2. Histološko bojenje po Massonu i Movat-Rusellu kontrolne i ispitivane skupine .....	52
4.4. Prisutnost transkripcijskog faktora Osx i BMP-2 proteina.....	54
5. RASPRAVA.....	58
6. ZAKLJUČCI .....	69
7. LITERATURA .....	70
8. SAŽETAK .....	105
9. SUMMARY.....	106
10. ŽIVOTOPIS.....	107

## Popis kratica

$\beta$ -TCP	$\beta$ -trikalcij fosfat (engl. <i><math>\beta</math>- tricalcium phosphate, <math>\beta</math>-TCP</i> )
ARP	očuvanje alveolarnog grebena (engl. <i>alveolar ridge preservation</i> )
BCP	dvofazni (bifazni) kalcijev fosfat (engl. <i>biphasic calcium phosphate</i> )
BMP-2	koštani morfogenietski protein 2 (engl. <i>bone morphogenetic protein</i> )
BSP	koštani sijaloprotein (engl. <i>bone sialoprotein</i> )
CBCT	kompjutorizirana tomografija (engl. <i>cone-beam computed tomography</i> )
Cbfa 1	faktor vezivanja jezgre (engl. <i>core binding factor 1</i> )
CD-BB	kemijski deproteinizirana goveđa kost (engl. <i>chemical deproteinized bovine bone</i> )
DFDBA	demineraliziran zamrzavanjem osušen koštani alograft (engl. <i>demineralized freeze-dried bone allograft</i> )
FDBA	zamrzavanjem osušeni koštani alograft (engl. <i>freeze-dried bone allograft</i> )
FFB	svježi i zamrznuti alograft (engl. <i>fresh frozen bone</i> )
GBR	vođena regeneracija kosti (engl. <i>guided bone regeneration</i> )
HA	hidroksiapatit (engl. <i>hydroxyapatite</i> )
HIV	virus humane imunodeficijencije (engl. <i>human immunodeficiency virus</i> )
IL-1	interleukin 1 (engl. <i>interleukin 1</i> )
M-CSF	čimbenik stimulacije kolonije makrofaga (engl. <i>macrophage colony stimulating factor</i> )
MMP 13	matriks metalopeptidaza 13 (engl. <i>matrix metalloproteinase 13</i> )
NK	prirodno-ubilačke stanice (engl. <i>natural killer</i> )
NKBM	nadomjesni koštani biomaterijal
OCIF	faktor inhibicije osteoklasta (engl. <i>osteoclast inhibiting factor</i> )
ODF	faktor diferencijacije osteoklasta (engl. <i>osteoclast differentiation factor</i> )
OPGL	ligand osteoprogerina (engl. <i>osteoprotegerin ligand</i> )
OPG	osteoprotegerin (engl. <i>osteoprotegerin</i> )
OCN	osteokalcin (engl. <i>osteocalcin</i> )
OPN	osteopontin (engl. <i>osteopontin</i> )
Osx	osterix
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PDL	parodontni ligament (engl. <i>periodontal ligament</i> )
PGE2	prostaglandin E2 (engl. <i>prostaglandin E2</i> )



PDGF	faktor rasta podrijetlom od trombocita (engl. <i>platelet-derived growth factor</i> )
PTH	paratireodini hormon (engl. <i>parathyroid hormone</i> )
RANK	aktivator receptora nuklearnog faktora kapa B (engl. <i>receptor activator of nuclear factor kappa beta</i> )
RANKL	ligand aktivatora receptora nuklearnog faktora kapa B (engl. <i>activator of nuclear factor kappa beta ligand</i> )
ROI	regija od interesa (engl. <i>region of interest</i> )
TD-BB	termički deproteinizirana goveđa kost (engl. <i>thermally deproteinized bovine bone</i> )
TGF- $\beta$ 1	transformirajući faktora rast- $\beta$ 1 (engl. <i>transforming growth factor-<math>\beta</math>1</i> )
TNF	faktor nekroze tumora (engl. <i>tumor necrosis factor</i> )
TRANCE	citokin induciran aktivacijom povezanom s TNF-om (engl. <i>TNF related activation-induced cytokine</i> )

# 1. UVOD

## 1.1. Biološka i fiziološka obilježja kosti alveolarnog grebena

Koštano tkivo metabolički je aktivno kalcificirano gusto vezivno tkivo koje osigurava strukturnu podršku, rezervoar je minerala i faktora rasta, regulira mineralnu i acidobaznu homeostazu i mjesto je hematopoeze<sup>1,2</sup>. Osim toga, koštano tkivo ima veliku mogućnost regeneracije. Iz tog razloga, nastala oštećenja prolaze bez prevelikoga utjecaja na gubitak koštanoga volumena. Međutim, to nije slučaj kod alveolarne kosti - nakon ekstrakcije zuba, kroničnih periapikalnih procesa ili traume kao posljedica cijeljenja javlja se značajan gubitak koštanoga volumena<sup>3,4</sup>. Stoga je volumen kosti alveolarnog grebena važan lokalni čimbenik prilikom odlučivanja o ugradnji dentalnih implantata koji nadoknađuju izgublenu estetsku i žvačnu funkciju.

## 1.2. Razvoj i struktura kosti alveolarnog grebena

Kosti kraniofacijalnoga skeleta imaju najsloženiju koštanu strukturu u tijelu, a sastoje se od 22 kosti koje štite mozak i ostale organe<sup>5</sup>. Kraniofacijalni skelet formira se od neuralne kreste, koja potječe od ektomezenhimnih stanica. U fetalnome razdoblju kost se formira na jedan od dva načina: endohondralnom ili intramembranoznom osifikacijom. Većina kostiju razvija se endohondralnom osifikacijom čije je glavno obilježje stvaranje kosti proliferacijom hondrocita u okvir hijaline hrskavice<sup>6-8</sup>.

Za razliku od endohondralne osifikacije, obilježje intramembranozne osifikacije, koja je najvećim dijelom odgovorna za razvoj kostiju kraniofacijalnoga sustava (uključujući maksilu i mandibulu), formiranje je kosti bez posredstva hrskavične faze. Intramembranozna osifikacija započinje spontanom razvojem izvanstaničnoga matriksa diferencijacijom mezenhimnih matičnih stanica u osteoprogenitorne stanice koje zatim proliferiraju i diferenciraju se u osteoblaste<sup>8,9</sup>. Rast kostiju lica razlikuje se ovisno o lokaciji, a uvelike je vezan uz proces apozicije, tj. odlaganja. Drugim riječima, oblik i volumen kosti (u ovome slučaju maksile i mandibule) definirani su naslijeđenim genetskim čimbenicima koji su podvrgnuti epigenetskoj modulaciji<sup>10</sup>. Tijekom razvoja intramembranozna i endohondralna osifikacija imaju ključnu ulogu jer doprinose promjeni veličine i oblika kraniofacijalnoga kostura<sup>11</sup>.

Kosti lubanje razvijaju se kroz više različitih regionalnih mjesta rasta. Mjesto početka i rasta alveolarne kosti zubni je zametak. Za razliku od kraniofacijalnoga sustava, maksilarna i mandibularna kost spajaju se kroz specifično adaptacijsko područje koje čini dentoalveolarni kompleks <sup>12</sup>. Zapravo, formiranje zubnoga zametka omogućuje stvaranje, razvoj i rast alveolarne kosti. Alveolarna kost koja podupire zubnu strukturu, zajedno s vlaknima parodontnog ligamenta (engl. *periodontal ligament*, PDL), specifična je koštana cjelina, jedinstvene biološki labilne strukture, a sastoji se od četiri sloja. Uz tri sloja koja se nalaze u svim kostima (periost, gusta kompaktna kost i spužvasta kost), postoji četvrti sloj koji se naziva *lamina cribrosa* (prava alveolarna kost). On sadrži različite šupljine kroz koje se protežu Volkmannovi kanali povezujući alveolarnu kost i PDL. Takva kost naziva se i "bundle bone" zbog prisutnih Sharpeyevih vlakana, a radiografski izgleda kao radioopaktna linija (lamina dura) <sup>13</sup>. Prostor između trabekula spužvaste kosti ispunjeni su koštanom srži, koja se u ranoj životnoj dobi sastoji od hematopoetskoga tkiva, a kasnije od masnoga tkiva <sup>14</sup>.

Alveolarna kost dinamično je tkivo koje se kontinuirano formira i resorbira u odgovoru na funkcionalne zahtjeve. Osim takvoga lokalnog odgovora, metabolizam kosti pod stalnom je kontrolom hormona. Lako se resorbira pod utjecajem upalnih medijatora u periapeksu ili epitelnom pričvrstku <sup>15</sup>. Alveolarna kost prolazi kroz fiziološku pregradnju, a može biti podvrgnuta i opsežnijemu preoblikovanju tijekom pomicanja zuba i drugih vanjskih podražaja <sup>16</sup>. Svaki izvor traume, bilo akutan, s ili bez vaskularne ozljede, ili rekurentan i kroničan, koji dovodi do upale i/ili degeneracije, izaziva staničnu reakciju koja rezultira nakupljanjem različitih vrsta stanica. Pokreće se niz događaja koji uključuje stanične i morfološke promjene u strukturnim karakteristikama i dimenzijama alveolarne kosti. Tu skupinu stanica određuju lokalna transkripcija i čimbenici rasta specifični za mjesto defekta pod utjecajem čimbenika adhezije i proliferacije <sup>17,18</sup>. Međutim, anatomske karakteristike koštanoga defekta (volumen, broj površina, morfologija) određuju broj, a time i količinu nakupljanja stanica. U drugome koraku lokalni signali utječu na interakciju stanica kako bi potaknuli stanice da započnu osteogenu diferencijaciju. Taj posljednji korak diferencijacije predstavlja konačnu fazu sazrijevanja koja vodi do stanične funkcionalnosti. Sukladno tome, u koštanome tkivu prepoznamo tri vrste funkcionalnih stanica: osteoblaste, osteocite i osteoklaste <sup>19</sup>.

### **1.2.1. Koštane stanice i međustanična tvar**

Koštane stanice čine oko 10 % ukupnoga volumena kosti. Nastaju iz dvije stanične linije: osteoprogenitornih stanica iz loze mezenhimnih matičnih stanica koje se diferenciraju u osteoblaste i osteocite; i osteoklasta, koji su hematopoetskoga porijekla <sup>1,20</sup>.

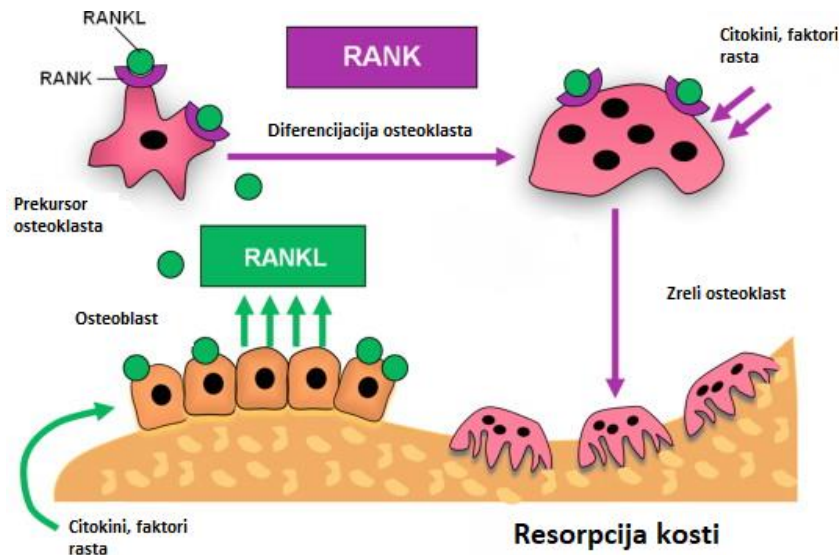
Osteoblasti su velike stanice kuboidnoga oblika koji čine jedan sloj prekrivajući sve periostalne ili endosealne površine u kojima je prisutna aktivna tvorba kosti. Jezgra im je jajolikoga oblika, a citoplazma ispunjena obilnim hrapavim endoplazmatskim retikulumom i istaknutim Golgijevim aparatom. Heterogenost između osteoblasta postoji i može odražavati razlike između različitih vrsta kosti i/ili anatomskih mjesta<sup>21,22</sup>. Osteoblasti su odgovorni za sintezu i mineralizaciju koštanoga matriksa. Neki osteoblasti postaju osteociti, smješteni u lakunama. Okruženi matricom, oni razvijaju citoplazmatske nastavke pomoću kojih dolaze u kontakt sa susjednim osteocitima te tako sudjeluju u staničnim procesima<sup>23</sup>. Osteociti održavaju koštani matriks i posreduju u homeostazi, a brzinu taloženja matriksa može odrediti broj ugrađenih osteocita<sup>24</sup>. Diferencijaciju osteoblasta kontroliraju različiti transkripcijski faktori, poput faktora vezivanja jezgre (engl. *core binding factor 1*, Cbfa 1), poznatoga i kao Pebp2a1, Aml3 i Runx2 te Osterix (Osx)<sup>25</sup>. Cbfa 1 također aktivira koštani sijaloprotein (engl. *bone sialoprotein*, BSP), osteopontin (OPN) i kolagen tipa 1, stoga djeluje kao čimbenik diferencijacije za osteoblaste i hondrocite tijekom embrionalnoga razdoblja i kao čimbenik aktivacije za funkciju osteoblasta u odrasloj dobi<sup>26</sup>. Slično tome, Osterix (Osx) je identificiran kao najjače izražen transkripcijski faktor u zadnjim fazama diferencijacije osteoblasta u novostvorenoj kosti, a inducira stvaranje kolagena, osteokalcina (engl. *osteocalcin*, OCN), osteopontina (engl. *ostepontin*, OPN), osteonektina, BSP-a i matriksa metalopeptidaze 13 (engl. *matrix metalloproteinase 13*, MMP 13) i tako potiče remodelaciju kosti<sup>27-29</sup>.

Za razliku od osteoblasta, osteoklasti potječu od monocitno-makrofagnoga sustava stanica hematopoetske loze<sup>30,31</sup>. To su velike višejezgrene stanice koje se nalaze u plitkim udubljenjima na površini kosti nazvanima Howshipove lakune. Tijekom pregradnje i procesa cijeljenja kosti mogu se nalaziti i u dubokim konusnim resorpcijskim šupljinama<sup>32</sup>. Citoplazma im je acidofilna i često sadrži vakuole. Stanična površina im je povećana brojnim citoplazmatskim naborima. Kroz povećanu staničnu membranu oslobađaju se vodikovi ioni i proteolitički enzimi koji zatim otapaju mineralne kristale i razgrađuju organski koštani matriks. Stoga je njihova primarna funkcija degradacija koštanoga matriksa staničnom fagocitozom u različitim fiziološkim i patološkim procesima<sup>33</sup>. Zapravo, identificirana su dva različita puta diferencijacije osteoklasta. Prvi ovisi o interakciji s osteoblastima i objašnjava poveznicu između formiranja kosti i resorpcije tijekom fiziološke pregradnje kosti. Drugi ovisi o citokinima koji su prisutni tijekom upale i traume, a njime se objašnjava gubitak koštanoga volumena tijekom patoloških procesa<sup>25,34,35</sup>. Nakon stimulacije nekoliko čimbenika, kao što su paratireodini hormon (engl. *parathyroid hormone*, PTH), prostaglandin E2 (engl. *prostaglandin*

E2, PGE2) i 1,25-vitamin D, tijekom fiziološkoga procesa remodelacije kosti, osteoblasti i stanice koštane srži sintetiziraju molekulu obitelji faktora nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*, TNF), koja se pojavljuje u dva oblika: topljivom obliku (molekula koja inhibira osteoklaste) i obliku izraženome na membranskoj površini osteoblasta (RANKL), tj. RANK ligand koji se također naziva faktorom diferencijacije osteoklasta (engl. *osteoclast differentiation factor*, ODF), ligand osteoprotegerina (engl. *osteoprotegerin ligand*, OPGL) ili citokin induciran aktivacijom povezanom s TNF-om (engl. *TNF related activation-induced cytokine*, TRANCE). Zatim se aktivira prekursor osteoklasta koji predstavlja RANKL receptor koji se naziva RANK receptor. RANKL je eksprimiran u stromalnim stanicama koštane srži, osteoblastima i određenim fibroblastima, dok je RANK eksprimiran u prekursorima osteoklasta i zrelih osteoklastima (**Slika 1**). S druge strane, topljivi oblik RANKL-a, osteoprotegerin (engl. *osteoprotegerin*, OPG) koji se naziva i faktorom inhibicije osteoklasta (engl. *osteoclast inhibiting factor*, OCIF) može blokirati diferencijaciju osteoklasta vezanjem na RANK receptor. Stoga su RANKL i njegov receptor mamac OPG središnji regulatori formiranja osteoklasta i funkcioniraju kao signali koji aktiviraju različite nizvodne signalne puteve potrebne za diferencijaciju i aktivnost osteoklasta<sup>25,35-37</sup>. Drugi put, neovisan o osteoblastima, dovodi do gubitka koštane mase uočenoga kod nekih patoloških stanja kao što su reumatoidni artritis i parodontna bolest, primjerice. Prvi mehanizam povezan je s interleukinom 1 (engl. *interleukin 1*, IL-1) koji stimulira aktivnost osteoklasta<sup>38,39</sup>. Drugi je povezan s TNF-om u prisutnosti čimbenika stimulacije kolonije makrofaga (engl. *macrophage colony stimulating factor*, M-CSF). Sukladno navedenom, može se zaključiti kako TNF- $\alpha$  i IL-1 predstavljaju citokine koje tijekom upale izlučuju makrofagi i limfociti i koji dovode do pojačane aktivnosti osteoklasta i posljedične resorpcije kosti<sup>40,41</sup>.

Međustanična tvar ili koštani matriks čini 90 % ukupnoga volumena kosti. Sastoji se od četiri glavne komponente: anorganske ili mineralne matrice (65 %), organskoga matriksa (20 %) i lipida i vode (15 %) <sup>42,43</sup>. Anorganski koštani matriks uglavnom je u obliku hidroksiapatita (engl. *hydroxyapatite*, HA) i osigurava čvrstoću kosti i otpornost na tlačne sile. Uklanjanje anorganskoga matriksa čini kost mekom, savitljivom i spužvastom. Građen je pretežno od kolagena tipa I (90 %), kojega izlučuju osteoblasti formirajući osteoid (spoj kolagena i nekolagenih proteina koji se pretvara u mineraliziranu kost), a također sadrži i proteoglikane, glikoproteine i čimbenike rasta<sup>44,45</sup>. Ti čimbenici rasta uključuju koštane morfogenetske proteine, transformirajuće faktore rasta, interleukin-1, interleukin-6, osteokalcin, osteonektin i koštani sijaloprotein koji igraju važnu ulogu u koštanoj osteogenezi, mineralizaciji i

remodelaciji <sup>46</sup>. Organski koštani matriks omogućava oblik i pruža otpornost na vlačne sile. Jedna od najvažnijih komponenti koštanoga matriksa su koštani morfogenetski proteini koji predstavljaju važne medijatore u embrionalnom razvoju neuralnoga grebena i imaju značajnu ulogu u promicanju osteoinduktivnih svojstava tijekom formacije i cijeljenja kosti <sup>8,46,47</sup>.

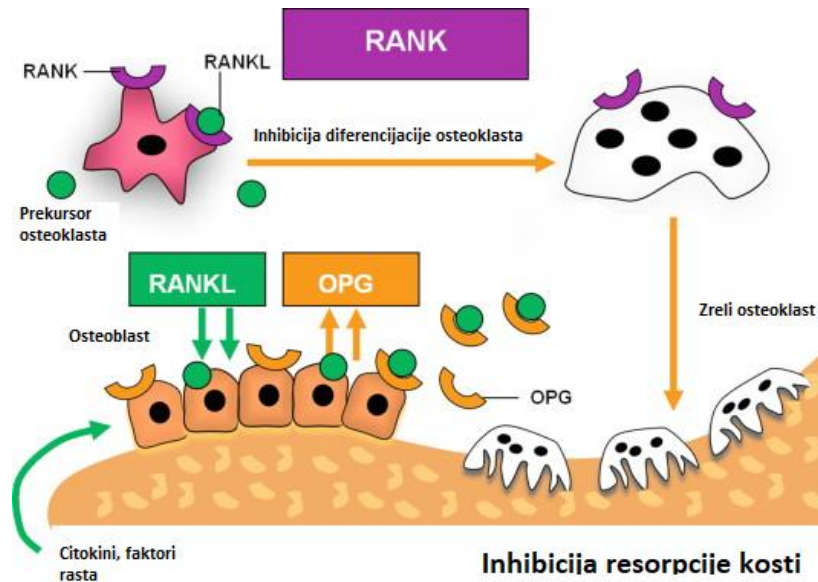


**Slika 1.** RANKL/RANK sustav diferencijacije osteoklasta. Preuzeto i prilagođeno uz dozvolu prema <sup>48</sup>.

### 1.2.2. Pregradnja kosti alveolarnog grebena

Pregradnja kosti proces je regulirane resorpcije i apozicije kosti s malo sveukupne trodimenzionalne promjene oblika. To je proces koji održava kosti zdravima, pomaže u regulaciji homeostaze kalcija i popravku mikrooštećenja. Pregradnja kosti alveolarnog grebena odvija se putem važnoga osteoklastičnoga i osteoblastičnog puta <sup>49-51</sup>. OPG/RANKL/RANK sustav pregradnje kosti koji je prethodno spomenut, najvažniji je u pregradnji kosti alveolarnog grebena (**Slika 2**). Npr. kompresija zuba tijekom ortodontskoga pomicanja dovodi do povećane koncentracije RANKL-a potičući stvaranje osteoklasta. Vlačna sila koja djeluje na parodontni ligament potaknut će povećano stvaranje osteoblasta i povišenu koncentraciju OPG-a. Relativne koncentracije OPG-a i RANKL-a na komprimiranim stranama zuba reguliraju lokalno modeliranje kosti te remodeliranje i resorpciju korijena <sup>52,53</sup>. Brojni citokini i faktori rasta imaju anaboličke i/ili kataboličke učinke na formiranje kosti alveolarnog grebena, posebno IL-1 i IL-1 $\alpha$ , koji reguliraju ekspresiju RANKL-a i OPG-a, dok imunološki sustav modificira

ravnotežu između formiranja i resorpcije kosti u kompleksu koji uključuje T i B-limfocite, dendritične stanice i citokine. Svako uplitanje u taj sustav može pomaknuti ravnotežu između apozicije i resorpcije kosti <sup>54-57</sup>.



**Slika 2.** OPG/RANKL/RANK sustav pregradnje kosti. Preuzeto i prilagođeno uz dozvolu prema <sup>48</sup>.

### 1.2.3. Mehanizmi atrofije i gubitka volumena kosti alveolarnog grebena

Nedovoljan volumen kosti na mjestu implantata može biti povezan s višestrukim čimbenicima koji se mogu klasificirati u dvije kategorije: 1) genetsko i epigenetsko podrijetlo koje dovodi do nedovoljnoga volumena kosti na mjestu implantata i 2) lokalno etiološko podrijetlo koje dovodi do gubitka volumena kosti alveolarnog grebena. Uzroci genetskoga ili epigenetskog podrijetla mogu utjecati na različite razvojne faze s obzirom na manjkavu signalizaciju i/ili transkripcijske faktore specifične za određeno mjesto. Kada je rast kosti harmoničan i uravnotežen između maksile, mandibule i dentoalveolarnog kompleksa, tada je pregradnja kosti fiziološka i uravnotežena <sup>58,59</sup>. U suprotnom slučaju, neravnoteža u rastu uzrokovat će više ili manje ozbiljne defekte u alveolarnoj kosti i/ili nesklad u nicanju ili poravnavanju zuba, s neodgovarajućim intermaksilarnim odnosom (npr. kod temporomandibularne ankiloze) <sup>60</sup>.

Gubitak volumena kosti može biti povezan i s lokalnom etiologijom. Brojne mutacije transkripcijskih faktora uključenih u razvoj dentalveolarnog kompleksa pokazale su da rano

blokiranje razvoja zuba dovodi do nedostatka volumena alveolarne kosti (npr. kod anodoncije ili ageneze više zubi). To se u potpunosti uklapa u teoriju da zubni zametak predstavlja regionalno mjesto rasta odgovorno za razvoj alveolarne kosti <sup>61</sup>.

Ipak, gubitak volumena alveolarne kosti u slučaju ekstrakcije zuba predstavlja jedinstven biološki proces. Nakon gubitka zuba alveolarna kost prolazi kroz degeneraciju, što rezultira volumenom kosti nedovoljnim za trenutnu ugradnju dentalnog implantata. Naime, kod resorpcije alveolarnog grebena pretežito je resorbirana kortikalna kost <sup>62-64</sup>. S jedne strane, žvakanjem, gutanjem ili jednostavnim lingvalnim pritiskom uz prisutnost zubnoga zametka, omogućava se pritisak i naprezanje alveolarne kosti te periostalna apozicija, dok odsutnost zubnoga zametka inducira njezinu resorpciju <sup>65</sup>.

Karakteristike kosti mogu varirati na različitim anatomskim mjestima. Pokazalo se da postoji veza između brzine resorpcije kosti i početne gustoće kosti prije nicanja zuba. Dokazano je da proces remodeliranja povezan s atrofijom u stražnjim regijama čeljusti počinje ranije i napreduje brže nego u prednjim <sup>66</sup>. Nadalje, nakon remodeliranja, trabekularna organizacija češća je u stražnjoj maksilarnoj regiji u usporedbi s drugim mjestima <sup>67</sup>. Postoji klasifikacija gustoće kosti povezana s implantološkom terapijom na temelju sastava i očitavanja gustoće preko kompjutorizirane tomografije (engl. *cone-beam computed tomography*, CBCT). Prema toj klasifikaciji, D3-D4 kost, karakterizirana poroznim tankim slojem kortikalne kosti i finom trabekularnom (spužvastom) kosti, prvenstveno se nalazi u stražnjoj maksilarnoj regiji; dok D1-D2 kost predstavlja kost veće gustoće koja se obično nalazi u prednjim i stražnjim dijelovima mandibularnog grebena <sup>68</sup>.

Od početka terapije implantatima "kvaliteta" kosti bila je točka pozornosti, izravno povezana s uspjehom implantološke terapije. Rane studije pokazale su statistički značajno niže stope preživljavanja implantata postavljenih u stražnji dio maksile u usporedbi s ostalim regijama <sup>68,69</sup>. Štoviše, karakteristike alveolarne kosti snažno utječu na stupanj primarne stabilnosti implantata. Naravno, primarna stabilnost osigurana je udjelom mineralizirane komponente koštanoga tkiva. Također, važno je imati na umu da regeneracija kosti nakon traume (kao što je ugradnja implantata) ovisi o biološkim komponentama koje se uglavnom nalaze u nemineraliziranoj koštanoj komponenti <sup>70</sup>. Rane studije pokazale su veću stopu uspješnosti implantata u mandibuli zahvaljujući njezinoj kortikalnoj (ili kompaktnoj) kosti u usporedbi s maksilom gdje je dominantnija spužvasta kost poroznije arhitekture <sup>71</sup>. Ipak, u današnje vrijeme, napredak na polju mehaničkoga inženjerstva (tj. obrada površine ili makro-dizajn implantata) razvio je predvidljiviju mehaničku stabilnost i konačnu oseintegraciju bez obzira



na "kvalitetu" kosti, ali bez obzira na dizajn i vrstu implantata volumen kosti alveolarnog grebena primarni je pokazatelj uspješnosti implantološke terapije <sup>72,73</sup>.

### **1.3. Regeneracija kosti alveolarnog grebena**

Regeneracija se obično opisuje kao zamjena nestalih ili izgubljenih sastavnih dijelova elementima ravnopravne organizacije, tako da se struktura i funkcija potpuno obnove. Fiziološka regeneracija razlikuje se od reparativne (potaknute) regeneracije. Mnoga tkiva i organski sustavi prolaze kroz fiziološku regeneraciju, tj. kontinuiranu zamjenu stanica tkiva. Remodelacija alveolarne kosti nakon gubitka vestibularne ili oralne stijenke uvijek je popraćena gubitkom volumena, čiji opseg ovisi o nekim osnovnim uvjetima, kao što su mehanička stabilnost kosti i opskrba krvlju <sup>74</sup>. Tijekom regeneracije kosti, gustoća i površina osteocita u lakunama, odgovornih za mehaničku stabilnost, podliježu značajnim promjenama <sup>75</sup>. Osteociti kontroliraju resorpciju matriksa u koji su ugrađeni te signaliziraju potrebu za remodelacijom <sup>76,77</sup>. Tijekom cijeljenja defekta, kao što je ugradnja implantata, lakunarna gustoća osteocita gotovo je dvostruko viša u primarnoj kosti u usporedbi sa zreloom lamelarnom kosti <sup>78</sup>. S druge strane, angiogeneza igra ključnu ulogu u razvoju i regeneraciji kosti, a nezadovoljavajuća neoangiogeneza smatra se ključnim čimbenikom u njezinom oštećenju <sup>79</sup>. To je jedan od prvih događaja u kaskadi cijeljenja i reguliran je složenim biokemijskim signalnim sustavom koji je posredovan faktorima rasta <sup>80,81</sup>.

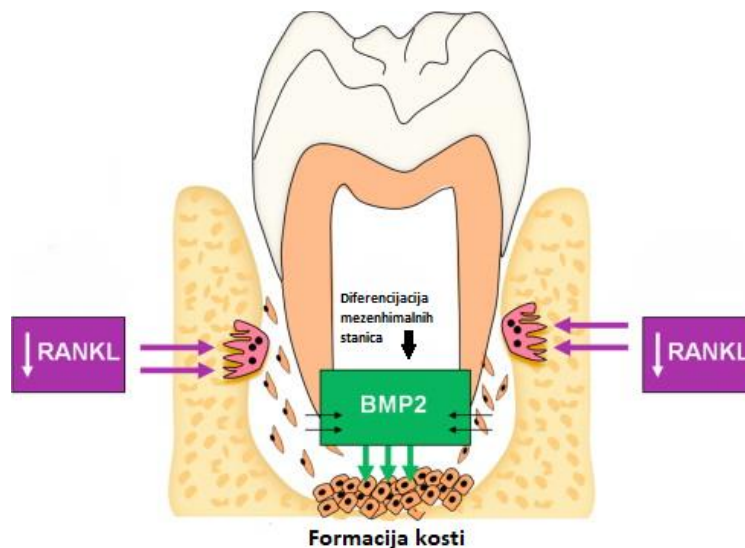
#### **1.3.1. Biološki mehanizmi regeneracije kosti**

Tijekom alveolarnog cijeljenja koštana alveola okružena je čvrstim nepokretnim stijenkama. Ako su neke od stijenki slomljene, fragmenti kosti eliminiraju se kao sekvestrum. Regeneracija alveolarne kosti odvija se u tri koraka: 1) neposrednom reakcijom na traumu, koja uključuje stvaranje ugruška i otpuštanja faktora rasta i citokina; 2) osteoplastičnom diferencijacijom, sa stvaranjem primarne kosti, odnosno kalusa; 3) i remodeliranjem kosti, s prilagodbom strukture kosti lokalnom stresu i naprezanju <sup>82,83</sup>.

Dentalna trauma nakon ekstrakcije zuba dovodi do prekida u opskrbi metaboličkim hranjivim tvarima za različite stanične elemente u ležištu alveole. Dolazi do stvaranja hematoma koji sadrži eritrocite, trombocite i imunološke stanice (neutrofile, makrofage i limfocite) <sup>84,85</sup>. Imunološke stanice proizvode različite citokine i kemokine TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-11 i IL-18 koji se pojavljuju na mjestu oštećenja na vremenski i prostorno kontroliran način <sup>86,87</sup>, te izazivaju akutnu upalu, angiogenezu, i nakupljanje mezenhimnih stanica <sup>83,84,88</sup>. U toj fazi dolazi do regrutiranja trombocita na mjesto oštećenja i proizvodnje transformirajućega faktora

rasta- $\beta$ 1 (engl. *transforming growth factor- $\beta$ 1*, TGF- $\beta$ 1) i faktora rasta podrijetlom od trombocita (engl. *platelet-derived growth factor*, PDGF) <sup>87</sup>. Istovremeno, regrutirane osteoprogenitorne stanice proizvode koštani morfogenetski protein 2 (engl. *bone morphogenetic protein*, BMP-2) koji, u koordinaciji s drugim čimbenicima potiče lokalno regrutiranje i osteogenu diferencijaciju mezenhimnih stanica (**Slika 3**) <sup>84,87</sup>. Liza ugruška povezana s neovaskularizacijom, u kombinaciji s kemotaktičkim i mitotičkim djelovanjem citokina, omogućuje naseljavanje novih stanica i stvaranje granulacijskoga tkiva koje ispunjava alveolu <sup>89</sup>. Paralelno se inducira diferencijacija osteoklasta, koji resorbira zaostale koštane sekvestre i površinu alveolarnih stijenki kako bi se omogućilo fiziološko spajanje alveole <sup>90</sup>. Stijenke alveole, kao i neovaskularizacija, omogućuju granulacijskom tkivu formiranje tkiva s osteogenim svojstvima. TNF regrutira mezenhimne stanice na mjesto oštećenja kosti koje se izlaže citokinima: TNF- $\alpha$  i IL-6 koje proizvode M1 makrofagi koji imaju važnu ulogu u cijeljenju kosti, što je dokazano mnogim studijama <sup>87,89,91-95</sup>. Njihova odsutnost na mjestu cijeljenja povezana je s potpunim prekidom regeneracije oštećene kosti <sup>96</sup>. U cijeljenju kosti optimalna ravnoteža između makrofaga s proupalnim fenotipovima - obično se nazivaju M1 - i fenotipovima koji potiču cijeljenje - obično se nazivaju M2 - potrebna je za odgovarajući proces regeneracije. M1 makrofagi započinju upalni odgovor i luče proupalne citokine <sup>94,96</sup>, a M2 makrofagi odgovorni su za remodelaciju, s fenotipom induciranim IL-4 i -13, te lučenjem IL-10 <sup>97</sup>. Ta dva tipa makrofaga djeluju zajedno kako bi započeli i završili imunološki odgovor u isprepletene lancu cijeljenja kosti. M1 makrofagi ne samo da pokreću upalni odgovor, već i izlučuju faktore koji stimuliraju početak angiogenoga procesa. Oni se postupno zamjenjuju M2 makrofagima, koji potiču cijeljenje i staničnu proliferaciju i sazrijevanje krvnih žila na mjestu cijeljenja <sup>97,98</sup>. Makrofagi dakle pospješuju proliferaciju i diferencijaciju mezenhimnih stanica u koštane stanice <sup>83,88</sup>. Druge vrste stanica također su prisutne na mjestu oštećenja, a uključuju monocite, neutrofile i prirodno-ubilačke (engl. *natural killer*, NK) stanice koje inhibiraju proces cijeljenja preko citokina IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  <sup>99-102</sup>. Te stanice proizvode citokine odgovorne za regrutiranje i aktivaciju drugih stanica s potencijalom diferencijacije i proliferacije za regeneraciju tkiva (npr. osteoprogenitorne mezenhimne stanice) <sup>99,103</sup>. Mezenhimne stanice diferenciraju se u hondroците i osteoblaste te sintetiziraju izvanstanični matriks, tvoreći meki kalus koji premošćuje odvojene koštane fragmente <sup>83</sup>. Te stanice zatim proliferiraju do potpune diferencijacije u zreli hipertrofični fenotip. U ovoj fazi, TGF- $\beta$ 2 i TGF- $\beta$ 3, kao i BMP-2, posreduju u staničnoj diferencijaciji i proliferaciji na mjestu oštećenja <sup>79,89,104</sup>. Procesom endohondralne osifikacije meki kalus transformira se u tvrdi kalus, s mineraliziranim matriksom kojega proizvode osteoblasti. U toj fazi dolazi do formiranja primarne kosti.

Formirana primarna kost postupno se zamjenjuje sekundarnom (lamelarnom) kosti u kojoj osteociti prolaze kroz apoptozu te dolazi do ponovne uspostave normalne fiziologije nastanka kosti <sup>89,104</sup>. Diferencijacija osteoblasta započinje 10 - 12 dana od oštećenja i, s obzirom na veličinu defekta, početno cijeljenje kosti očituje se nakon 3 - 5 tjedana. Da bi bila funkcionalna, takva kost zatim prolazi kroz proces remodelacije opisan u prethodnim poglavljima <sup>105</sup>.



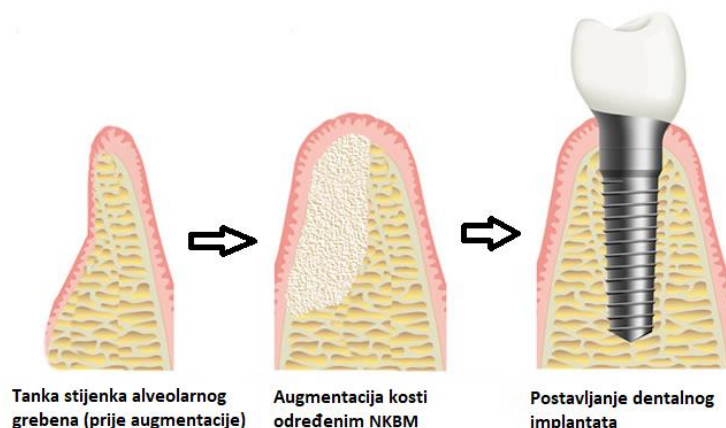
**Slika 3.** Regeneracija kosti potaknuta s BMP-2. Preuzeto i prilagođeno uz dozvolu prema <sup>48</sup>.

### 1.3.2. Augmentacija kosti alveolarnog grebena

Volumen alveolarne kosti i dentoalveolarnog kompleksa određen je pri rođenju unutarnjim i vanjskim procesom rasta (regionalna mjesta rasta, periostalne površine) koji određuje veličinu stanične kondenzacije uključene u uspostavljanje koštanih jedinica alveole. Budući da nakon vađenja zuba nema lokalnoga stresa i naprežanja, periostalna površina gubi svoj signalni mehanizam, što dovodi do smanjenja volumena okolne alveolarne kosti <sup>106-109</sup>. S druge strane, krajnji cilj implantološke terapije nadoknada je zuba koji nedostaju postavljanjem implantata u anatomske, estetske i funkcionalne položaje <sup>110</sup>. U tom slučaju, problem koji se pojavljuje povezan je s cijeljenjem defekta na mjestu ekstrakcije koji karakterizira brza resorpcija kosti <sup>111,112</sup>. Koštani defekti nastali uslijed traume ili kroničnih upalnih procesa alveolarne kosti i progresivna atrofija alveolarnog grebena najčešći su uzroci gubitka horizontalne i vertikalne dimenzije koštanih i mekotkivnih struktura <sup>112-114</sup>. Zapravo, nakon ekstrakcije zuba parodontna tkiva prolaze kroz atrofiju <sup>114,115</sup> s potpunim gubitkom cementa, vlakna parodontnog ligamenta

i "bundle bone" <sup>116</sup>. Većina alveolarnih promjena u ekstrakcijskoj alveoli događa se tijekom prve godine nakon ekstrakcije zuba, a dvije trećine gubitka koštane mase očituje se s vestibularne strane <sup>114,117</sup>. Prethodne studije na ljudima opisale su horizontalni gubitak kosti od 29 - 63 % i vertikalni gubitak kosti od 11 - 22 % tijekom prvih šest mjeseci nakon ekstrakcije zuba <sup>114,116,118,119</sup>. Osim toga, kada je visina alveolarnog grebena veća od 5 mm, postupci kao što su augmentacija i ugradnja dentalnog implantata mogu se izvoditi istovremeno, za razliku od slučajeva u kojima je visina preostalog alveolarnog grebena manja od 5 mm te zahtijeva vrijeme potrebno za cijeljenje kosti nakon umetanja nadomjesnoga koštanog biomaterijala (NKBM) i konačnoga postavljanja implantata, što je dokazano i u starijim studijama <sup>120-123</sup>.

U proteklih 20 godina različitim kirurškim tehnikama augmentacije alveolarnog grebena (prezervacija alveole, podizanje dna maksilarnog sinusa – tzv. „sinus lift“, vođena regeneracija kosti (engl. *guided bone regeneration*, GBR), horizontalna i vertikalna blok augmentacija, distrakcijska osteogeneza) omogućeno je održavanje idealnoga profila alveolarnog grebena, uz očuvanje odgovarajućih dimenzija kosti kako bi se olakšalo postavljanje dentalnog implantata <sup>124,125</sup>. Najčešće metode koje se koriste u augmentaciji, a koje su provedene u mnogim kliničkim studijama su: prezervacija alveole <sup>126-129</sup> i postupci vođene regeneracije kosti (GBR) <sup>130-132</sup>. Posljedično, pojavio se interes za koncept nazvan "očuvanje alveolarnog grebena" (engl. *alveolar ridge preservation*, ARP), koji je definiran kao: „svaki postupak u vrijeme, ili nakon ekstrakcije zuba, koji je osmišljen da minimizira resorpciju grebena i maksimizira formiranje kosti unutar alveole” <sup>133</sup>. Različite studije objavljene su na tu temu, potvrđujući učinkovitost različitih metoda u sprečavanju naknadnih dimenzionalnih promjena alveolarnog grebena <sup>134-136</sup>. ARP uključuje korištenje NKBM-a za nadoknadu i regeneraciju kosti, membrane i bioloških tvari (čimbenika rasta i diferencijacije), samih ili u kombinaciji jednoga s drugim. Te tehnike, uz pravilan odabir određenoga NKBM-a, rezultirale su neusporedivom dugoročnom primarnom stabilnosti i trajnosti dentalnih implantata (**Slika 4**) <sup>125,137,138</sup>.



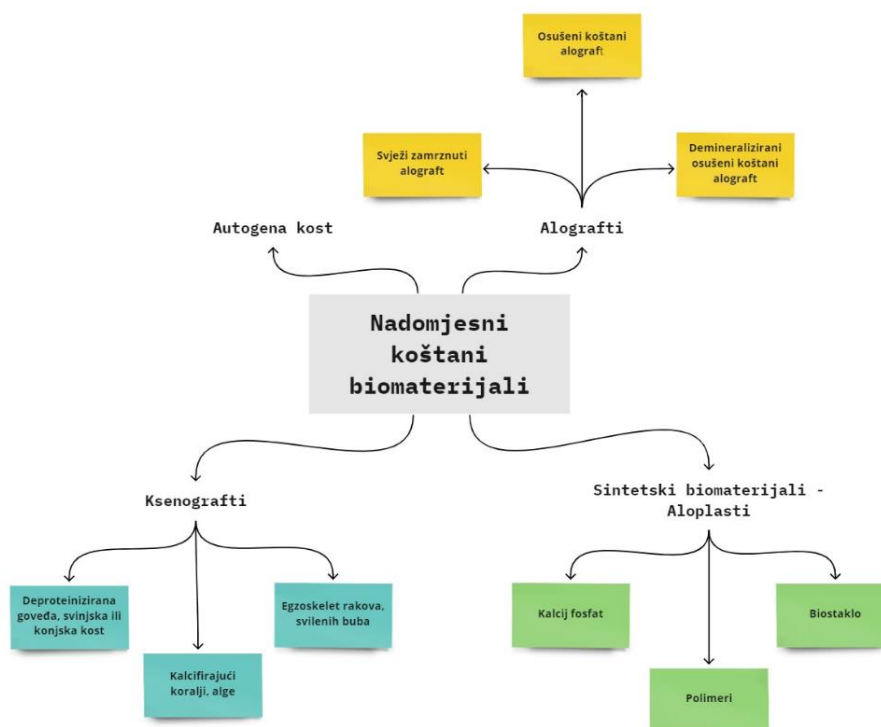
**Slika 4.** Augmentacija alveolarnog grebena. Preuzeto i prilagođeno uz dozvolu prema <sup>139</sup>.

#### **1.4. Nadomjesni koštani biomaterijali za augmentaciju alveolarnog grebena**

Kao što je već spomenuto, najveći gubitak alveolarne kosti nastaje nakon ekstrakcije zuba, kada dolazi do brze resorpcije zbog odsustva intraosealne stimulacije koja se tipično odvija preko vlakana parodontnog ligamenta <sup>140</sup>, stoga je defekt potrebno nadoknaditi odgovarajućim NKBM-om. U tkivnom se inženjerstvu NKBM definira kao trodimenzionalan porozan čvrst strukturni okvir dizajniran za obavljanje određenih funkcija tijekom stvaranja tkiva: 1) promicanje stanične interakcije, adhezije i taloženja izvanstaničnoga matriksa; 2) omogućavanje dovoljnoga transporta plinova, hranjivih tvari i regulatornih čimbenika koji omogućuju preživljavanje stanica i njihovu proliferaciju i diferencijaciju; 3) biorazgradiv je brzinom koja se može kontrolirati, a koja približno odgovara brzini regeneracije tkiva; 4) izaziva minimalan stupanj upale ili toksičnosti unutar tkiva <sup>141–143</sup>. Glavna funkcija NKBM-a je pružiti mehaničku potporu i stimulirati koštanu regeneraciju s krajnjim ciljem stvaranja nove kosti <sup>144</sup>. Četiri temeljna biološka svojstva oseintegracije, osteogeneze, osteokondukcije i osteoindukcije ključni su za učinkovito obavljanje te uloge <sup>145,146</sup>. Sposobnost NKBM-a da se kemijski veže za površinu kosti u nedostatku, tj. na sloj fibroznoga tkiva, naziva se oseintegracija. Osteogeneza se odnosi na stvaranje nove kosti putem osteoblasta ili prekursorskih stanica prisutnih unutar NKBM-a <sup>142</sup>. Pričvršćivanje mezenhimnih matičnih stanica i osteoprogenitornih stanica inducira stvaranje kosti na NKBM-u. Naime, NKBM često sadrži samo mineralizirani koštani matriks bez živih stanica <sup>140,147</sup>. Dakle, NKBM koji se koristi trebao bi podržavati proliferaciju i diferencijaciju mezenhimnih matičnih stanica i osteoprogenitornih stanica koje potječu iz kosti na transplantiranom mjestu, omogućujući taloženje izvanstaničnoga matriksa stvaranjem bioaktivnoga strukturnog okvira i mineralizaciju

putem osteoblastičnih stanica (osteokonduktivnost) <sup>142,148</sup>. Ta struktura omogućuje osteoblastima i matičnim stanicama domaćina migriranje u međusobno povezan osteomatriks. Osteoindukcija je regrutiranje matičnih stanica domaćina na mjesto presađivanja, gdje lokalni proteini i drugi čimbenici induciraju diferencijaciju matičnih stanica u osteoblaste i hondroblaste <sup>149</sup>. Više čimbenika rasta utječe na taj proces, uključujući PDGF, čimbenik rasta fibroblasta (FGF) i TGF- $\beta$ . Ta četiri temeljna svojstva omogućuju stvaranje nove kosti <sup>150-153</sup>. Osim toga, NKBM mora smanjiti rizik od bioloških štetnih učinaka (biokompatibilnost) <sup>154</sup>. Tradicionalno, u smislu biokompatibilnosti, NKBM se klasificira kao biotolerantan, bioinertan ili bioaktivan. Biotolerantan NKBM ostaje u tijelu i izaziva reakciju tkiva. Bioinertan NKBM ima izravan kontakt sa susjednim koštanim tkivom bez ikakve kemijske reakcije, dok bioaktivan NKBM uspostavlja kemijske veze sa susjednim koštanim tkivom, što dovodi do izravnoga taloženja koštanoga matriksa na određenom NKBM-u <sup>155,156</sup>. Štoviše, NKBM mora spriječiti kolaps strukturnoga okvira za stvaranje kosti (sposobnost stvaranja prostora) i po mogućnosti se zamijeniti novostvorenim koštanim tkivom (regeneracija) putem otapanja i pregradnje kosti osteoklastima (bioapsorpcija) <sup>157-160</sup>. Sposobnost NKBM-a za stvaranje prostora trebalo bi biti razmatrati odvojeno od formiranja i remodelacije kosti koja se javlja u relativno ranim fazama nakon stvaranja nove kosti. Jedan od čimbenika koji uvelike smanjuje volumen NKBM-a ili čestica nadomjestaka kosti tijekom formacije pritisak je susjednih tkiva kao što su sluznica ili gingiva i Schneiderova membrana, kao rezultat skupljanja tkiva <sup>161,162</sup>. Znatna morfološka stabilnost NKBM-a neophodna je za odupiranje takvom pritisku. Osjetljivost na enzime ili kemijsko otapanje također uvelike utječe na stvaranje prostora; ako je pasivno kemijsko otapanje prebrzo, NKBM nestaje prije stvaranja nove kosti, što dovodi do neispravnoga formiranja prostora <sup>163</sup>. Također, makroarhitektonski aspekti dizajna NKBM-a mogu kontrolirati stvaranje prostora utjecajem na topljivost NKBM-a u lokalnome tkivu. Različite studije u kojima su korišteni NKBM-i relativno velikih gustoća čestica rezultirale su njihovom razgradnjom sa stvaranjem novoformirane kosti i bez smanjenja prostora uspostavljenoga za regeneraciju kosti <sup>164,165</sup>. Također, druga svojstva utječu na stopu uspjeha NKBM-a, a uključuju: bioresorptivnost, sterilnost, strukturni integritet, odgovarajuću poroznost za urastanje krvnih žila, plastičnost, lakoću rukovanja, cijenu i tlačnu čvrstoću. Kombinacija tih čimbenika čini osnovu za njihovu upotrebu, odgovarajuću dugotrajnu toleranciju tkiva domaćina i povećane šanse za odvijanje uspješnih osteoregenerativnih procesa <sup>150,152,153</sup>. Studije su otkrile da gotovo svi trenutni NKBM-i primarno služe kao strukturni okvir za odvijanje regenerativnih procesa, i stoga zadovoljavaju samo komponentu osteokonduktivnosti <sup>150,166,167</sup>.

U današnje vrijeme mnogo različitih NKBM-a koristi se za regeneraciju alveolarne kosti, kao što su autogena kost, alografti, ksenografti ili sintetski biomaterijali (**Slika 5**). Navedeni NKBM-i koriste se za smanjenje dimenzionalnih promjena alveolarnog grebena te naposljetku nesmetane ugradnje dentalnog implanatata koji će nadoknaditi estetsku i žvačnu funkciju<sup>112,168,169</sup>. Nijedan od proizvoda koji se trenutno nalazi na tržištu ne posjeduje sva idealna svojstva za NKBM, uključujući netoksičnost, jednostavnost rukovanja, nisku imunogenost, nisku cijenu, sposobnost urastanja krvnih žila, biokompatibilnost, osteoinduktivna i osteokonduktivna svojstva<sup>144,170</sup>.



**Slika 5.** Klasifikacija NKBM-a koji se koriste u dentalnoj medicini

#### 1.4.1. Autogena kost

Autogena kost smatra se zlatnim standardom u kliničkoj primjeni prilikom augmentacije kosti jer je to još uvijek jedini NKBM za cijeljenje koji posjeduje sva četiri potrebna temeljna biološka svojstva kosti<sup>171,172</sup>. Sastoji se od približno 30 % organskih i 70 % anorganskih spojeva. Od organskih spojeva 90 % do 95 % čini kolagen (tip I), a ostatak su nekolagenski proteini kao što su osteokalcin, kalcitonin, osteopontin i sijaloproteini. Anorganska komponenta

sastoji se od kalcijeva fosfata, pretežno u obliku kristalnoga HA<sup>173,174</sup>. Takva kost u potpunosti je biokompatibilna jer je donor sam pacijent. Zbog toga je potrebno dodatno kirurško mjesto s kojega se uzima NKBM. Autogena kost obično se uzima s intraoralnih i ekstraoralnih mjesta kao što su simfiza mandibule, ramus mandibule, vanjski kosi greben, tuber maksile i tvrdo nepce, budući da oni predstavljaju dobre izvore kortikalne i spužvaste kosti<sup>143,144,150</sup>. Spužvasta kost najčešće se koristi za autotransplantate jer sadrži osteoblaste i progenitorske stanice sa značajnim osteogenim potencijalom. Zbog relativno velike trabekularne površine olakšava se uspostavljanje osteoinduktivnoga okruženja i poticanje revaskularizacije. Suprotno tome, kortikalnoj kosti nedostaju osteoblasti i osteogene stanice, no ona osigurava strukturnu cjelovitost i potiče cijeljenje kosti putem osteokondukcije. Kortikalni NKBM sporije se integrira u odnosu na spužvasti NKBM zbog svoje ograničene revaskularizacije. Stoga, kako bi se povećao učinak remodeliranja kosti i potencijal cijeljenja, koristi se kombinacija spužvaste i kortikalne kosti<sup>151,170</sup>. Što se tiče imunogenosti u slučaju s autotransplantatima, oni predstavljaju najveći stupanj biološke sigurnosti. Međutim, postoji nekoliko nedostataka povezanih s autotransplantatima. Autotransplantat kosti iz mandibularnoga ramusa povezan je s više komplikacija u usporedbi s drugim intraoralnim mjestima te povećava opasnost od oštećenja donjega alveolarnog živca. Autotransplantati ramusa mandibule prikladni su u slučaju kada su mjesta koja zahtijevaju augmentaciju manja od 4 mm debljine i obuhvaćaju najviše četiri zuba<sup>175,176</sup>. Još jedan od glavnih problema s autotransplantatom njegova je resorpcija. Autogena kost ima tendenciju gubitka volumena do 60 % tijekom cijeljenja i remodelacije<sup>177</sup>. Ostali nedostaci kao što su sekundarno kirurško mjesto, ograničena dostupnost, rizik od krvarenja, edem, postoperativni bol i viši kirurški troškovi doveli su do razvoja alternativnih NKBM-a<sup>178-185</sup>.

#### **1.4.2. Alografti**

Izvor alogenog koštanog transplantata je pojedinac (tj. živi donor ili kadaver) iste vrste, ali različitoga genotipa. Alografti se otapaju u tkivu i oslobađaju ione kalcija i izvor su kolagena tipa I, koji je jedina organska komponenta kosti<sup>186,187</sup>. Prednosti takvoga NKBM-a su izbjegavanje sekundarnoga kirurškog mjesta i skraćeno vrijeme zahvata. Materijali za alograft mogu se pripremiti u tri primarna oblika – kao svježi, zamrznuti ili osušeni smrzavanjem. Svježi i zamrznuti alograft (engl. *fresh frozen bone*, FFB) posjeduje dobra osteoinduktivna svojstva, ali rijetko se koristi zbog povećanoga rizika od imunogenoga odgovora domaćina, ograničenoga roka trajanja i povećanoga rizika od prijenosa bolesti virusa humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*, HIV) i hepatitisa B i C<sup>188-190</sup>. Druga



dva oblika sastoje se od ljudske kosti s ili bez demineralizacije, tj. demineraliziranoga zamrzavanjem osušenoga koštanog alografta (engl. *demineralized freeze-dried bone allograft*, DFDBA) i zamrzavanjem osušenoga koštanog alografta (engl. *freeze-dried bone allograft*, FDBA) <sup>191,192</sup>. Međutim, osteoinduktivno svojstvo (zbog uloge BMP-2 proteina) demineraliziranoga zamrzavanjem osušenoga alografta kosti varira ovisno o dobi darivatelja, načinu pripreme i sterilizacije <sup>193,194</sup>. Različiti rizici vezani uz takav NKBM mogu se ublažiti obradom tkiva kao što su: sterilizacija, ultrazvučno ispiranje, gama zračenje, demineralizacija, iako istraživanja dokazuju da se smanjenje rizika od imunogenih reakcija ili prijenosa bolesti ne može jamčiti <sup>148</sup>. Daljnja obrada alografta sušenjem zamrzavanjem može produljiti vijek trajanja materijala i smanjiti imunogenost, iako po cijenu smanjenoga osteoinduktivnog potencijala koji ipak nije dovoljan za odgovarajući volumen kosti prije postavljanja dentalnog implantata i njegovu oseointegraciju <sup>151</sup>. Posljednjih godina veliki se problem takvih koštanih nadomjestaka odnosi na nedostatak opskrbe tkiva, kao i nalaz visoke stope neuspjeha nakon dugotrajnoga liječenja koji su, uza sve navedeno, smanjili njihovu upotrebu. Štoviše, povećanje regulatornih ograničenja u pogledu upotrebe alografta u Europi dovelo je do upotrebe novih materijala drukčijega podrijetla, kao što je životinjsko ili sintetsko <sup>147,195</sup>.

### **1.4.3. Ksenografti**

Ksenografti se koriste kao alternativa zlatnom standardu. Sastoje se od koštanoga minerala dobivenoga od životinja ili minerala sličnih kosti dobivenih iz kalcificirajućih koralja ili algi, egzosekeleta rakova ili svilene bube *Bombyx mori* iz kojih je uklonjena organska komponenta kako bi se smanjio rizik od imunogenih reakcija ili prijenosa bolesti <sup>196–199</sup>. Većina znanstvenih istraživanja spominje deproteiniziranu goveđu, svinjsku, a u novije vrijeme i konjsku kost <sup>200</sup>. Najčešći izvor materijala za ksenograft u području dentalne medicine deproteinizirana je goveđa kost. Goveđa se kost obrađuje kemijski ili procesom toplinske deproteinizacije kao kemijski deproteinizirana goveđa kost (engl. *chemical deproteinized bovine bone*, CD-BB) i termički deproteinizirana goveđa kost (engl. *thermally deproteinized bovine bone*, TD-BB) nakon čega slijedi kemijska obrada s NaOH za proizvodnju poroznoga HA materijala koji sadrži samo anorganske komponente goveđe kosti. Rezultirajuća porozna struktura nalikuje strukturi ljudske kosti i može pružiti dobru mehaničku potporu i potaknuti cijeljenje kroz osteokondukciju <sup>201</sup>. Također, porozna struktura pokazuje veliku površinu i potiče rast novih krvnih žila putem angiogeneze koja pospješuje rast kosti. Deproteinizacija je kritičan proces koji se izvodi radi uklanjanja organske komponente ksenografta. Za deproteinizaciju koštanoga tkiva koristi se uranjanje u jaku kiselinu ili bazu ili toplinski ciklus na približno 1000 °C <sup>202–204</sup>.

Opće je poznato da je deproteinizirana goveđa kost biokompatibilna i osteokonduktivna, iako metode proizvodnje imaju snažan utjecaj u slučaju osteokonduktivnih svojstava i resorpcije. Temperature veće od 1000 °C uzrokuju sinteriranje prirodnoga HA, pri čemu kristali HA rastu, a međukristalni prostori u velikoj mjeri nestaju. Time se smanjuje mikrohrapavost i poroznost koštanoga nadomjestaka i povećava kristalnost rešetke <sup>205,206</sup>. Ovaj mineralni strukturni okvir pogoduje kolonizaciji koštanoga tkiva što olakšava migraciju osteoblasta. Veličina kristala je 10 nm, a veličina granula je 0,25 - 1 mm <sup>207,208</sup>. Nekoliko je studija pokazalo da se goveđi HA potpuno integrira u regeneriranu kost. Resorpcija goveđeg HA je aktivna, ali se čini vrlo spora. Naime, materijal se sporije razgrađuje nego što se resorbira <sup>209-211</sup>. Teoretski, goveđi ksenografti predstavljaju rizik za prijenos prionske infekcije na primatelja u obliku Creutzfeldt-Jakobove bolesti, što je jedan od nedostataka takvoga NKBM-a <sup>200</sup>. Međutim, unatoč hipotetskom riziku od organskih ostataka u nadomjescima goveđe kosti, istraživanja su pokazala da je rizik od prijenosa bolesti zanemariv, mada sumnja i dalje postoji <sup>212</sup>. Nasuprot tome, zabilježeno je nekoliko slučajeva prijenosa HIV-a i hepatitisa povezanih s alogenim materijalima <sup>213</sup>. Goveđi koštani nadomjesci intenzivno se koriste u podizanju maksilarnog sinusa i implantološkim postupcima zbog njihove vrhunske stabilnosti i niske imunogenosti <sup>148,201</sup>. Dostupni su u obliku koštanih blokova ili granula (transplantati napravljeni od malih ili velikih čestica). Nedostatak koštanih blokova mogućnost je loma tijekom fiksacije, što utječe na kirurški zahvat i zacjeljivanje kosti <sup>178,214-216</sup>. Biopsija kosti nakon augmentacije grebena potvrđuje da se čestice koštanih nadomjestaka goveđega podrijetla mogu pronaći i do 10 godina nakon zahvata. Stoga se u svakodnevnoj praksi ksenografte smatra neresorptivnim biomaterijalima <sup>217</sup>.

#### **1.4.4. Sintetski biomaterijali - Aloplasti**

Aloplastični koštani transplantati pripadaju skupini sintetskih biomaterijala. Za sprečavanje potencijalne infekcije i morbiditeta na donorskom mjestu, sintetski materijali oponašaju biološka svojstva prirodne kosti. Unatoč tome, trenutno dostupni sintetski materijali imaju samo osteointegrativna i osteokonduktivna svojstva <sup>146</sup>. Materijali koji spadaju u ovu kategoriju uključuju kalcijev fosfat, kao što je hidroksiapatit (HA), trikalcij fosfat (TCP) i biostaklo; metale, kao što je nikal-titan; polimere kao što je npr. polimetilmetakrilat (PMMA), poliglikolide i kalcij fosfatne cemente <sup>140,150</sup>. Prednosti takvih nadomjestaka su njihova biokompatibilnost/histokompatibilnost i osteokonducijska sposobnost. Osim toga, nije potrebno donorsko mjesto, niti postoji opasnost od prijenosa infektivnih bolesti <sup>218-220</sup>.

Aloplastična sposobnost biomaterijala ovisi o održavanju prostora za stvaranje nove kosti i brzini njegove resorpcije. Stoga se mnogi od aloplastičnih materijala sporo resorbiraju ili ne resorbiraju, što je jedan od nedostataka. Nova kost zahtijeva prostor koji u početku zauzima koštani transplantat, no ako se koštani materijal ne resorbira, tada je raspoloživi prostor za stvaranje kosti ograničen, čime se smanjuje ukupni volumen novostvorene kosti <sup>221,222</sup>.

Sintetski biomaterijali predstavljaju veliku skupinu anorganskih biomaterijala s različitim fizikalnim, kemijskim i strukturalnim svojstvima. Sintetski biomaterijali sastavljeni su od kalcijevog fosfata kako bi bili što sličniji prirodnoj kosti koja se uglavnom sastoji od kalcijevog fosfata hidroksiapatita. Prva eksperimentalna uporaba tih biomaterijala provedena je 1920-ih <sup>223</sup>. Sintetski kalcijev fosfat koji se najčešće koristi u dentalnoj medicini sastoji se od kombinacije ili samostalnoga neresorptivnog, krutog HA, resorptivnoga  $\beta$ -trikalcijevog fosfata (engl.  *$\beta$ -tricalcium phosphate*,  $\beta$ -TCP) i kompleksa koji se naziva dvofazni (bifazni) kalcijev fosfat (engl. *biphasic calcium phosphate*, BCP) koji je i korišten u našoj studiji <sup>179,223</sup>. HA se ne resorbira, ali djeluje kao potpora za održavanje integriteta i cjelovitosti defekta zbog svoje osteokonduktivnosti, dok se  $\beta$ -TCP u potpunosti resorbira, što doprinosi stvaranju nove kosti oslobađanjem iona kalcija i fosfora <sup>223,224</sup>.

#### **1.4.4.1. Hidroksiapatit (HA)**

Kemijski sastav HA vrlo je sličan sastavu anorganske komponente kosti, što omogućuje da se koristi kao NKBM <sup>225</sup>. Međutim, sintetski čisti HA ne sadrži  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Sr}^+$  koji se nalaze u prirodnom HA, poput goveđe kosti, što utječe na razne biomehaničke reakcije. Sintetski HA nema mikroporoznu strukturu, za razliku od HA dobivenoga od goveda <sup>188</sup>. Sintetski HA ima odgođenu stopu resorpcije zbog relativno visokoga Ca/P omjera i kristalnosti. Drugi veliki nedostatak povezana s HA-om njegova je relativno niska mehanička čvrstoća koja onemogućava korištenje na mjestima s velikim opterećenjem. Prethodne studije otkrile su da je kvaliteta i količina novonastale kosti nakon presađivanja samo sa sintetskim čistim HA bila nedostatna za očuvanje visine alveolarnog grebena za ugradnju dentalnih implantata, podizanje dna maksilarnog sinusa i liječenje parodontnih koštanih defekata <sup>226</sup>. Nedavni napredak s koštanim nadomjescima na bazi HA doveo je do razvoja HA nano reda veličine, koji pokazuje poboljšana biomehanička svojstva. Razvoj tih nanomaterijala uključuje mnogo veću sličnost s izvanstaničnim matriksom kosti; brži odgovor na vanjske podražaje i kontrolirano otpuštanje bioaktivnih molekula, kao što su faktori rasta, koji omogućuju poboljšanu regeneraciju kosti <sup>227,228</sup>. Nanostruktura omogućuje učinkovitije prijanjanje, proliferaciju i diferencijaciju

osteogenih progenitorskih stanica; poboljšava sinterabilnost i pojačava stvrđnjavanje što rezultira poboljšanom otpornošću na lom<sup>225,229,230</sup>.

#### **1.4.4.2. $\beta$ -trikalcij fosfat ( $\beta$ -TCP)**

$\beta$ -TCP je vrsta materijala kalcijeva fosfata koji se široko koristi kao zamjena za kost. Brže se resorbira u usporedbi s HA-om zbog niže razine omjera Ca/P<sup>145</sup>. Čisti  $\beta$ -TCP posjeduje mnoga poželjna svojstva, poput lakoće rukovanja, radiopaciteta koji omogućuje praćenje cijeljenja, dobru osteokonduktivnost zbog makroporoznosti koja potiče fibrovaskularni rast i osteogenu staničnu adheziju, dobru resorpciju u usporedbi s transplantatima goveđe kosti i nisku imunogenost i rizik od prijenosa bolesti<sup>148,231</sup>. Dok međusobno povezana porozna struktura  $\beta$ -TCP omogućuje poboljšanu vaskularizaciju, ujedno rezultira lošim mehaničkim karakteristikama čvrstoće materijala pod velikim pritiskom<sup>144,145,148</sup>. Stoga je čisti  $\beta$ -TCP prikladan za upotrebu kao punilo u koštanim defektima pri popravku rubnih parodontnih i periapikalnih defekata<sup>232,233</sup>. Regenerativni potencijal  $\beta$ -TCP-a usporediv je s koštanim alograftom, deproteiniziranim koštanim alograftom i autogenom kosti<sup>234</sup>. Međutim, mehanička svojstva toga materijala u samostalnom obliku ograničavaju njegovu široku primjenu<sup>147</sup>.

#### **1.4.4.3. Bifazni kalcijev fosfat BCP (HA + $\beta$ -TCP)**

Napredak u prethodnih nekoliko desetljeća događao se pri razvoju NKBM-a koji bi uspio iskoristiti resorptivni učinak  $\beta$ -TCP-a, kao i osteokonduktivni potencijal HA<sup>235</sup>. To je rezultiralo razvojem bifaznog kalcijeva fosfata, gdje se  $\beta$ -TCP i HA obično koriste zajedno. Dakle, rezultat je brža i veća stopa regeneracije kosti u usporedbi s upotrebom samoga HA-a, i bolja mehanička svojstva od samoga  $\beta$ -TCP<sup>236-238</sup>. Osim toga, resorpcija i osteokonduktivnost bifaznog kalcijeva fosfata mogu se kontrolirati mijenjanjem omjera HA/ $\beta$ -TCP<sup>235</sup>. Unatoč poboljšanjima u mehaničkoj čvrstoći u usporedbi sa samim  $\beta$ -TCP-om, bifazni kalcij fosfat i dalje ima tlačnu čvrstoću nižu od kortikalne kosti<sup>147</sup>. Unatoč tome, njegova uporaba indicirana je kao NKBM koji je pokazao predvidljive kliničke rezultate i potpuno cijeljenje alveolarne kosti tijekom dvogodišnjega razdoblja praćenja<sup>232</sup>.

Na tržištu postoje brojni oblici aloplastičnih biomaterijala u obliku praha, blokova i granula u različitim veličinama s kojima je teško rukovati, osobito pri unošenju koštanoga materijala u trodimenzionalne šupljine. Ti nedostaci doveli su do razvoja biomaterijala u injekcijskom obliku zbog njihove viskoznosti i jednostavnosti uporabe,<sup>218,239</sup> što naposljetku dovodi do boljega kliničkog ishoda i smanjenjoga vremena operacije<sup>218,240</sup>.

Glavna prednost injekcijskih oblika aloplasta u usporedbi s aloplastima u drugim oblicima u tome je što se njih može samostalno unijeti u koštanu šupljinu bez mehaničke obrade. To svojstvo vrlo je bitno u kliničkoj primjeni koja uključuje različite šire ili uže koštane defekte, što pogoduje daljnjem razvoju minimalno invazivnih kirurških postupaka. Stoga su aloplasti i njihova upotreba u injekcijskim obliku postajali sve popularniji te predstavljaju idealnu zamjenu u odnosu na ostale vrste NKBM-a s mogućnošću prekrivanja različitih defekata, a time i povećanim osteokonduktivnim svojstvima. Istraživanja provedena na animalnim i studijama na ljudima na bazi ovih NKBM-a imaju važnu ulogu u bliskoj budućnosti <sup>240-242</sup>.

S obzirom na sve navedeno, veličina dimenzionalnih promjena alveolarnog grebena nakon ekstrakcije zuba važna je za donošenje pravilnih odluka i sveobuhvatno planiranje liječenja tijekom implantološke terapije. Osim toga, s pojavom većega naglaska na estetici, temeljito razumijevanje resorptivnoga obrasca i promjena u konturama alveolarne kosti i sluznice nakon ekstrakcije zuba, uz primjenu odgovarajućega NKBM-a, uvelike će poboljšati sposobnost rekonstruiranja koštanoga defekta do razine optimalne funkcije i zadovoljavajuće estetike.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovne hipoteze ovoga istraživanja su: Injekcijski bifazni kalcijev fosfat pri augmentaciji alveolarnog grebena u komparaciji s anorganskom goveđom kosti postiže približno jednak učinak u postotku novostvorene kosti.

Injekcijski bifazni kalcijev fosfat u usporedbi s anorganskom goveđom kosti pri augmentaciji alveolarnog grebena ima jednaku histokompatibilnost.

Cilj je istraživanja utvrditi sposobnost cijeljenja koštanih defekata alveole pri augmentaciji injekcijskim bifaznim kalcijevim fosfatom na humanim biopstatima te ga s histološkoga aspekta usporediti s anorganskom goveđom kosti.

Specifični ciljevi istraživanja su:

1. Izračunati postotak novostvorene kosti na koštanim biopstatima šest mjeseci nakon augmentacije;
2. Izračunati postotak zaostatnoga NKBM-a na koštanim biopstatima šest mjeseci nakon augmentacije;
3. Izračunati postotak mekotkivnih struktura na koštanim biopstatima šest mjeseci nakon augmentacije;
4. Kvalitativno procijeniti sposobnost NKBM-a u obnavljanju oštećenoga tkiva te opisati patohistološke promjene na koštanim biopstatima šest mjeseci nakon augmentacije;
5. Imunohistokemijski identificirati ekspresiju *Osx*-a u remodelaciji kosti;
6. Imunohistokemijski identificirati ekspresiju *BMP-2* u diferencijaciji mezenhimnih stanica.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Nadomjesni koštani biomaterijal (NKBM)

- Injekcijski bifazni kalcijev fosfat

Aloplastični NKBM u obliku paste koji se sastoji od vodenoga gela u obliku granula bifaznog kalcijeva fosfata sastava 60 % HA-a i 40 %  $\beta$ -TCP-a veličine čestica 15 - 50 nm (maxresorb® inject, botiss biomaterials, Zossen, Njemačka).

- Anorganska goveđa kost

Ksenograft podrijetlom od goveda koji dolazi u obliku granula sastavljen od 93,6 % HA-a veličine granula 0,25 - 1 mm (Bio-Oss®, Geistlich-Pharma, Wolhunsen, Švicarska).

#### 3.2. Ispitanici

U studiju su bila uključena 38 ispitanika. Pristup ekvivalencije ispitivanih metoda koristio se u analizi snage testa uz neinferiornost ispitivane skupine (injekcijski bifazni kalcijev fosfat) u odnosu na kontrolnu (anorganska goveđa kost). Za razinu značajnosti od 0,05, snagu testa od 80 % te očekivanu standardnu devijaciju predviđenoga ishoda od 10 te limit ekvivalencije  $d = 10$ , u istraživanje je bilo potrebno uključiti najmanje 36 ispitanika, odnosno 18 ispitanika po skupini. Glavni kriterij za uključivanje pacijenata bio je da imaju minimalno jedan zub predviđen za ekstrakciju na kojemu su iskorištene sve prethodne terapijske mogućnosti i koji imaju mogućnost odgođene ugradnje dentalnog implanata na mjestu ekstrakcije nakon augmentacije alveolarnog grebena. Kriteriji za uključivanje bili su i: 1) dob ispitanika  $\geq 18$  i  $\leq 60$  godina, 2) razumijevanje protokola i informirani pristanak koji je potpisan od strane svakoga ispitanika, 3) zadovoljavajuće fizičko i mentalno zdravlje ispitanika. Ispitanici koji su imali neki od navedenih isključivih kriterija eliminirani su iz studije: 1) minimalno jedna apsolutna kontraindikacija za implantološku terapiju koju su opisali Wang i Hwang 2006. godine<sup>243</sup>, a koja uključuje: nedavni infarkt miokarda i moždani udar, operaciju mitralnoga zaliska, imunosupresivnu terapiju, koagulacijske poremećaje, trenutno liječenje maligne bolesti, zlouporabu droga, psihijatrijsku bolest ili intravenoznu upotrebu bisfosfonata; 2) ispitanici koji imaju neke od sistemskih bolesti kao što su: osteoporoza, osteopenija, nekontrolirani dijabetes, deficijencija vitamina D, terapija bisfosfonatima, terapija glukokortikoidima, hipotireoza, nekontrolirane kardiovaskularne bolesti (hipertenzija, koronarna bolest srca, kongestivno zatajenje srca) kao i lokalni faktori: uživanje duhanskih proizvoda (više od 10 cigareta dnevno),

loša oralna higijena; 3) pacijenti s neliječenim parodontitisom, pacijenti s akutnom odontogenom infekcijom, periapikalnom lezijom i pacijenti koji su prethodno primili NKMB na ekstrakcijskom mjestu. Također, nisu uključivane trudnice ni žene u razdoblju laktacije. Ova studija odobrena je od strane Etičkoga povjerenstva Doma zdravlja Osječko-baranjske županije (odobrenje broj: 03 – 1897/20). Svi pacijenti tretirani su u potpunom skladu s etičkim načelima, uključujući Deklaraciju Svjetskoga medicinskog udruženja iz Helsinkija <sup>244</sup>.

### **3.2.1. 1. faza**

Prije početka zahvata napravljene su rendgenske snimke (**Slika 6**) i CBCT (**Slika 7**) na mjestima planirane ekstrakcije zuba. Pacijentima koji su zadovoljili uključne kriterije ordiniran je antibiotik (Amoxicilin 500 mg, Belupo, Koprivnica ili Klindamicin-MIP 600 mg, Chem.-pharm. Fabrik GmbH, Ingbert, Njemačka, u slučaju alergije na penicilinsku skupinu antibiotika) sat vremena prije zahvata i administrirana je lokalna anestezija s 4 % artikaina i adrenalinom 1:100 000 (Ubistesin forte®, 3M Deutschland GmbH, Neuss, Njemačka). Nakon odabira zuba na kojemu su iskorištene sve prethodne terapijske mogućnosti, pristupilo se ekstrakciji (**Slika 8 i 9**). Ekstrakcija zuba izvođena je pomoću seta za atraumatsku ekstrakciju. Pacijenti suglasni da sudjeluju u studiji randomizirani su u dvije skupine. Prvu skupinu činili su pacijenti koji su primili ispitivani NKBM, a drugu oni koji su primili alternativu zlatnom standardu, tj. goveđi ksenograft. U randomizaciji ispitanika korišteno je javno dostupno internetsko sučelje (<https://www.randomizer.org/> (Urbaniak, G. C., & Plous, S. (2013)). Nakon ekstrakcije zuba prikazani su defekti kosti (**Slika 10 i 11**). U kontrolnoj skupini alveola je punjena anorganskom goveđom kosti (**Slika 12**), a u ispitivanoj se skupini alveola punila injekcijskim bifaznim kalcijevim fosfatom (**Slika 13**). Konačno, u obje se skupine, nakon punjenja defekta, kolagena resorptivna membrana (Jason®, bottis biomaterials, Njemačka) adaptirala na mjestu kirurške rane (**Slika 14 i 15**) i mukoperiostalni režanj je zatvoren 5.0 monofilamentnim neresorptivnim šavovima (Sofsilik™, Covidien, Dublin, Irska) (**Slika 16 i 17**). Pacijentu je ordiniran analgetik (Ibuprofen 600 mg, Belupo, Koprivnica ili Paracetamol 500 mg, Lek Pharmaceuticals d.d., Ljubljana, Slovenija, kod alergije na Ibuprofen). Pacijent je nastavio uzimati preostalu dozu antibiotika kroz sljedećih 7 dana i 0,2 %-tnu otopinu klorheksidina (Curasept ADS® 220, Saronno, Italija) za postoperativnu njegu usne šupljine. Uputilo ga se na kontrolne preglede prvi, treći i deseti dan nakon zahvata. Tjedan dana nakon augmentacije pacijent je upućen na radiološku pretragu augmentiranoga područja kompjuteriziranom tomografijom koničnom zrakom (CBCT), kako bi se provjerila stabilnost NKBM-a na mjestu augmentacije. Slijedilo je razdoblje regeneracije od šest mjeseci. U tome



razdoblju pacijent je pozivan na kontrolne preglede prvi i drugi mjesec nakon zahvata te neposredno prije šestoga mjeseca, kako bi se napravila kontrolna CBCT snimka na kojoj su izmjerene dimenzije alveolarnog grebena na mjestu postave implantata. Neposredno nakon toga dogovorena je druga faza studije, odnosno biopsija alveolarne kosti s konačnom ugradnjom dentalnog implantata.



**Slika 6.** RTG snimka zuba 13.



**Slika 7.** CBCT snimka zuba 25.



**Slika 8.** Intraoralna snimka zuba 13.



**Slika 9.** Intraoralna snimka zuba 25.



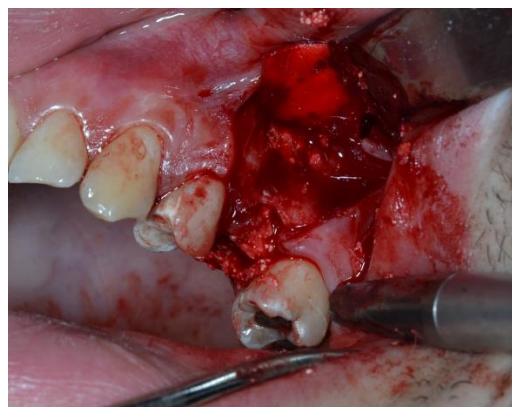
**Slika 10.** Defekt kosti i alveola nakon ekstrakcije zuba 13.



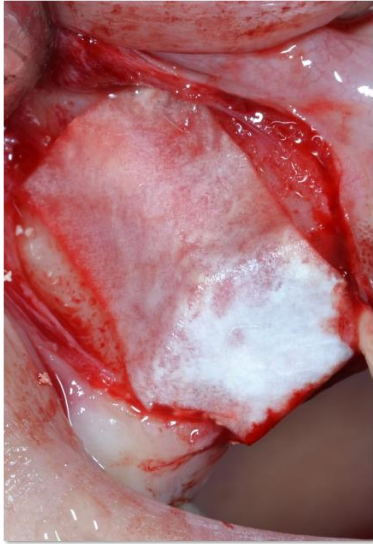
**Slika 11.** Defekt kosti i alveola nakon ekstrakcije zuba 25.



**Slika 12.** Kontrolna skupina i popunjavanje alveole anorganskom goveđom kosti.



**Slika 13.** Ispitivana skupina i popunjavanje alveole injekcijskim bifaznim kalcijevim fosfatom.



**Slika 14.** Adaptacija kolagene membrane na području zuba 13.



**Slika 15.** Adaptacija kolagene resorptivne membrane na području zuba 25.



**Slika 17.** Zašivena rana nakon augmentacije u području zuba 13.



**Slika 18.** Zašivena rana nakon augmentacije u području zuba 25.

### **3.2.2. 2. faza**

Nakon perioda cijeljenja u trajanju od šest mjeseci pristupilo se drugoj fazi oralnokirurškoga zahvata, odnosno ugradnji dentalnog implantata (Ankylos, Denstply Sirona Implants, Mannheim, Njemačka). Pri lokalnoj anesteziji, nakon incizije i odizanja režnja pune debljine sluznice, prikazao se alveolarni greben. Trepanacijsko svrdlo (Komet Dental, Gebr. Brasseler GmbH & Co. KG, Lemgo, Njemačka) kojime je uzet uzorak za biopsiju kosti imalo je manji unutarnji promjer (2,5 mm) u odnosu na finalno svrdlo iz standardiziranoga seta za oblikovanje i pripremu ležišta dentalnog implantata. S etičkoga gledišta time se izbjeglo prekomjerno uklanjanje zdrave kosti. Koštani uzorak za biopsiju potom je ostavljen u 4 %-tnoj otopini formaldehida (BioGnost Ltd., Zagreb, Hrvatska) i potom su uzorci proslijeđeni u laboratorij na histološku i imunohistokemijsku analizu.

### **3.2.3. Kvalitativna analiza histoloških uzoraka biopsije kosti**

Uzroci za histološku analizu uzeti biopsijom nakon šest mjeseci cijeljenja proslijeđeni su u histološki laboratorij tvrtke botiss u Berlinu, Njemačka. Na uzrocima je primijenjen standardizirani protokol histološke obrade mineraliziranih koštanih uzoraka koji uključuje: fiksiranje u 4 %-tnoj otopini formaldehida (BioGnost Ltd., Zagreb, Hrvatska), dehidraciju u rastućim koncentracijama alkohola (75 %, 85 %, 95 % te naposljetku 100 %), dekalifikaciju etildiamintetraoctenom kiselinom (EDTA, Osteomoll®, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) u trajanju od dva tjedna te potom posvjetljivanje, uklapanje u parafinske blokove i rezanje. Šest kontinuiranih rezova debljine 5µm napravilo se na mikrotomu (SLEE, Mainz, Njemačka) te se potom nakon sušenja, postavilo na predmetna stakalca. Prije bojenja bilo je potrebno rehidrirati tkivo uranjanjem u ksilen (BioGnost Ltd., Zagreb, Hrvatska) dva puta po 15 minuta, potom u padajući niz alkohola (100 %, 95 %, 85 % te naposljetku 75 %) i na kraju u destiliranu vodu. Potom je, pomoću setova za histološka bojenja, tkivo obojeno hemalaun-eozinom (HE) te trikromnim setom za bojenje po Massonu i pentakromnim bojenjem po Movat - Rusellu. Naposljetku, uslijedila je ponovna dehidracija u rastućem nizu alkohola (75 %, 85 %, 95 % te naposljetku 100 %). Na svjetlosnom mikroskopu (Leica DMRB, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Njemačka) sa spojenom videokamerom (Axio Imager M2, Zeiss, Oberkochen, Njemačka) snimljene su digitalne mikrofotografije pod povećanjem od 100, 200 i 400 puta. Kvalitativna analiza napravljena je na Fakultetu za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek. U kvalitativnoj analizi procijenjen je patohistološki odgovor tkiva domaćina na korišteni NKBM, odnosno opisani su osteoblasti, osteociti, fibroblasti, fibrociti, krvne žile i stanice monocitno-makrofagnoga sustava.

### **3.2.4. Kvantitativna analiza histoloških uzoraka biopsije kosti**

Kvantitativna histološka analiza koštanih bioptata uzetih nakon šest mjeseci cijeljenja napravljena je na istim uzorcima prethodno pripremljenima za patohistološku analizu. Digitalne mikrofotografije pohranjene su u nekomprimiranom formatu koji se koristi za pohranu slika visoke rezolucije do trenutka analize. Digitalne mikrofotografije učitane su u besplatni računalni program ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, SAD), namijenjen za kvantitativnu analizu histoloških uzoraka. Sve mikrofotografije snimljene su pod istim uvjetima (povećanje od 100, 200 i 400 puta, format PNG). Prije početka analize određeni su parametri kao što je postavljanje skale na temelju poznate udaljenosti i pretvorbe u jedinicu duljine ( $\mu\text{m}$ ). Također, postavljena je mogućnost ručne korekcije, kako bi se iz analize isključili svi rubni dijelovi koji nisu u potpunosti jasni ili predstavljaju artefakt. Pojedinačno je analiziran svaki uzorak na način da se digitalna mikrofotografija podesila pomoću opcije postavljanja praga (engl. *thresholding*) pri kojemu je ručnom manipulacijom dozvoljeno označavanje regije od interesa (engl. *regions of interests*, ROI) obojene različitim bojama. U obzir su uzeta 3 vidna polja svakog uzorka nakon kojeg se odredio prosjek dobivenih vrijednosti. Prema tome su određene površine novostvorene kosti, zaostatnoga NKBM-a i mekotkivnih struktura s obzirom na ukupnu površinu histološkoga preparata u vidnom polju, a nakon obrade svih rezultata dobivene površine pretvorene su u volumne postotke (%). Svi preparati bili su dodatno pregledani od strane dva nezavisna istraživača.

### **3.2.5. Imunohistokemijska analiza uzoraka biopsije kosti**

Imunohistokemija je tehnika koja predstavlja specifično vezanje između protutijela i antigena, a služi za otkrivanje i lokalizaciju specifičnih proteina u stanicama i tkivu pomoću imunoloških i kemijskih reakcija. Kao specifična dijagnostička metoda ima veliku ulogu i široku primjenu u detekciji i klasifikaciji različitih bolesti i patoloških stanja. Na četiri histološka uzorka biopsije kosti napravljena je imunohistokemijska analiza pri laboratoriju Zavoda za anatomiju Medicinskoga fakulteta u Rijeci u svrhu detekcije transkripcijskoga faktora *Osx* i proteina BMP-2 koji ima ulogu u osteogenoj diferencijaciji mezenhimnih stanica. Uzorci koštanoga tkiva debljine 5  $\mu\text{m}$  deparafinizirani su u ksilenu (BioGnost Ltd., Zagreb, Hrvatska) i potom rehidrirani u alkoholu opadajućih koncentracija (100 %, 95 %, 85 % te naposljetku 75 %). Sljedeći je korak renaturacija proteina koja se postiže inkubacijom rezova u citratnom puferu (10 mM natrijev citrat, 0,05 % Tween 20, pH 6.0) 10 minuta u vodenoj kupelji na 90°. Nakon hlađenja uzorci su isprani u fiziološkoj otopini koja je puferirana s fosfatnim puferom (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) čiji je pH iznosio 7.2. Blokada endogene aktivnosti

peroksidaze kako bi se izbjeglo nespecifično vezanje provedena je s 0,3 %-tnim vodikovim peroksidom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Njemačka) nakon čega je uslijedilo ispiranje u PBS-u od 10 min za detekciju antigena. Uzorci su preko noći inkubirani zečjim poliklonskim Anti-Sp7/Osterix protutijelom (ab229258, Abcam, Cambridge, Velika Britanija) i zečjim poliklonskim Anti-BMP-2 protutijelom (ab14933, Abcam, Cambridge, Velika Britanija) razrijeđenim 1:200 na 4° prema uputama proizvođača. Pojednosti o protutijelima i protokoli inkubacije navedeni su u **Tablici 1**. Nakon toga je slijedilo ispiranje i inkubacija sa sekundarnim protutijelom u trajanju od 45 minuta na sobnoj temperaturi. Streptavidin konjugiran s peroksidazom (LSAB + Kit, DakoCytomation, Glostrup, Danska) i 3,3'-diaminobenzidin (DAB, DakoCytomation, Glostrup, Danska) su zatim dodani za vizualizaciju. Uzorci su nakon toga isprani destiliranom vodom, filtrirani i bojeni hemalun-eozinom po standardnom protokolu koji je ranije spomenut. Predmetna stakalca su uklopljena u medij (Biomount, Biognost, Zagreb, Hrvatska) i analizirana na svjetlosnom mikroskopu (Olympus, Tokyo, Japan) na kojega je postavljen digitalni fotoaparat (Sony, Tokyo, Japan). Imunohistokemijski nalazi s razinom ekspresije (Osx i BMP-2) semikvantitativno su procijenjeni od strane iskusnoga patologa koji je prema jačini obojenosti dodijelio razine od 0 – 3 „pluseva“ na način: 0 = negativno; 1 = slabo obojenje (+); 2 = umjereno obojenje (++) ; 3 = jako obojenje (+++). Svi preparati bili su dodatno pregledani od strane dva nezavisna istraživača. Statistička analiza nije provedena za imunohistokemijsku analizu uzoraka biopsije kosti zbog male količine analiziranih uzoraka.

**Tablica 1.** Protutijela korištena za imunohistokemijsku analizu

<b>Protutijelo</b>	<b>Izotip</b>	<b>Proizvođač</b>	<b>Inkubacija</b>
Anti-Sp7/ Osx	Zečje poliklonsko	Abcam, Cambridge, Velika Britanija	1:200, preko noći, 4°
Anti-BMP-2	Zečje poliklonsko	Abcam, Cambridge, Velika Britanija	1:200, preko noći, 4°

### **3.3. Statističke metode**

Za statističku analizu koristio se program IBM SPSS statistika (inačica 24, IBM Corporation, NY, SAD). Normalnost distribucije ispitala se Shapiro-Wilkovim testom. Svi rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti. Pri normalnoj distribuciji, za određivanje značajnosti razlike između dva uzorka koristio se t-test. Sve P vrijednosti manje od 0,05 smatrale su se značajnima.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Demografski podaci

U ovome istraživanju sudjelovalo je 38 ispitanika, od kojih je 17 bilo muških (45 %), a 21 (55 %) ženskih, raspoređenih u dvije skupine – ispitivanu i kontrolnu. Prosječna dob ispitanika iznosi  $35.03 \pm 9.16$ , (žene =  $36.67 \pm 6.39$ ; muškarci =  $33.00 \pm 11.61$ ). Ne postoji statistički značajna razlika među skupinama s obzirom na dob i spol. Skraćeni prikaz karakteristika samoga uzorka nalazi se u **Tablici 2**.

**Tablica 2.** Usporedba ispitivane i kontrolne skupine po prosječnoj dobi za muškarce i žene i najniža i najviša dob po skupini

	<b>Muškarci</b> (N = 17)	<b>Žene</b> (N = 21)	<b>Min</b>	<b>Max</b>
<b>Kontrolna</b> (N = 19)	$33.54 \pm 10.08$	$35.58 \pm 7.48$	22	52
<b>Ispitivana</b> (N = 19)	$32.60 \pm 13,10$	$38.11 \pm 4.60$	20	56
<b>Ukupno</b> (N = 38)	$33.00 \pm 11.61$	$36.67 \pm 6.39$		
<b>Min</b>	20	25		
<b>Max</b>	56	50		
<b>P*</b>	0.872	0.383		

\*značajni na 5 % (P < 0,05)

U ovome istraživanju ekstrahirano je ukupno 38 zubi, od toga 12 premolara, 15 molara, 7 inciziva i 4 očnjaka. Skraćeni prikaz ekstrahiranih zubi prikazan je u **Tablici 3**.



**Tablica 3.** Usporedba kontrolne i ispitivane skupine po broju ekstrahiranih zubi

	<b>Premolar</b>	<b>Molar</b>	<b>Inciziv</b>	<b>Očnjak</b>
<b>Kontrolna</b> <b>(N = 19)</b>	6	8	3	2
<b>Ispitivana</b> <b>(N = 19)</b>	6	7	4	2
<b>Ukupno</b> <b>(N = 38)</b>	12	15	7	4

U gornjoj čeljusti (maksili) ekstrahirano je 20 zubi (11 u kontrolnoj; 9 u ispitivanoj), dok je u donjoj čeljusti (mandibuli) ekstrahirano 18 zubi (8 u kontrolnoj; 10 u ispitivanoj). Skraćeni prikaz ekstrahiranih zubi po skupinama prikazan je u **Tablici 4** i **Tablici 5**.

**Tablica 4.** Usporedba ispitivane i kontrolne skupine po čeljusti

	<b>Maksila</b>	<b>Mandibula</b>
<b>Kontrolna</b> <b>(N = 19)</b>	11	8
<b>Ispitivana</b> <b>(N = 19)</b>	9	10
<b>Ukupno</b> <b>(N = 38)</b>	20	18

**Tablica 5.** Raspodjela ekstrakcijskih područja po skupinama (kontrolna i ispitivana)

	<b>Premolar</b>	<b>Molar</b>	<b>Inciziv</b>	<b>Očnjak</b>
<b>Maksila<sup>1</sup></b>	6	3	1	1
<b>Maksila<sup>2</sup></b>	3	2	2	2
<b>Mandibula<sup>1</sup></b>	0	5	2	1
<b>Mandibula<sup>2</sup></b>	3	5	2	0

<sup>1</sup> kontrolna, <sup>2</sup> ispitivana

Kod muških ispitanika ekstrahirano je ukupno 15 zubi, dok je kod ženskih ispitanika ekstrahirano ukupno 23 zuba. Usporedba ekstrahiranih zubi po spolu prikazana je u **Tablici 6.**

**Tablica 6.** Usporedba ekstrahiranih zubi po spolu

	<b>Premolar</b>	<b>Molar</b>	<b>Inciziv</b>	<b>Očnjak</b>
<b>Muškarci</b> <b>(N = 17)</b>	7	5	2	3
<b>Žene</b> <b>(N = 21)</b>	7	10	5	1
<b>Ukupno</b> <b>(N = 38)</b>	14	15	7	4

## 4.2. Površine histoloških struktura kontrolne i ispitivane skupine

Kvantitativnom analizom određene su površine novostvorene kosti, zaostatnoga NKBM-a i mekotkivnih struktura s obzirom na ukupnu površinu histološkoga preparata u vidnom polju, a nakon obrade svih rezultata dobivene površine pretvorene su u volumne postotke (%). Prikaz minimalnih i maksimalnih vrijednosti novostvorene kosti, zaostatnoga biomaterijala i mekoga tkiva izraženih u postocima nalazi se u **Tablici 7**.

**Tablica 7.** Minimalne i maksimalne vrijednosti novostvorene kosti, zaostatnoga biomaterijala i mekoga tkiva između kontrolne i ispitivane skupine izraženo u postocima

	Novostvorena kost		Biomaterijal		Meko tkivo	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max
<b>Kontrolna (N = 19)</b>	15.05 %	68.61 %	7.58 %	65.62 %	12.76 %	38.86 %
<b>Ispitivana (N = 19)</b>	24.70 %	51.77 %	4.66 %	50.04 %	19.24 %	55.00 %

### 4.2.1. Udjeli novostvorene kosti, zaostatnoga biomaterijala i mekoga tkiva

Specifični ciljevi ovoga istraživanja u svrhu kvantitativne analize bili su:

1. Izračunati postotak novostvorene kosti na koštanim bioptatima šest mjeseci nakon augmentacije;
2. Izračunati postotak zaostatnoga biomaterijala na koštanim bioptatima šest mjeseci nakon augmentacije;
3. Izračunati postotak mekotkivnih struktura na koštanim bioptatima šest mjeseci nakon augmentacije.

Prije toga ispitale su se sve varijable u kontrolnoj i ispitivanoj skupini te prikazale zadovoljavaju li postavke normalne distribucije.

## **4.2.2. Distribucija kontrolnih i ispitivanih skupina**

### **4.2.2.1. Q-Q graf normalnosti prema kontrolnoj i ispitivanoj skupini**

Prema prikazu Q-Q grafova, tj. slikovnih prikaza normalnosti po varijablama, vidi se da sve varijable u kontrolnoj i ispitivanoj skupini zadovoljavaju postavke normalne distribucije („točkice“ se nalaze što bliže crti). Također, ekstremni slučajevi koji postoje u ovom uzorku nisu statistički značajni, što znači da, iako su prisutni, njihova vrijednost nije toliko problematična da ih je potrebno izbaciti. Testiranje linarnosti Q-Q grafovima između skupina prikazano je na **Slici 19**.

**Slika 19.** Usporedba kontrolne i ispitivane skupine, testiranje linearnosti Q-Q grafovima

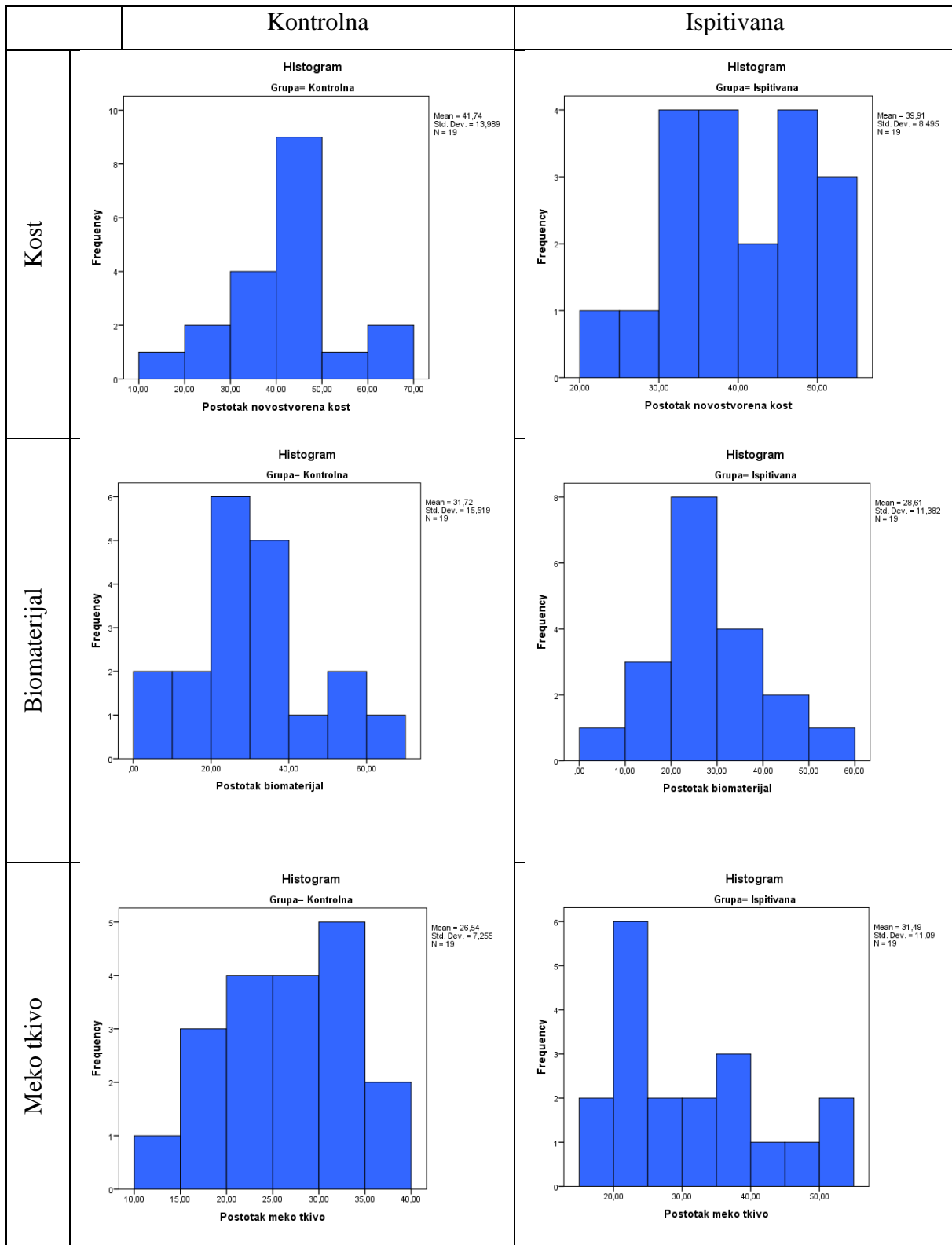
	Kontrolna*	Ispitivana*
Kost	<p>Normal Q-Q Plot of Postotak novostvorena kost</p> <p>Grupa= Kontrolna</p>	<p>Normal Q-Q Plot of Postotak novostvorena kost</p> <p>Grupa= Ispitivana</p>
Biomaterijal	<p>Normal Q-Q Plot of Postotak biomaterijal</p> <p>Grupa= Kontrolna</p>	<p>Normal Q-Q Plot of Postotak biomaterijal</p> <p>Grupa= Ispitivana</p>
Meko tkivo	<p>Normal Q-Q Plot of Postotak meko tkivo</p> <p>Grupa= Kontrolna</p>	<p>Normal Q-Q Plot of Postotak meko tkivo</p> <p>Grupa= Ispitivana</p>

\* Primjenom SW testa potvrđena je normalnost distribucije između skupina

#### 4.2.2.2. Histogram frekvencija kontrolne i ispitivane skupine

Histogram frekvencija služi za prikazivanje numeričkih podataka. Prije izrade histograma potrebno je grupirati podatke u intervale te izraditi tablicu frekvencija grupiranih podataka. Histogram se crta u koordinatnom sustavu tako da se stupci postavljaju nad odgovarajućim intervalima. Visina stupca odgovara frekvenciji intervala. Histogrami frekvencija pokazuju zastupljenost pojedinih rezultata po grupama. Pregledom histograma vidi se kako ne postoji normalna distribucija rezultata u svim skupinama, kao što je vidljivo na **Slici 20**. Kako bi se utvrdilo mogu li se koristiti parametrijski testovi, važno je koristiti i druge metode za testiranje parametrijskih testova. Prilikom testiranja normalnosti distribucije primarno se koristio Shapiro-Wilkov test i analiza Q-Q grafova<sup>245</sup>. Ono čemu se teži kod Shapiro-Wilkovoga testa je njegova neznačajnost. Dakle, da se njegova značajnost kreće ispod 0.05. Kako je vidljivo na **Slici 20**, sve vrijednosti su neznačajne, što znači da je zadovoljen uvjet za korištenje parametrijskih testova za kontrolnu i ispitivanu skupinu. Pregledom drugih testova za testiranje normalnosti distribucije, zaključuje se kako se ipak radi o uzorku normalne distribucije. Razlog „iskrivljenosti“ grafova vjerojatno leži u veličini uzorka. Kada bi se prikupio veći uzorak (~150 sudionika), tada bi i grafovi počeli pokazivati normalnu distribuciju.

**Slika 20.** Usporedba histograma frekvencija kontrolne i ispitivane skupine po varijablama (kost, zaostatni biomaterijal, meko tkivo)



\* Primjenom SW testa potvrđena je normalnost distribucije između skupina

### 4.2.2.3. Normalnost distribucije kontrolne i ispitivane skupine

#### Usporedba ispitivane i kontrolne skupine

S obzirom na to da je zadovoljen uvjet za provođenje parametrijskih testova, za usporedbu malih uzoraka korišten je t-test. T-testom su uspoređivane svaka varijabla zasebno, tj. novostvorena kost, zaostatni biomaterijal i meko tkivo izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti, kao što je prikazano u **Tablici 8**.

**Tablica 8.** Usporedba ispitivane i kontrolne grupe po varijablama izraženo u postocima

	<b>Kost</b> <b>(N = 38)</b>	<b>Biomaterijal</b> <b>(N = 38)</b>	<b>Meko tkivo</b> <b>(N = 38)</b>
<b>Kontrolna</b> <b>(N = 19)</b>	41.73 $\pm$ 13.99 %	31.72 $\pm$ 15.52 %	26.54 $\pm$ 7.25 %
<b>Ispitivana</b> <b>(N = 19)</b>	39.91 $\pm$ 8.49 %	28.61 $\pm$ 11.38 %	31.49 $\pm$ 11.09 %
<b>P*</b>	P = 0.629	P = 0.485	P = 0.113

\*t-test za nezavisne uzorke, značajni na 5 % (P < 0,05)

Kao što je vidljivo iz vrijednosti t-testova, ne postoji statistički značajna razlika između ispitivane i kontrolne grupe po pitanju novostvorene kosti, zaostatnoga biomaterijala i mekoga tkiva.



### 4.3. Patohistološki odgovor tkiva kontrolne i ispitivane skupine

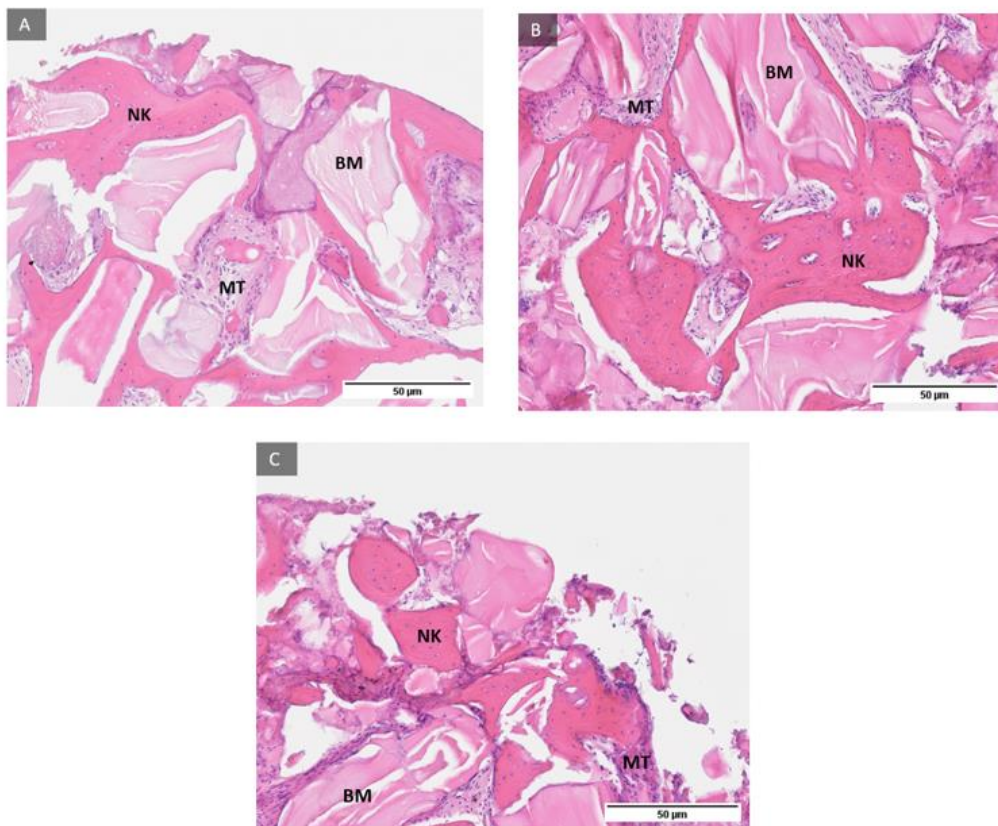
U kvalitativnoj analizi procijenio se patohistološki odgovor tkiva domaćina na korišteni NKBM, odnosno opisani su osteoblasti, osteociti, fibroblasti, fibrociti, krvne žile i stanice monocitno-makrofagnoga sustava. Uz to, opisana je novostvorena kost, zaostatni biomaterijal i meko tkivo.

Specifični cilj ovoga istraživanja u svrhu kvalitativne analize bio je:

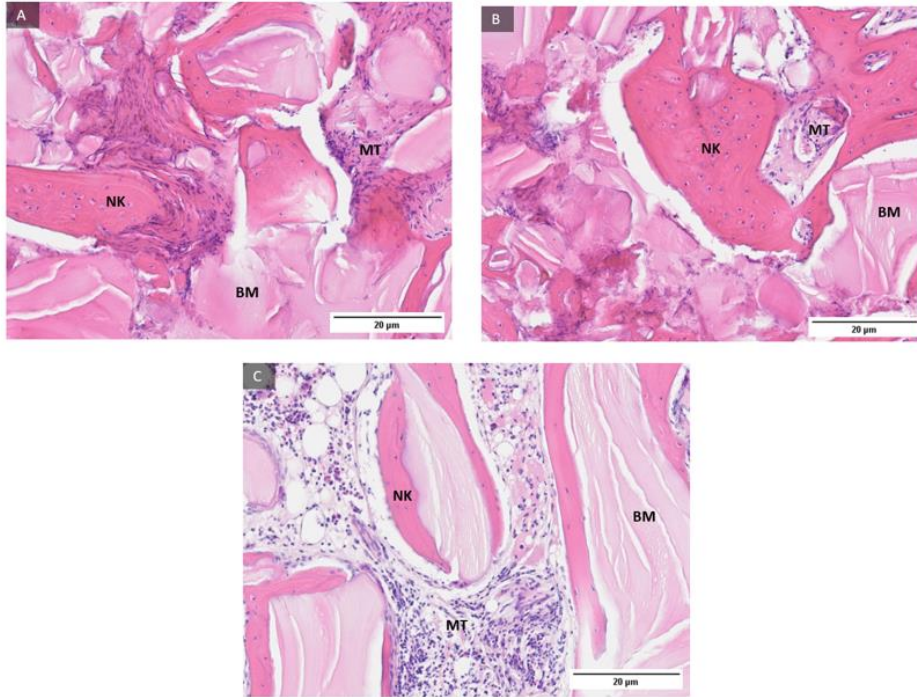
1. Kvalitativno procijeniti sposobnost NKBM-a u obnavljanju oštećenoga tkiva i opisati patohistološke promjene na koštanim biopstatima šest mjeseci nakon augmentacije.

#### 4.3.1. Hemalaun-eozin histološko bojenje kontrolne i ispitivane skupine

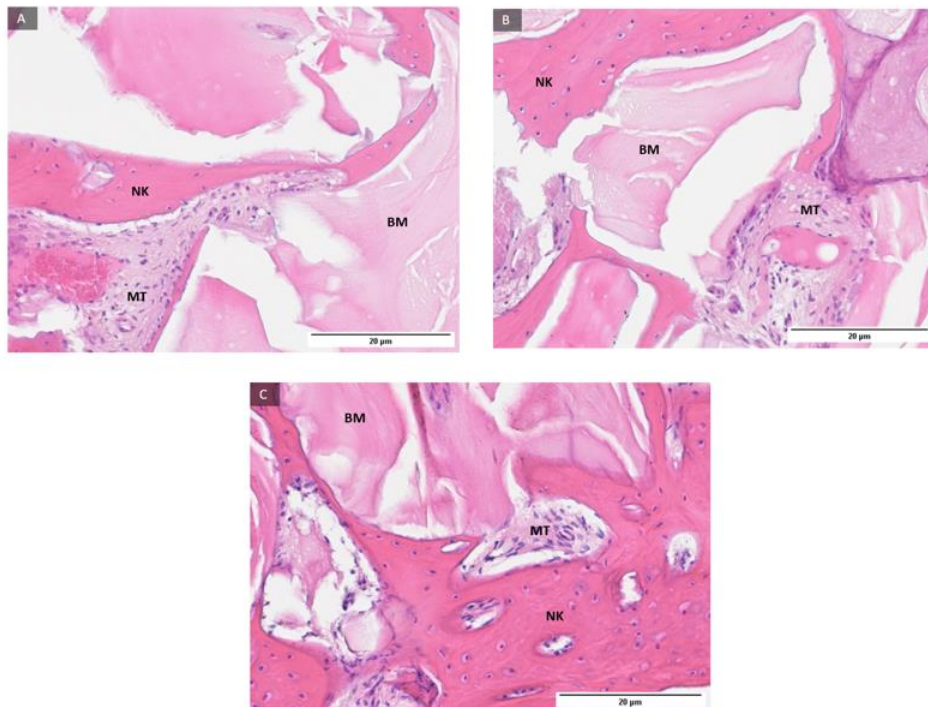
Reprezentativni uzorci kontrolne skupine i histološkoga bojenja hemalaun-eozinom pod povećanjem od 100 (Slika 21), 200 (Slika 22) i 400 puta (Slika 23) i označeni novostvorena kost, zaostatni biomaterijal i meko tkivo.



**Slika 21.** Primjeri preparata kontrolne skupine (A, B, C) s označenom novostvorenom kosti (NK), zaostatnim biomaterijalom (BM) i mekim tkivom (MT). HE, 100 X

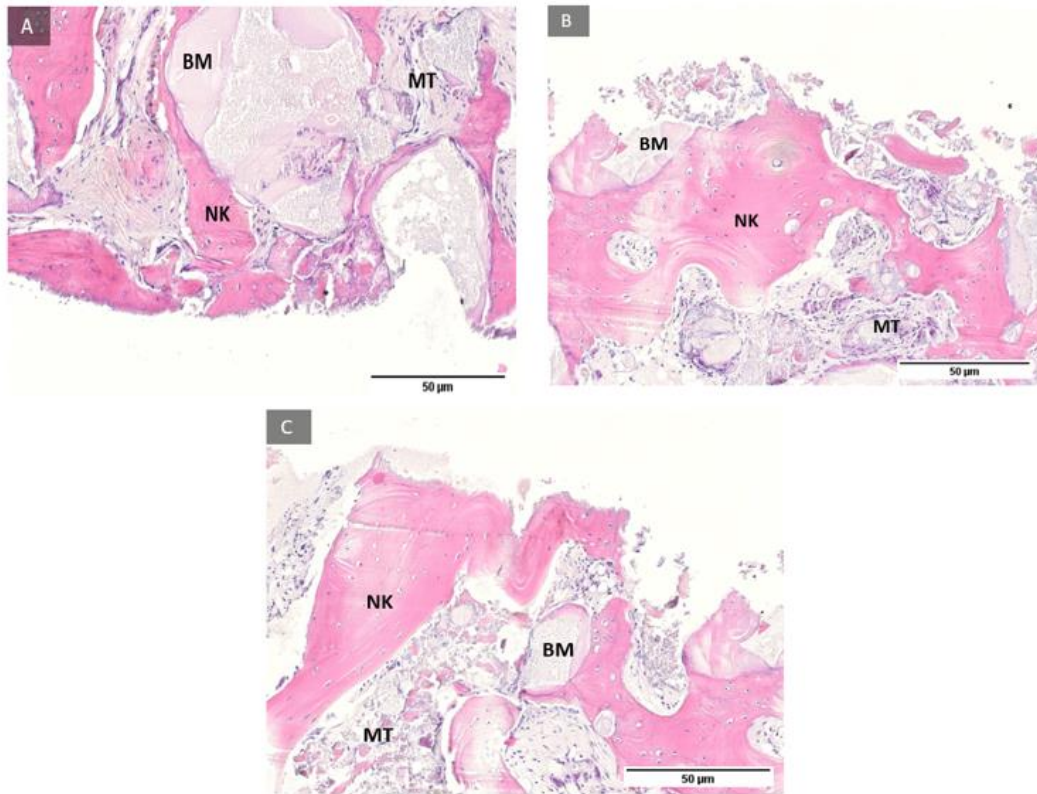


**Slika 22.** Primjeri preparata kontrolne skupine (A, B, C) s označenom novostvorenom kosti (NK), zaostatnim biomaterijalom (BM) i mekim tkivom (MT). HE, 200 X

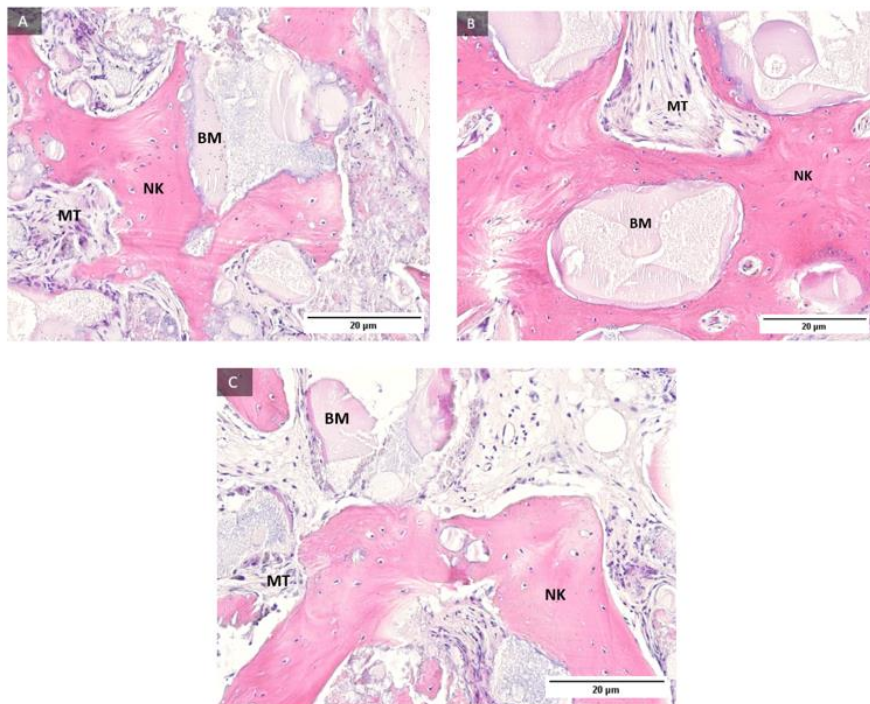


**Slika 23.** Primjeri preparata kontrolne skupine (A, B, C) s označenom novostvorenom kosti (NK), zaostatnim biomaterijalom (BM) i mekim tkivom (MT). HE, 400 X

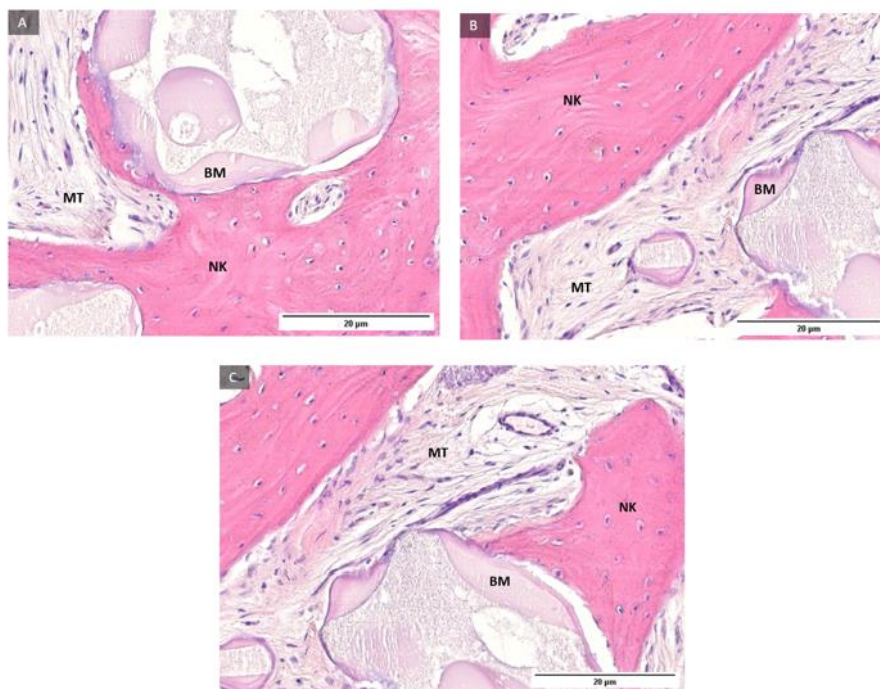
Reprezentativni uzorci ispitivane skupine i histološkoga bojenja hemalaun-eozinom pod povećanjem 100 (Slika 24), 200 (Slika 25) i 400 puta (Slika 26) i označene novostvorena kost, zaostatni biomaterijal i meko tkivo.



**Slika 24.** Primjeri preparata ispitivane skupine (A, B, C) s označenom novostvorenom kosti (NK), zaostatnim biomaterijalom (BM) i mekim tkivom (MT). HE, 100 X

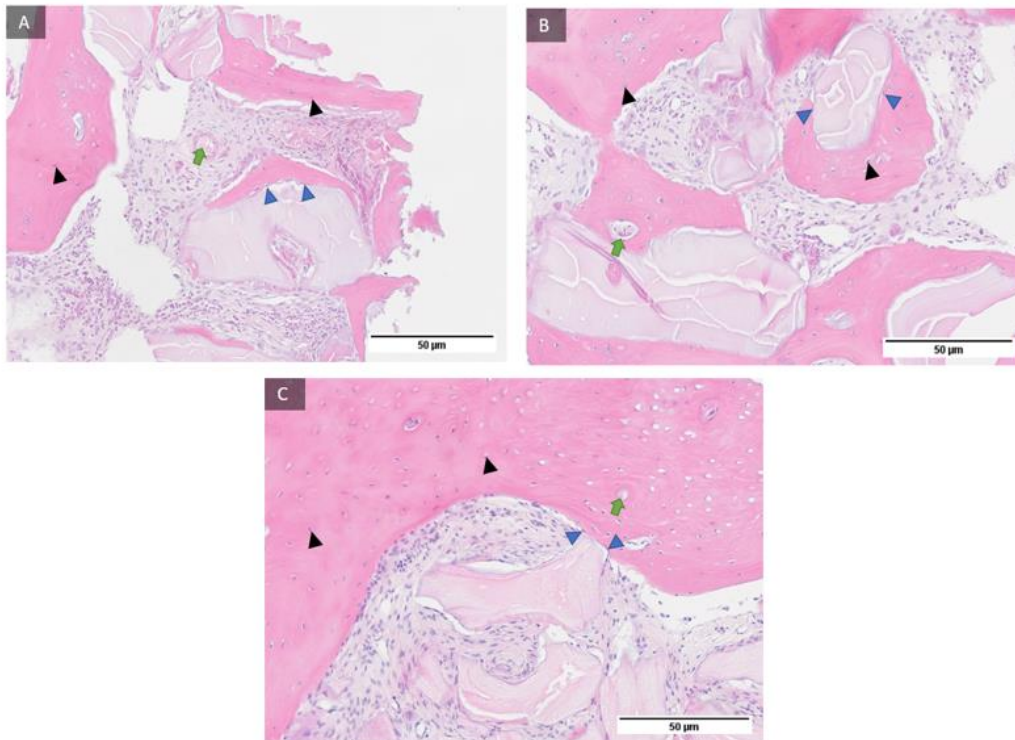


**Slika 25.** Primjeri preparata ispitivane skupine (A, B, C) s označenom novostvorenom kosti (NK), zaostatnim biomaterijalom (BM) i mekim tkivom (MT). HE, 200 X

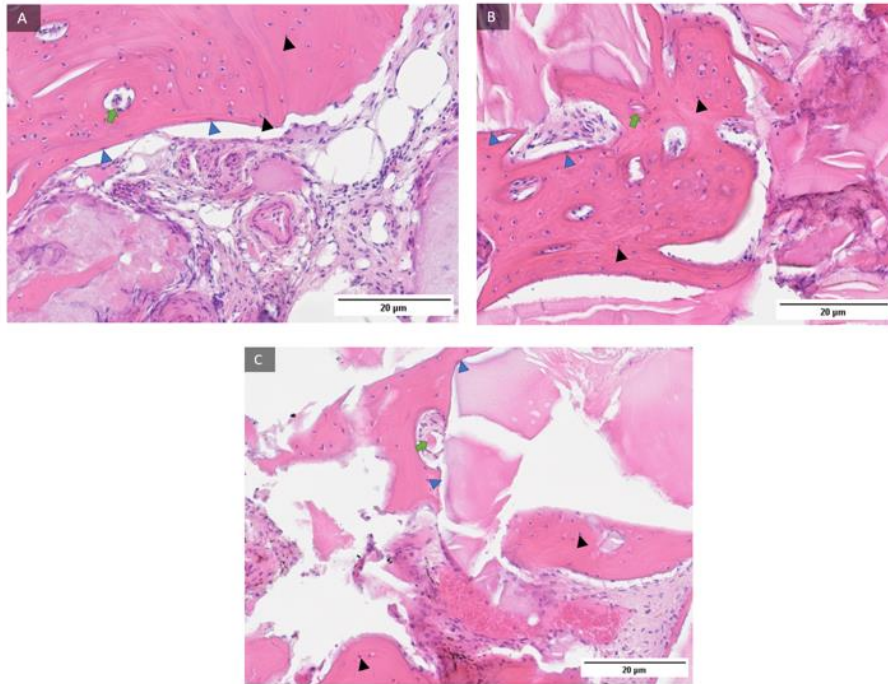


**Slika 26.** Primjeri preparata ispitivane skupine (A, B, C) s označenom novostvorenom kosti (NK), zaostatnim biomaterijalom (BM) i mekim tkivom (MT). HE, 400 X

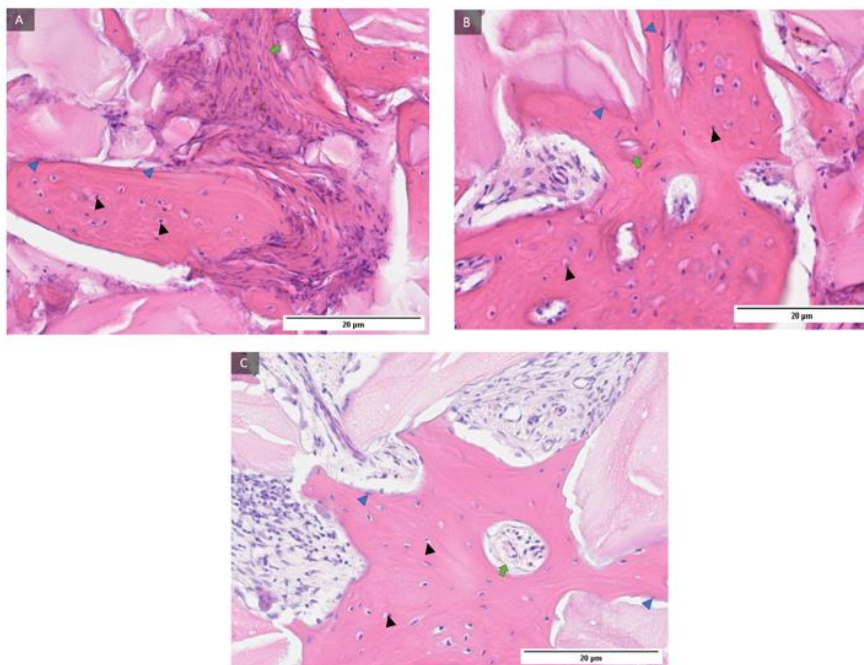
Reprezentativni uzorci kontrolne skupine i histološkoga bojenja hemalaun-eozinom pod povećanjem 100 (Slika 27), 200 (Slika 28) i 400 puta (Slika 29) i označeni osteoblasti na granici s novostvorenom kosti i zaostatnim biomaterijalom, osteociti u novostvorenoj kosti i Howshipova lakuna u koštanoj gredici s krvnom žilom koja upućuje na integraciju biomaterijala i novostvorene kosti.



**Slika 27.** Primjeri preparata kontrolne skupine (A, B, C) s označenim osteoblastima (plavo ispunjen trokut), osteocitima (crno ispunjen trokut) i Howshipova lakuna u koštanoj gredici s krvnom žilom (zelena strelica). HE, 100 X

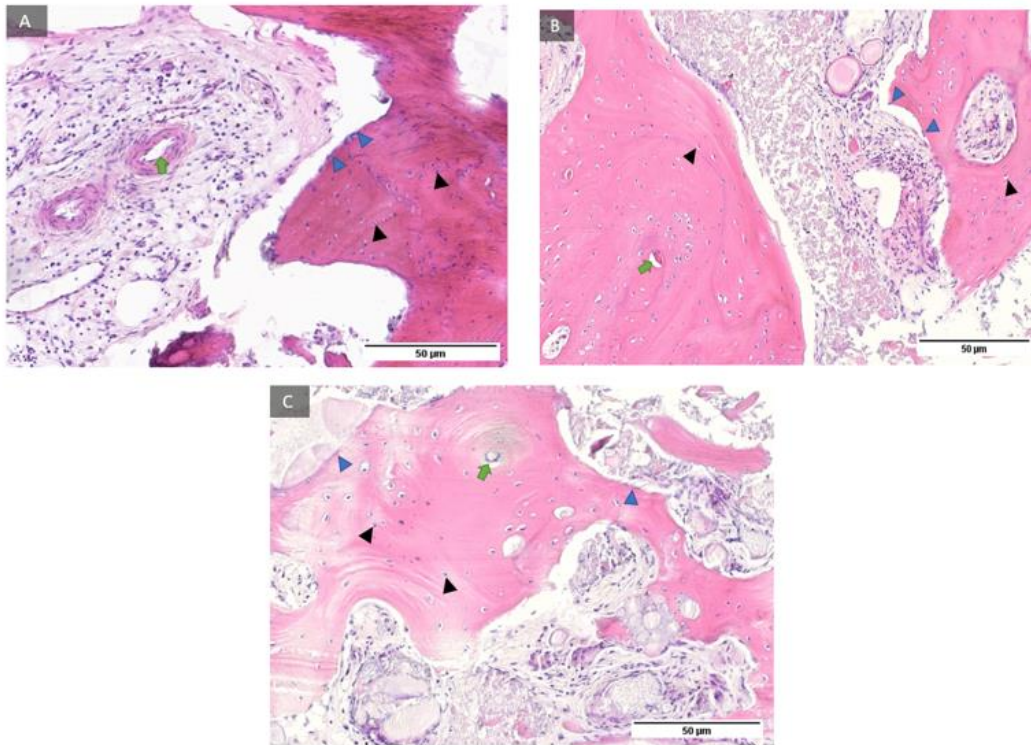


**Slika 28.** Primjeri preparata kontrolne skupine (A, B ,C) s označenim osteoblastima (plavo ispunjen trokut), osteocitima (crno ispunjen trokut) i Howshipova lakuna u koštanoj gredici s krvnom žilom (zeleni strelica). HE, 200 X

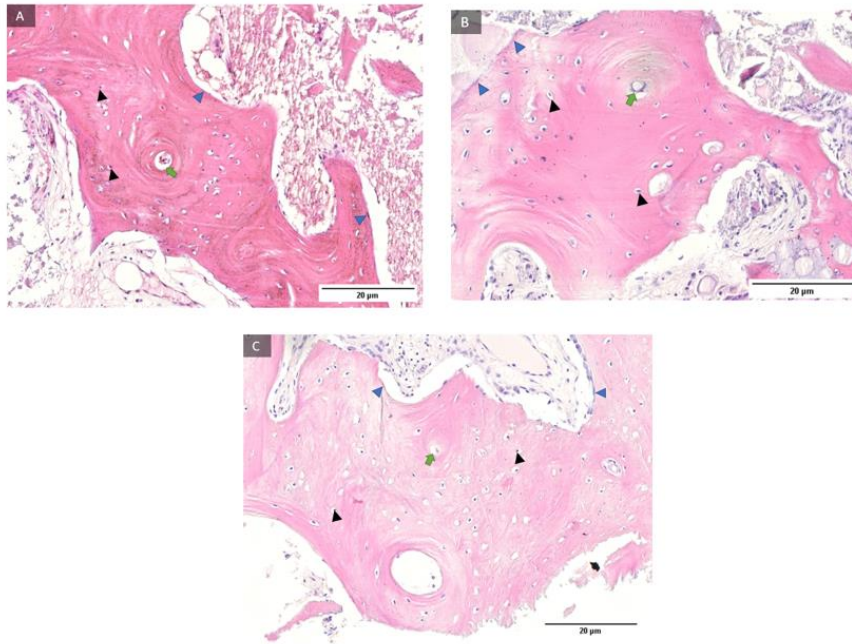


**Slika 29.** Primjeri preparata kontrolne skupine (A, B, C) s označenim osteoblastima (plavo ispunjen trokut), osteocitima (crno ispunjen trokut) i Howshipova lakuna u koštanoj gredici s krvnom žilom (zeleni strelica). HE, 400 X

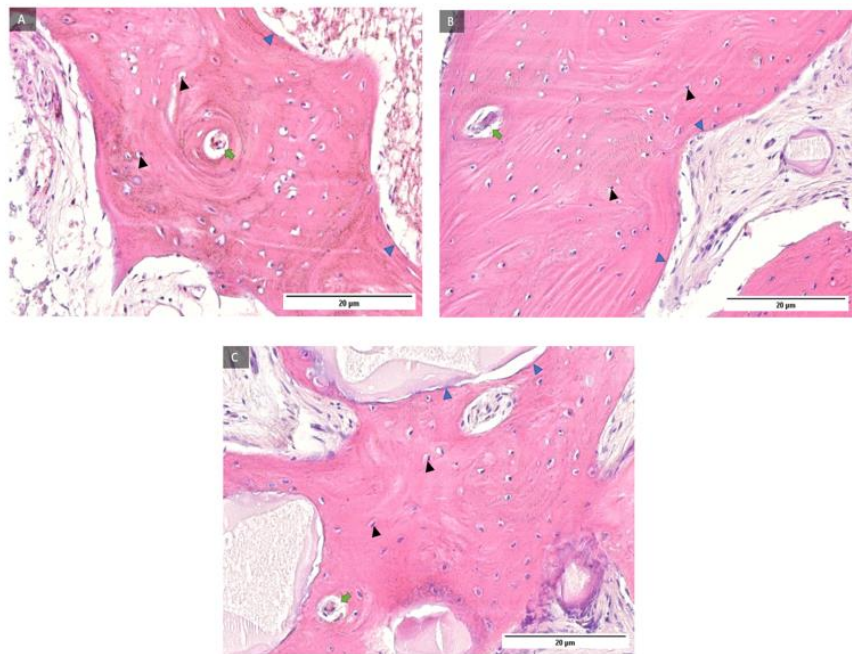
Reprezentativni uzorci ispitivane skupine i histološkoga bojenja hemalaun-eozinom pod povećanjem 100 (Slika 30), 200 (Slika 31) i 400 puta (Slika 32) i označeni osteoblasti na granici s novostvorenom kosti i zaostatnim biomaterijalom, osteociti u novostvorenoj kosti i Howshipova lakuna u koštanoj gredici s krvnom žilom koja upućuje na integraciju biomaterijala i novostvorene kosti.



**Slika 30.** Primjeri preparata ispitivane skupine (A, B, C) s označenim osteoblastima (plavo ispunjen trokut), osteocitima (crno ispunjen trokut) i Howshipova lakuna u koštanoj gredici s krvnom žilom (zeleni strelica). HE, 100 X



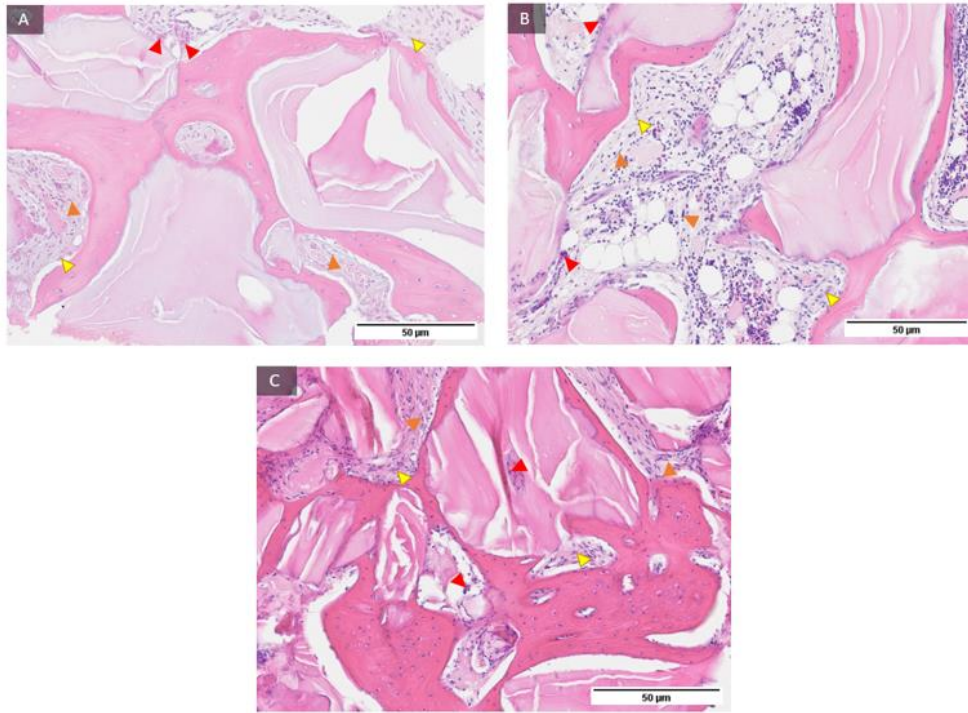
**Slika 31.** Primjeri preparata ispitivane skupine (A, B, C) s označenim osteoblastima (plavo ispunjen trokut), osteocitima (crno ispunjen trokut) i Howshipova lakuna u koštanoj gredici s krvnom žilom (zeleni strelica). HE, 200 X



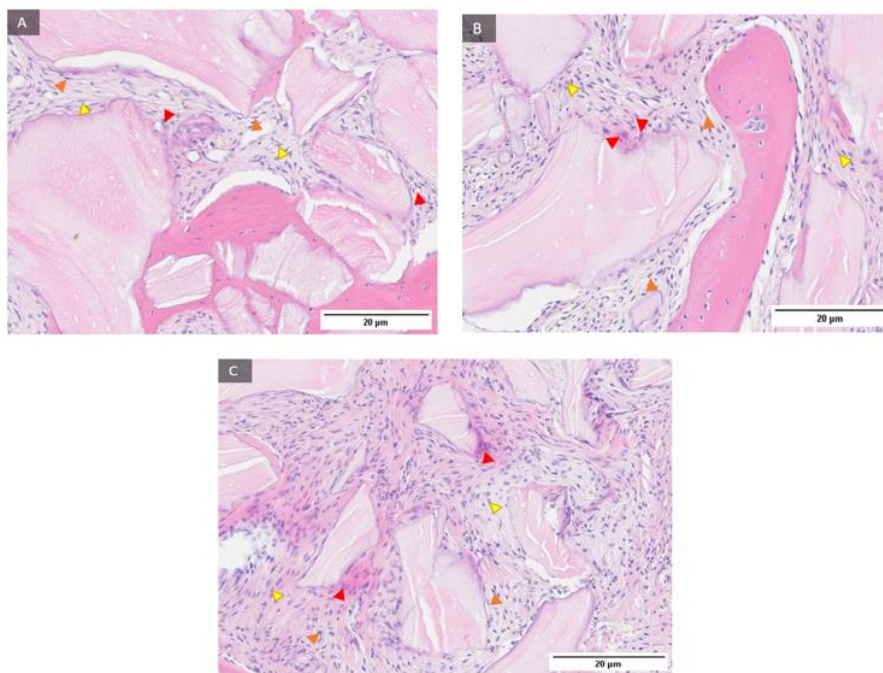
**Slika 32.** Primjeri preparata ispitivane skupine (A, B, C) s označenim osteoblastima (plavo ispunjen trokut), osteocitima (crno ispunjen trokut) i Howshipova lakuna u koštanoj gredici s krvnom žilom (zeleni strelica). HE, 400 X



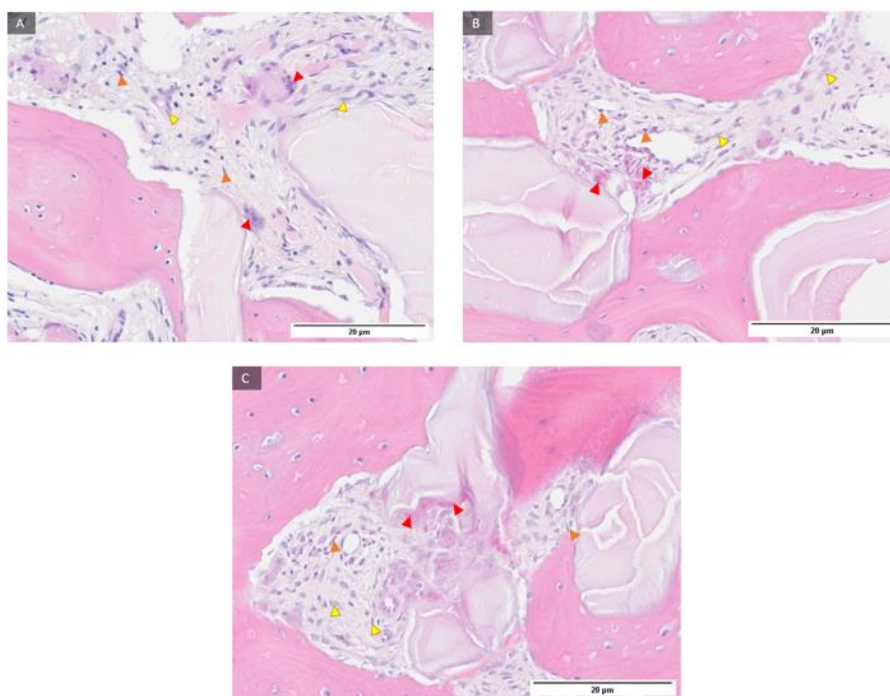
Reprezentativni uzorci kontrolne skupine i histološkoga bojenja hemalaun-eozinom pod povećanjem 100 (Slika 33), 200 (Slika 34) i 400 puta (Slika 35) i označeni fibroblasti i fibrociti u mekom tkivu te stanice monocitno-makrofagnoga sustava oko zaostatnoga biomaterijala koje upućuju na razgradnju biomaterijala.



**Slika 33.** Primjeri preparata kontrolne skupine (A, B, C) s označenim fibroblastima (žuto ispunjen trokut), fibrocitima (narančasto ispunjen trokut) i stanicama monocitno-makrofagnoga sustava (crveno ispunjen trokut). HE, 100 X

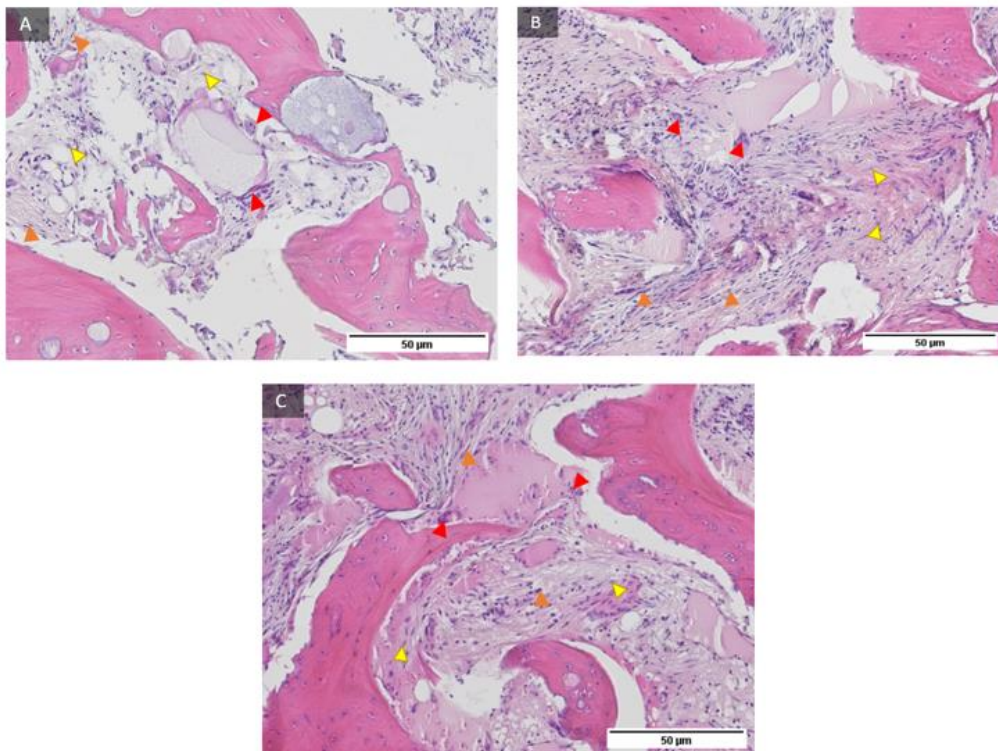


**Slika 34.** Primjeri preparata kontrolne skupine (A, B, C) s označenim fibroblastima (žuto ispunjen trokut), fibrocitima (narančasto ispunjen trokut) i stanicama monocitno-makrofagnoga sustava (crveno ispunjen trokut). HE, 200 X

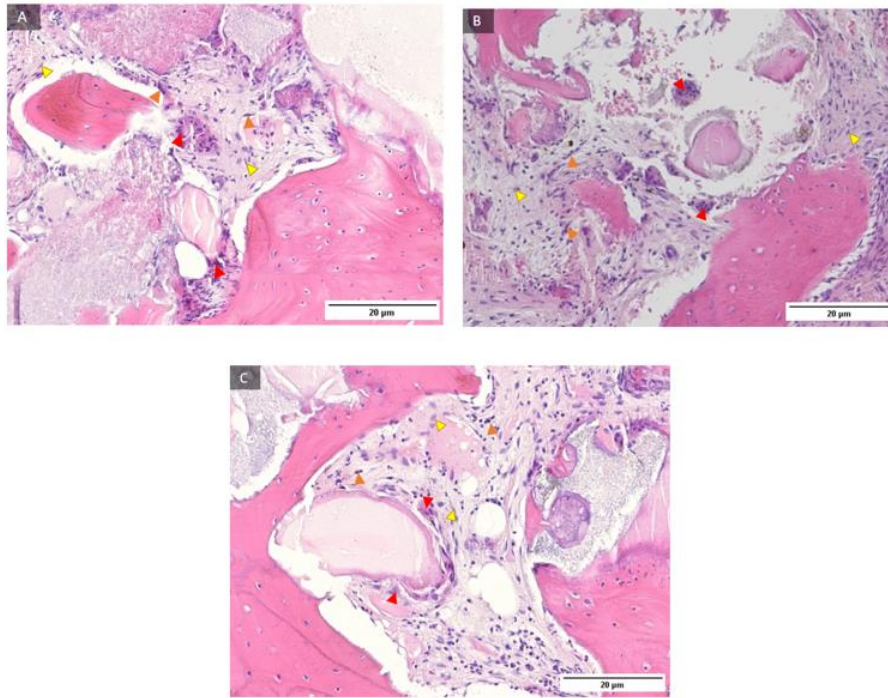


**Slika 35.** Primjeri preparata kontrolne skupine (A, B, C) s označenim fibroblastima (žuto ispunjen trokut), fibrocitima (narančasto ispunjen trokut) i stanicama monocitno-makrofagnoga sustava (crveno ispunjen trokut). HE, 400 X

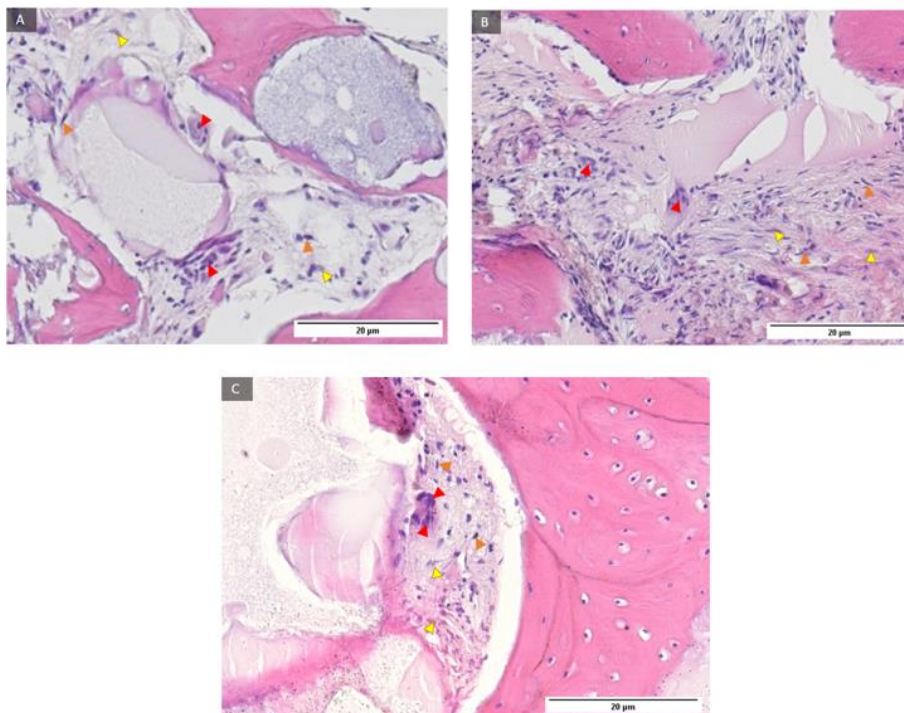
Reprezentativni uzorci ispitivane skupine i histološkoga bojenja hemalaun-eozinom pod povećanjem 100 (Slika 36), 200 (Slika 37) i 400 puta (Slika 38) i označeni fibroblasti i fibrociti u mekom tkivu te stanice monocitno-makrofagnoga sustava oko zaostatnoga biomaterijala koje upućuju na razgradnju biomaterijala.



**Slika 36.** Primjeri preparata ispitivane skupine (A, B, C) s označenim fibroblastima (žuto ispunjen trokut), fibrocitima (narančasto ispunjen trokut) i stanicama monocitno-makrofagnoga sustava (crveno ispunjen trokut). HE, 100 X



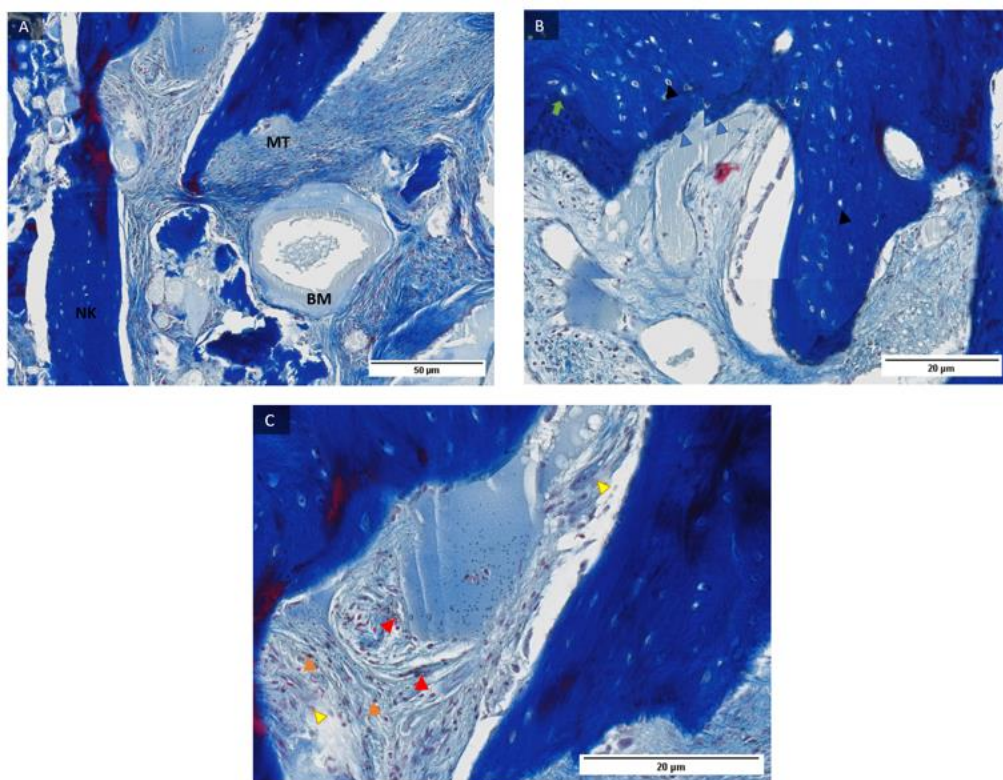
**Slika 37.** Primjeri preparata ispitivane skupine (A, B, C) s označenim fibroblastima (žuto ispunjen trokut), fibrocitima (narančasto ispunjen trokut) i stanicama monocitno-makrofagnoga sustava (crveno ispunjen trokut). HE, 200 X



**Slika 38.** Primjeri preparata ispitivane skupine (A, B, C) s označenim fibroblastima (žuto ispunjen trokut), fibrocitima (narančasto ispunjen trokut) i stanicama monocitno-makrofagnoga sustava (crveno ispunjen trokut). HE, 400 X

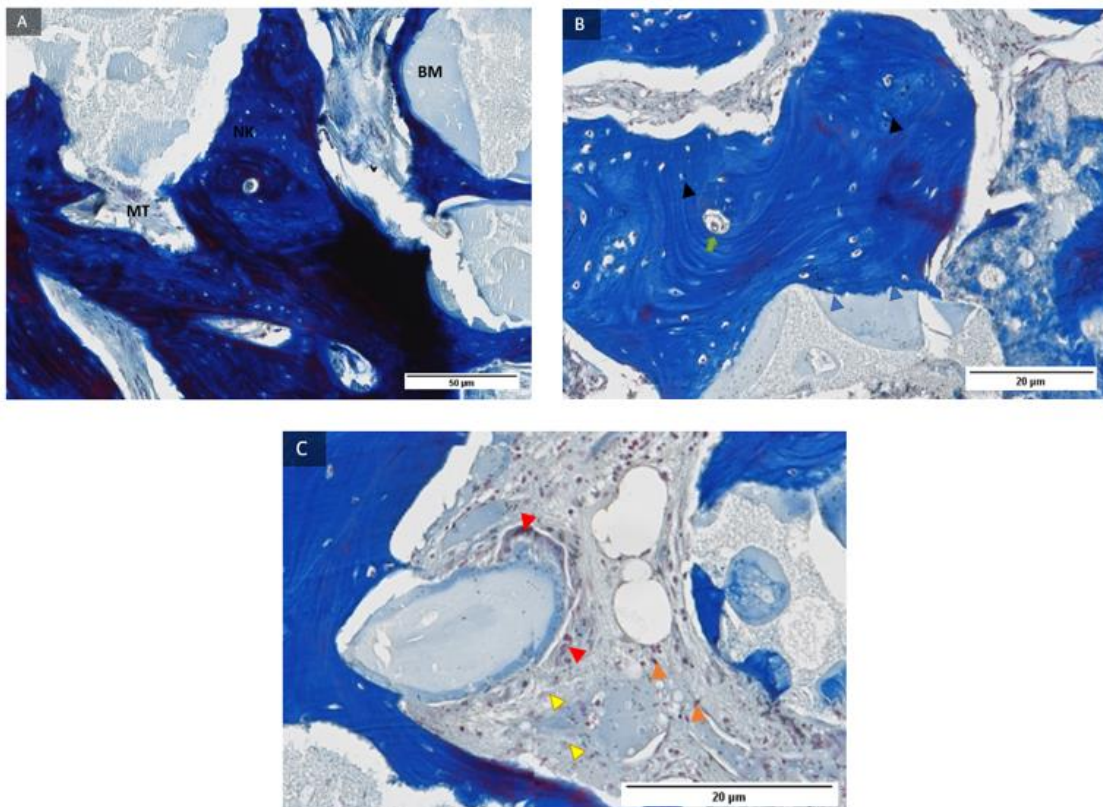
#### 4.3.2. Histološko bojenje po Massonu i Movat-Rusellu kontrolne i ispitivane skupine

Reprezentativni uzorci kontrolne skupine i histološkoga trikromnog bojenja po Massonu pod povećanjem 100, 200 i 400 puta (**Slika 39**) i označene novostvorena kost, zaostatni biomaterijal i meko tkivo (A); osteoblasti na granici s novostvorenom kosti i zaostatnim biomaterijalom, osteociti u novostvorenoj kosti i Howshipova lakuna u koštanoj gredici s krvnom žilom koja upućuje na integraciju biomaterijala i novostvorene kosti (B); označeni fibroblasti i fibrociti u mekom tkivu te stanice monocitno-makrofagnoga sustava oko zaostatnoga biomaterijala koje upućuju na razgradnju biomaterijala (C).



**Slika 39.** Primjeri preparata kontrolne skupine (A, B, C) s označenom novostvorenom kosti (NK), zaostatnim biomaterijalom (BM), mekim tkivom (MT) (A); osteoblastima (plavo ispunjen trokut), osteocitima (crno ispunjen trokut), Howshipova lakuna u koštanoj gredici s krvnom žilom (zelena strelica) (B); fibroblastima (žuto ispunjen trokut), fibrocitima (narančasto ispunjen trokut) i stanicama monocitno-makrofagnoga sustava (crveno ispunjen trokut) (C). Masson, 100 X, 200 X, 400 X

Reprezentativni uzorci ispitivane skupine i histološkoga trikromnog bojenja po Massonu pod povećanjem 100, 200 i 400 puta (**Slika 40**) i označene novostvorena kost, zaostatni biomaterijal i meko tkivo (A); osteoblasti na granici s novostvorenom kosti i zaostatnim biomaterijalom, osteociti u novostvorenoj kosti i Howshipova lakuna u koštanoj gredici s krvnom žilom koja upućuje na integraciju biomaterijala i novostvorene kosti (B); označeni fibroblasti i fibrociti u mekom tkivu te stanice monocitno-makrofagnoga sustava oko zaostatnoga biomaterijala koje upućuju na razgradnju biomaterijala (C).



**Slika 40.** Primjeri preparata ispitivane skupine (A, B, C) s označenom novostvorenom kosti (NK), zaostatnim biomaterijalom (BM), mekim tkivom (MT) (A); osteoblastima (plavo ispunjen trokut), osteocitima (crno ispunjen trokut), Howshipova lakuna u koštanoj gredici s krvnom žilom (zelena strjelica) (B); fibroblastima (žuto ispunjen trokut), fibrocitima (narančasto ispunjen trokut) i stanicama monocitno-makrofagnoga sustava (crveno ispunjen trokut) (C). Masson, 100 X, 200 X, 400 X

Iste rezultate pokazalo je i histološko bojenje po Movat-Russelu.

#### 4.4. Prisutnost transkripcijskog faktora Osx i BMP-2 proteina

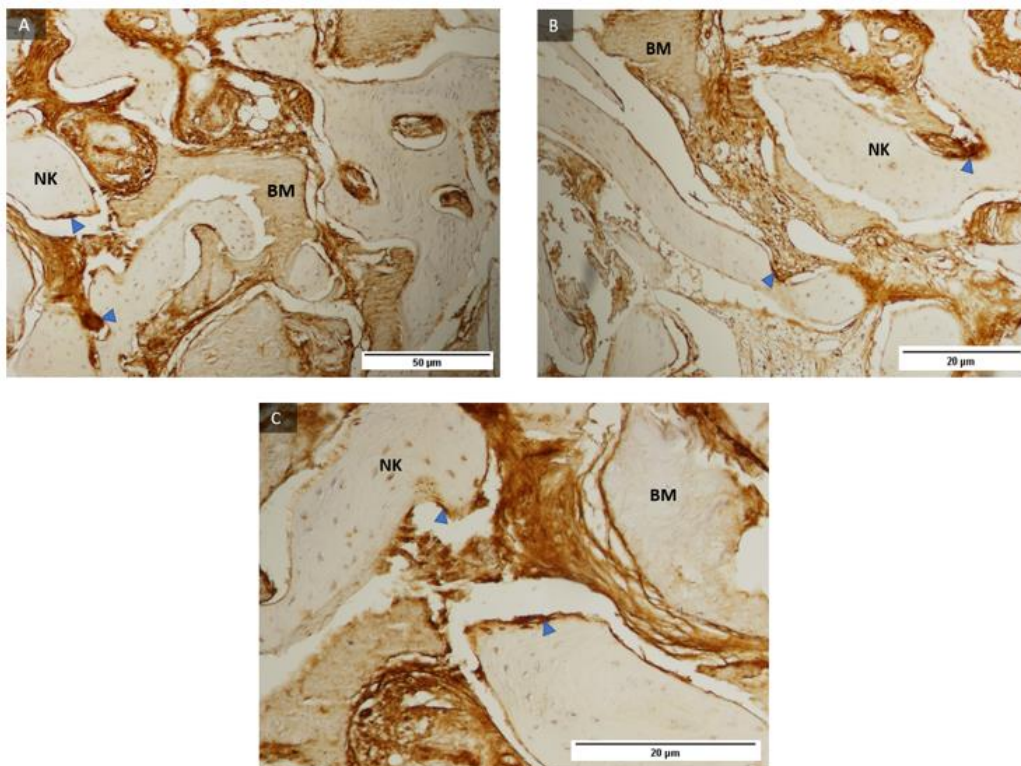
Imunohistokemijska analiza uzoraka biopsije kosti provedena je u svrhu detekcije transkripcijskoga faktora Osx i BMP-2 proteina.

Specifični ciljevi i svrha imunohistokemijske analize bili su:

5. Imunohistokemijski identificirati ekspresiju Osx-a u remodelaciji kosti;

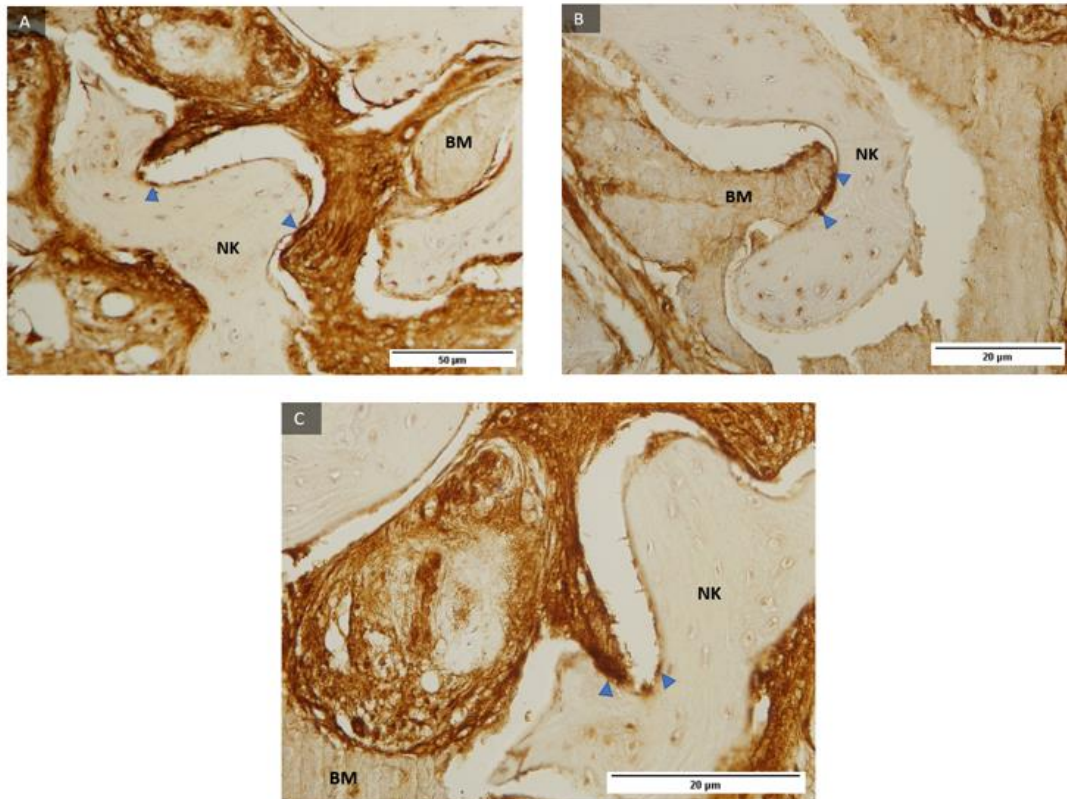
6. Imunohistokemijski identificirati ekspresiju BMP-2 u diferencijaciji mezenhimnih stanica.

Reprezentativni uzorci kontrolne skupine i Osx imunohistokemijskoga bojenja pod povećanjem 100, 200 i 400 puta (**Slika 41**) i označene novostvorena kost, zaostatni biomaterijal i stanice s ekspresijom jačine 3 (+++) Osx-a u pre-osteoblastima usidrenima na granici novostvorene kosti, što upućuje na njihov prijelaz u zrele osteoblaste i osteocite. Štoviše, primijećena je i trabekularizacija nove kosti koja upućuje na kontinuiranu remodelaciju.



**Slika 41.** Primjeri preparata kontrolne skupine (A, B, C) i Osx imunohistokemijskoga bojenja dijelova kosti nakon implantacije Osx transkripcijskoga faktora s označenom novostvorenom kosti (NK), zaostatnim biomaterijalom (BM) i stanicama s ekspresijom jačine 3 (+++) Osx-a (plavo označeni trokut). Osx, 100, 200 i 400X

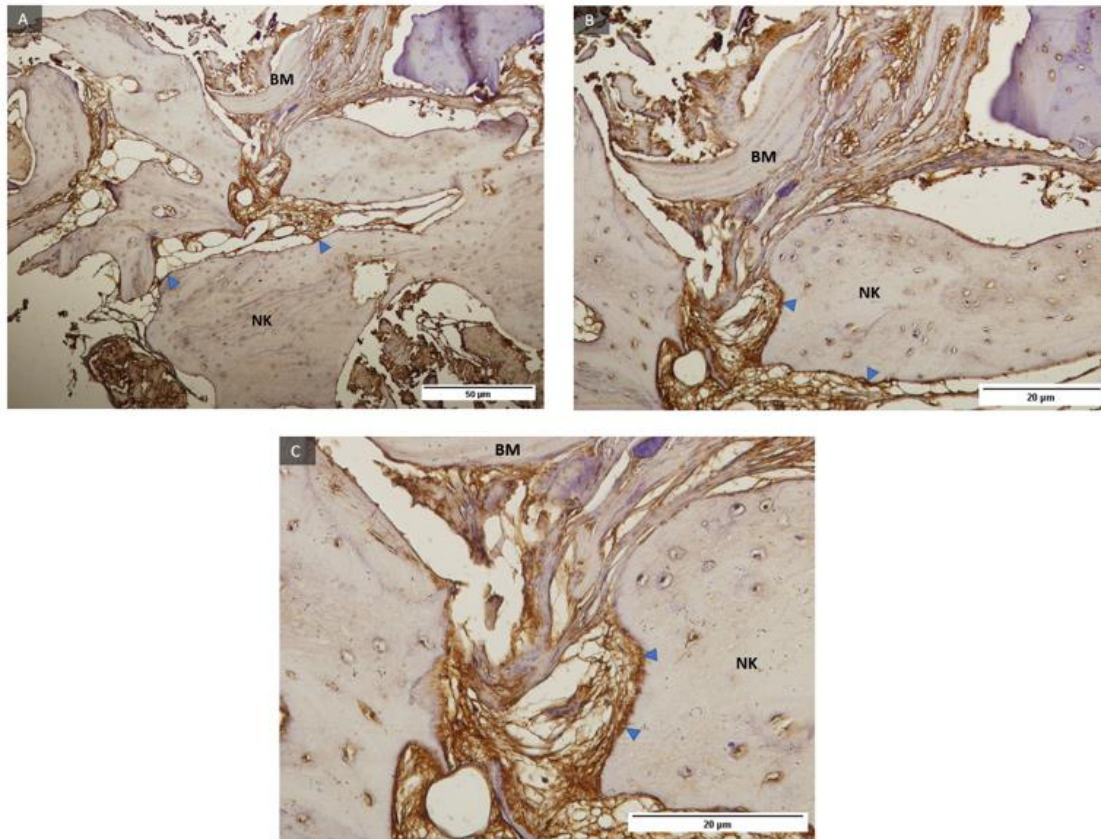
Reprezentativni uzorci ispitivane skupine i Osx imunohistokemijskoga bojenja pod povećanjem 100, 200 i 400 puta (Slika 42) i označene novostvorena kost, zaostatni biomaterijal i stanice s ekspresijom jačine 3 (+++) Osx-a u pre-osteoblastima usidrenima na granici novostvorene kosti, što upućuje na njihov prijelaz u zrele osteoblaste i osteocite. Štoviše, primijećena je i trabekularizacija nove kosti koja upućuje na kontinuiranu remodelaciju.



**Slika 42.** Primjeri preparata ispitivane skupine (A, B, C) i Osx imunohistokemijskoga bojenja dijelova kosti nakon implantacije Osx transkripcijskoga faktora s označenom novostvorenom kosti (NK), zaostatnim biomaterijalom (BM) i stanicama s ekspresijom jačine 3 (+++) Osx-a (plavo označen trokut). Osx, 100, 200 i 400 X

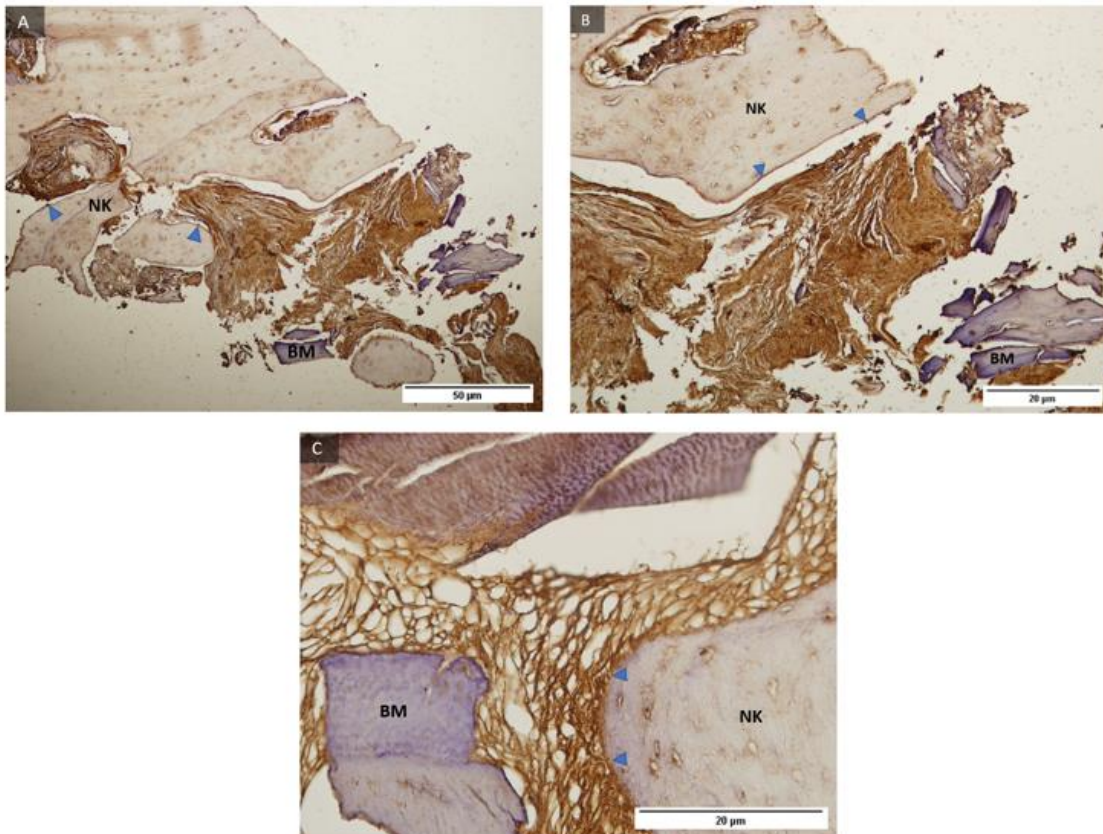


Reprezentativni uzorci kontrolne skupine i BMP-2 imunohistokemijskoga bojenja pod povećanjem 100, 200 i 400 puta (**Slika 43**) i označene novostvorena kost, zaostatni biomaterijal i stanice s ekspresijom jačine 3 (+++) BMP-2 uglavnom prisutne u zonama u kojima se nastavila diferencijacija mezenhimnih stanica u pre-osteoblaste što upućuje na obnavljanje, tj. regeneraciju oštećenoga tkiva.



**Slika 43.** Primjeri preparata kontrolne skupine (A, B, C) i BMP-2 imunohistokemijskoga bojenja dijelova kosti nakon implantacije BMP-2 proteina s označenom novostvorenom kosti (NK), zaostatnim biomaterijalom (BM) i stanicama s ekspresijom jačine 3 (+++) BMP-2 (plavo označen trokut). BMP-2, 100, 200 i 400 X

Reprezentativni uzorci ispitivane skupine i BMP-2 imunohistokemijskoga bojenja pod povećanjem 100, 200 i 400 puta (**Slika 44**) i označene novostvorena kost, zaostatni biomaterijal i stanice s ekspresijom jačine 3 (+++) BMP-2 uglavnom prisutne u zonama u kojima se nastavila diferencijacija mezenhimnih stanica u pre-osteoblaste što upućuje na obnavljanje, tj. regeneraciju oštećenoga tkiva.



**Slika 44.** Primjeri preparata ispitivane skupine (A, B, C) i BMP-2 imunohistokemijskoga bojenja dijelova kosti nakon implantacije BMP-2 proteina s označenom novostvorenom kosti (NK), zaostatnim biomaterijalom (BM) i stanicama s ekspresijom jačine 3 (+++) BMP-2 (plavo označen trokut). BMP-2, 100, 200 i 400 X

## 5. RASPRAVA

Nakon ekstrakcije zuba alveolarna kost prolazi kroz dimenzionalne promjene s posljedičnim smanjenjem njezine širine i visine, koja može doseći čak 50 % <sup>246</sup>. Taj gubitak koštane mase javlja se uglavnom u prva tri mjeseca nakon ekstrakcije zuba, nakon čega slijedi kontinuirani proces resorpcije s prosjekom od 0,5 % do 1,0 % godišnje što je dokazano u mnogim starijim i novijim studijama <sup>116,135,247–249</sup>. Smanjenje dimenzija alveolarne kosti nakon vađenja zuba klinički je značajno i može utjecati na postavljanje implantata <sup>117</sup>. Nakon ekstrakcije zuba alveolarna kost prolazi kroz proces remodelacije; meko tkivo kolabira, a u kosti koja obuhvaća alveolu dolazi do slijeda reakcija koje utječu na dimenziju volumena i samu morfologiju kosti <sup>250,251</sup>. Resorpcija kosti dovodi do recesije sluznice i estetskih komplikacija. Za suzbijanje resorpcije kosti nakon ekstrakcije zuba mogu se koristiti tehnike očuvanja alveolarnog grebena (ARP). Kao što je ranije objavljeno u pretkliničkim i kliničkim studijama, različite vrste augmentacijskih postupaka, kao što je i ranije opisan koncept vođene regeneracije kosti, dokazano pruža strukturnu i dimenzionalnu stabilnost alveolarnog grebena potrebnu za konačnu ugradnju dentalnog implantata <sup>252–254</sup>.

Za tu su svrhu dizajnirani i primijenjeni različiti NKBM-i i membrane, a mnogo eksperimentalnih i kliničkih studija potvrdilo je učinkovitost takve metode u svrhu regeneracije alveolarnog grebena <sup>255–260</sup>. Vodeći se tim razmišljanjem, odlučeno je da se takav koncept primijeni u ovome istraživanju u kojemu su korišteni NKBM-i i zaštitna membrana. Prema prethodnim istraživanjima, prvi i jedan od najboljih materijala za augmentaciju alveolarnog grebena korišten za ovakve intervencije je autogena kost, koja predstavlja "zlatni standard". Djeluje osteoinduktivno, osteokonduktivno i ima osteogene sposobnosti. Unatoč prednostima, njezina je klinička upotreba ograničena zbog smanjene dostupnosti, brze resorpcije i morbiditeta na donorskom mjestu <sup>261,262</sup>. To je glavni razlog potrage za zamjenskim NKBM-om. U posljednjih nekoliko desetljeća biomaterijali kao što su ksenografti, alografti, aloplastični NKBM-i, faktori rasta, koncentracije trombocita i mnogi drugi ispitani su kako bi se pronašlo optimalno rješenje za regeneraciju alveolarnog grebena, što pokazuju razne studije <sup>252,261</sup>. Alografti, ksenografti i aloplasti kategorizirani su kao NKBM-i razvijeni za prevladavanje problema s autogenom kosti. Alografti, koji su zbog regulatornih ograničenja u pogledu upotrebe još uvijek zabranjeni, doveli su do upotrebe novih materijala iz drugih izvora, kao što su životinjski ili sintetski <sup>147,195</sup>. Ksenografti koji potječu od životinja su NKBM-i s osteokonduktivnim svojstvima koji se koriste za augmentaciju alveolarnog grebena i

predstavljaju alternativu zlatnom standardu. Istraživanja su pokazala da su ti NKBM-i sigurni i učinkoviti pri regeneraciji alveolarnog grebena<sup>263</sup>. S druge strane, aloplasti su sintetski NKBM-i koji imaju dobra osteointegrativna i osteokonduktivna svojstva. Jedan od njih je i kombinacija HA i  $\beta$ -TCP u obliku BCP-a<sup>236</sup>.

S obzirom na sve prednosti i nedostatke određenih NKBM-a, u ovome istraživanju korišten je ksenograft (Bio-Oss®) i injekcijski aloplast (maxresorb® inject). Ova studija ispituje učinak ksenografta i injekcijskog oblika aloplasta, tj. BCP-a sastava od 60 % HA-a i 40 %  $\beta$ -TCP-a. Trenutno ne postoji komparativna histološka studija ispitivanja histološkoga i histomorfometrijskog učinka na regeneraciju alveolarnog grebena na ljudima, niti imunohistokemijske analize ksenografta i aloplastičnoga biomaterijala u injekcijskom obliku. Prema tome, rasprava će se koncentrirati na istraživanja i prikaze slučajeva u kojima su korišteni ksenograft Bio-Oss® i injekcijski oblici aloplasta omjera 60 % HA i 40 %  $\beta$ -TCP samostalno ili u kombinaciji s drugim NKBM-ima.

U ovoj studiji sudjelovalo je 38 ispitanika, od kojih 17 (45 %) muškoga spola, a 21 (55 %) ženskoga spola, raspoređenih u dvije skupine – ispitivanu i kontrolnu. Prosječna dob ispitanika iznosila je  $35.03 \pm 9.16$ , (žene =  $36.67 \pm 6.39$ ; muškarci =  $33.00 \pm 11.61$ ). Može se povući paralela s istraživanjima na ljudima koje su proveli Čandrić i sur.<sup>264</sup>, Jelušić i sur.<sup>265</sup> i Cordaro i sur.<sup>266</sup>. U studiji Čandrić i sur. koja je ispitivala kvalitativni i kvantitativni učinak injekcijskog bifaznog klacijeva fosafata i druge vrste ksenografta u tehnici prezervacije alveole, sudjelovalo je 40 ispitanika, od kojih je 15 (37.5 %) muškoga spola i 25 (62.5 %) ženskoga spola. U studiji Jelušića i sur. u kojoj se ispitivao kvalitativni i kvantitativni učinak čistoga jednofaznog  $\beta$ -TCP-a i granuliranoga BCP-a u tehnici podizanja dna sinusa, sudjelovalo je 43 ispitanika, 53.3 % ispitanika muškoga spola i 46,7 % ženskoga spola, dok je u studiji Cordara i sur., u kojoj se također ispitivao učinak granuliranoga BCP-a i druge vrste ksenografta u tehnici podizanja dna sinusa, sudjelovalo 37 ispitanika. Te tri studije, iako su u njima korišteni različiti ksenografti i aloplastični NKBM-i mogu potvrditi ustroj istraživanja sličan ovome u kojemu je najniža dob ispitanika bila 18 godina, a glavni uključni i isključni kriteriji koji se odnose na indikacije i kontraindikacije za implantološku terapiju potvrđeni su u svim studijama. Također, u ovoj su studiji glavni kriterij za uključivanje bili pacijenti koji imaju najmanje jedan zub predviđen za ekstrakciju na kojemu su prethodno iskorištene sve terapijske mogućnosti i koji imaju mogućnost odgođene ugradnje dentalnog implanata na mjestu ekstrakcije nakon augmentacije alveolarnog grebena. U studiji Čandrić i sur. glavnina pozornosti bila je usmjerena na postupak prezervacije alveole uz sve očuvane stijenke, a u ovoj studiji indikacija je postavljena i na

alveolarne stijenke koje nemaju očuvan kontinuitet, dok se studijama Jelušića i sur. i Cordara i sur. klinički postupak odnosio na tehniku podizanja dna maksilarnog sinusa. Mangano i sur.<sup>267</sup> su u svome istraživanju s BCP-om uključili samo 10 ispitanika, od kojih su 4 ispitanika bila ženskoga spola, a 6 muškoga, u dobi između 36 i 67 godina, dok su Oh i sur.<sup>268</sup> u svojoj studiji ispitivanja BCP-a i ksenografta u tehnici podizanja dna sinusa uključili 58 ispitanika od kojih je 25 ispitanika bilo ženskoga spola, a 33 ispitanika muškoga spola, tako da takvi podaci odskaču od ove i prethodne tri studije. Međutim, u svim prethodno navedenim studijama koštani bioptat na mjestu budućega implantata uzet je šest mjeseci nakon augmentacijskoga postupka što korelira s ovim i mnogim drugim istraživanjima.

Za procjenu regeneriranih augmentacijskih područja koriste se kvantitativna i kvalitativna analiza uzoraka biopsije kosti, što, osim naše, dokazuju i mnoge prethodne studije<sup>269–271</sup>. Veći postotak novonastale kosti upućuje na uspješnu integraciju koštanoga presatka, a vitalna kost jedan je od najvažnijih čimbenika za oseointegraciju dentalnog implantata. Opsežni eksperimentalni dokazi dobiveni prethodnim animalnim i studijama na ljudima prate postavljene ciljeve ovoga istraživanja nakon augmentacije u kontrolnoj i ispitivanoj skupini<sup>261</sup>. Kvantitativnom analizom odredile su se površine novostvorene kosti, zaostatnoga NKBM-a i mekotkivnih struktura s obzirom na ukupnu površinu histološkoga preparata u vidnom polju, a nakon obrade svih rezultata dobivene površine pretvorene su u volumne postotke (%). Rezultati usporedbe tih struktura u kontrolnoj skupini u kojoj se koristio ksenograft Bio-oss® izraženi su kao srednja vrijednost ± standardna pogreška srednje vrijednosti, a iznosili su: novostvorena kost (41.73 ± 13.99 %), zaostatni biomaterijal (31.72 ± 15.52 %), mekotkivne strukture (26.54 ± 7.25 %). S druge strane, kvalitativnom je analizom procijenjen patohistološki odgovor tkiva domaćina na korišteni NKBM, odnosno opisani su osteoblasti, osteociti, fibroblasti, fibrociti, krvne žile i stanice monocitno-makrofagnoga sustava.

U literaturi je Bio-Oss® jedan od najbolje dokumentiranih goveđih ksenografta i često je korišten kao kontrolna skupina u mnogim istraživanjima<sup>266,272,273</sup>. Slijedeći trenutno dostupnu literaturu o animalnim studijama, kao što je studija Jensen-a i sur. iz 1996. godine<sup>274</sup> prvi je put kvantitativnom i kvalitativnom analizom opisan nastanak novostvorene kosti i sposobnost NKBM-a za obnavljanje oštećenoga tkiva potaknuto korištenjem ksenografta (Bio-Oss®) čiji je učinak u kontrolnoj skupini ispitivan u ovom istraživanju. Tako je u istraživanjima poput onoga McAllistera i sur.<sup>275,276</sup> u dvije studije na čimpanzama 7.5 mjeseci nakon augmentacije postotak novostvorene kosti iznosio 47 % i 62 %, dok je postotak zaostatnoga NKBM-a iznosio 19 % u obje studije. Mah i sur. i Scarano i sur.<sup>277,278</sup> u svojim su studijama, na animalnim

modelima kalvarije štakora, u razdoblju između 112 i 168 dana opisali postotak novostvorene kosti od  $47.4 \pm 7.1$  % te  $39 \pm 3.3$  %. Također, u novijoj studiji Aluddena i sur. iz 2020. godine<sup>279</sup> provedenoj na svinjama, postotak novostvorene kosti nakon 20 tjedana od augmentacijskoga postupka iznosio je 60 %, dok je zaostatnoga NKBM-a preostalo 25 %. Takvi rezultati i period praćenja koreliraju približno i s ovim rezultatima, bez obzira na navedene animalne modele i veličinu uzorka.

Prateći literaturu o studijama na ljudima u kojima se koristio ovaj oblik ksenografta šest mjeseci nakon augmentacije, starija studija Zitzmanna i sur. iz 2001. godine<sup>280</sup> potvrdila je  $36.7 \pm 26.6$  % novostvorene kosti,  $30.5 \pm 4.6$  % zaostatnoga NKBM-a i  $37.6 \pm 20.5$  % mekotkivnih struktura, što je približno jednako rezultatima dobivenima u ovoj studiji. Također, novija studija Amoiana i sur.<sup>281</sup> može se povezati s ovom kontrolnom skupinom u smislu novostvorene kosti koja je u toj studiji iznosila 38.66 %, iako je uzorak činilo samo šest pacijenata. S druge strane, studija Scarana i sur.<sup>282</sup>, iako je provedena na puno većem broju ispitanika, potvrdila je regenerativni učinak Bio-Oss®-a u smislu novostvorene kosti od  $39 \pm 1.6$  %,  $31 \pm 1.4$  % zaostatnoga NKBM-a i  $34 \pm 1.6$  % mekotkivnih struktura, što je najbliže rezultatima u ovoj studiji šest mjeseci nakon augmentacije istim NKBM-om. Suprotno tome, neke studije na ljudima otkrile su da su mjesta defekta alveolarnog grebena presađena s Bio-Oss®-om rezultirala različitim postocima novostvorene kosti, zaostatnoga NKBM-a i mekotkivnih struktura od spomenutih rezultata, kao što su studije Frouma i sur.<sup>283</sup>, Schmitta i sur.<sup>216</sup>, Lorenza i sur.<sup>284</sup>, Fienitza i sur.<sup>285</sup> itd. Također, istraživanja provedena u posljednjih nekoliko godina upućuju na različite udjele već spomenutih varijabli, kao što je slučaj u studijama Sivolelle i sur.<sup>286</sup>, Pignatona i sur.<sup>287</sup> te Santosa i sur.<sup>288</sup>. Takvi rezultati mogu se objasniti različitim početnom morfologijom defekta, vrstom zatvaranja rane, elevacijom režnja, korištenjem različitih zaštitnih membrana, mjestom uzimanja bioptata i različitim periodom praćenja. Bez obzira na to, takvi rezultati dokazuju da učinkovitost Bio-Oss®-a u poticanju stvaranja nove kosti u animalnim i studijama na ljudima blisko odgovara, ako ne i premašuje, autogenu kost<sup>289</sup>. Osim histomorfometrijske analize, interes prethodnih studija, kao i ove, bio je usmjeren na interakcije koje se javljaju između NKBM-a i tkiva domaćina, kao što je biološki odgovor tkiva povezan s podrijetlom NKBM-a koji je ključan za kvalitativnu analizu. Prvotno provedene *in vitro* i *in vivo* animalne studije opisale su osteokonduktivna svojstva Bio-Oss® uz taloženje mineraliziranoga izvanstaničnog matriksa i odgovarajuće diferenciranih matičnih stanica koje imaju sposobnost integracije s koštanim tkivom domaćina bez upalnoga odgovora<sup>290,291</sup>. Bez obzira na sporu resorpciju koja je dokazana u mnogim istraživanjima, kvalitativna svjetlosna

mikroskopska analiza drugih, a i ovoga istraživanja, snažno dokazuju da mjesta tretirana Bio-Oss®-om pokazuju dobru integraciju između biomaterijala i okolnoga tkiva domaćina<sup>209,216,292</sup>. Štoviše, na ovim se uzorcima nakon razdoblja od šest mjeseci mogu uočiti osteoblasti na granici s novostvorenom kosti i zaostatnim biomaterijalom, osteociti u novostvorenoj kosti i Howshipova lakuna u koštanoj gredici s krvnom žilom koja upućuje na integraciju biomaterijala i novostvorene kosti. Također, na reprezentativnim uzorcima histološkoga bojenja uočavaju se stanice monocitno-makrofagnoga sustava oko zaostatnoga biomaterijala koje upućuju na razgradnju biomaterijala, što se može povezati s mnogim drugim istraživanjima, jedno od kojih je istraživanje Piattellija i sur. koji su nakon određenoga perioda praćenja na histološkim preparatima dokazali prisustvo stanica monocitno-makrofagnoga sustava koji okružuju navedeni NKBM i upućuju na njegovu sporiju resorpciju<sup>217,263</sup>. Prema nekim autorima, takvo ponašanje *in vivo* moglo bi dijelom biti spriječeno specifičnom obradom na visokim temperaturama i sterilizacijom NKBM-a, prije nego bude dostupan za kliničku upotrebu. Zapravo, odsutnost proteina ključna je za izbjegavanje neželjenih imunoloških, alergijskih reakcija i svih mogućih rizika od križnih infekcija. Ovaj tretman modificira mineralnu strukturu kosti hidroksiapatita, pa tako dobiveni NKBM obično ima smanjen resorpcijski potencijal<sup>200</sup>. Ovakvi nalazi koreliraju s dobivenim rezultatima te upućuju na veću količinu zaostatnoga biomaterijala u kontrolnoj skupini (Bio-Oss® -  $31.72 \pm 15.52$  %) u odnosu na ispitivanu skupinu (maxresorb inject® -  $28.61 \pm 11.38$  %) te zaključno sporiju resorpciju ksenografta. Bez obzira na sve navedeno, u kliničkom smislu, Bio-Oss® se pokazao kao vrijedna alternativna zlatnom standardu koji osigurava dobru kvalitetu novostvorene kosti i obećava dugoročnu stopu regeneracije<sup>293</sup>.

U ispitivanoj skupini korišten je injekcijski bifazni kalcijev fosfat (maxresorb® inject) sastava 60 % HA-a i 40 %  $\beta$ -TCP-a, predstavnik skupine aloplastičnih NKBM-a. Aloplastični NKBM-i, za koje nije potrebno donorsko mjesto i nema rizika od prijenosa infektivnih bolesti, uz njihov dizajn, odnosno upotrebu sa štrcaljkama različitih veličina, postali su vrlo popularni i idealna su zamjena za druge vrste NKBM-a sa sposobnošću pokrivanja različitih oblika defekta u usnoj šupljini i posjeduju dobra osteokonduktivna svojstva. Animalne i studije na ljudima o injekcijskim NKBM-ima imaju važnu ulogu u području dentalne medicine<sup>242,294,295</sup>. Kvantitativni rezultati ove studije, tj. usporedbe novostvorene kosti, zaostatnoga NKBM-a i mekotkivnih struktura u ispitivanoj skupini u kojoj se koristio injekcijski BCP (maxresorb® inject) izraženi su također kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti, a iznosili su: novostvorena kost ( $39.91 \pm 8.49$  %), zaostatni biomaterijal ( $28.61 \pm 11.38$  %),

mekotkivne strukture ( $31.49 \pm 11.09$  %). S druge strane, u kvalitativnoj se analizi i ovdje procijenio patohistološki odgovor tkiva domaćina na korišteni NKBM, odnosno opisani su osteoblasti, osteociti, fibroblasti, fibrociti, krvne žile i stanice monocitno-makrofagnoga sustava.

Prema dostupnoj literaturi, Gauthier i sur.<sup>296</sup> među prvima su izveli animalnu studiju na psima o korištenju injekcijskih sintetskih NKMB-a u omjeru 60/40 HA/ $\beta$ -TCP i njihovoj mogućnosti da potaknu formaciju nove kosti. Postotak novostvorene kosti u toj studiji iznosio je  $48.96 \pm 8.90$  % nakon tri mjeseca od augmentacije. Na temelju prvih histomorfometrijskih rezultata u animalnoj studiji može se zaključiti da taj aloplastični NKBM s injekcijskim svojstvima u omjeru 60/40 HA/ $\beta$ -TCP podržava stvaranje nove kosti. Isti autori u studiji iz 2004. koja je provedena na psima dokazali su da tri mjeseca nakon implantacije injekcijskog BCP-a dolazi do značajnoga porasta novostvorene kosti u usporedbi s nepopunjenim defektima<sup>297</sup>. To je potvrdilo i istraživanje Arala i sur., u kojoj je korišten NKBM u injekcijskom obliku. Nakon tri mjeseca histološke i histomorfometrijske analize potvrdile su izvrsnu biokompatibilnost kosti i osteokonduktivna svojstva, usporedive s autolognim koštanim transplantatom, bez znakova upalne reakcije, koja pogoduju stvaranju nove kosti<sup>294</sup>. Također, u nešto kasnijoj studiji Struilloua i sur.<sup>298</sup> u kojoj se koristio injekcijski oblik BCP-a, postotak novostvorene kosti iznosio je  $35.5 \pm 13.9$  % , što je vrlo slično rezultatima dobivenima u ovoj studiji. U to vrijeme navedeni autori zaključili su da bi dugoročne studije bile korisne za procjenu ponašanja biorazgradnje biomaterijala, što nas navodi na zaključak da je tri mjeseca nakon augmentacije relativno kratko razdoblje za promatranje razgradnje biomaterijala. S obzirom na navedeno, histološki uzorci bioptirani su i u ovoj skupini nakon šest mjeseci od augmentacije kako bi se dobili što točniji i realniji rezultati.

Slijedeći trenutnu literaturu o studijama na ljudima u kojima je korišten injekcijski oblik BCP-a, iako ih je vrlo malo, predstavljeni su najrelevantniji dokazi u smislu uspješnoga regeneracijskog potencijala i stvaranja nove kosti. U studijama Papancheva i sur.<sup>299</sup> i Lorenza i sur.<sup>218</sup>, nakon četiri i šest mjeseci od augmentacije, histološke i histomorfometrijske analize uzoraka biopsije kosti pokazale su usporedivu količinu novostvorene kosti i mekoga tkiva. Ono što se ističe u studiji Papancheva i sur. tehnika je podizanja dna sinusa koja je bilateralno izvedena na samo jednom pacijentu nakon šest mjeseci od augmentacije i koja je pokazala postotak novostvorene kosti od 15 % i 21%. Bilo bi zanimljivo provesti istraživanje na većemu broju ispitanika kako bi takvi rezultati bili usporedivi. S druge strane, u studiji Lorenza i sur. uzorci biopsije kosti 21 pacijenta uzeti su četiri mjeseca nakon augmentacije, što je prilično



rano u usporedbi s preporukama, međutim, pokazali su postotak novostvorene kosti od  $44.92 \pm 5.16$  % što korelira i s ovim istraživanjem, za razliku od zaostatnoga biomaterijala koji je u toj studiji bio  $2.59 \pm 2.05$  % i mekotkivnih struktura od  $52.49 \pm 6.43$  %. U studiji Čandrić i sur.<sup>264</sup>, koja je već prethodno spomenuta, a u kojoj je korišten injekcijski BCP u kombinaciji s drugim ksenograftom, postotak novostvorene kosti bio je  $26.47 \pm 14.72$  %, zaostatnoga biomaterijala od  $13.1 \pm 14.07$  % i mekotkivnih struktura  $60.43 \pm 12.73$  %. Bez obzira na drugačije rezultate u usporedbi s ovim istraživanjem, regeneracijski potencijal injekcijskog BCP-a dokazan je u oba istraživanja. Važno je spomenuti i neka novija istraživanja u kojima se koristio BCP sastava 60/40 HA/ $\beta$ -TCP u granuliranom obliku, a koji su pokazali rezultate slične ovom istraživanju s injekcijskim BCP-om šest mjeseci nakon augmentacije. Tako je u studiji Jelušića i sur.<sup>265</sup> na 30 pacijenata postotak novostvorene kosti iznosio  $38.42 \pm 6.1$  %; u studiji Nerya i sur.<sup>300</sup> na 10 pacijenata  $43.4 \pm 6.1$  %, a u studiji Flichy-Fernandez i sur.<sup>301</sup> na 16 pacijenata  $34.09 \pm 14.11$  %. Takvi kvantitativni rezultati potvrđuju osteokonduktivni potencijal BCP-a.

Kvalitativnom je analizom i u ovoj skupini procijenjen patohistološki odgovor tkiva domaćina na korišteni NKBM. Djelujući kao strukturni okvir za migraciju osteogenih stanica, aloplastični NKBM-i podržavaju rast i proliferaciju *in vivo* i potiču taloženje mineraliziranoga izvanstaničnog matriksa od strane osteoblasta<sup>290,302</sup>. Osim kemijskoga sastava, geometrija, ultrastruktura i mehanička svojstva ovih NKBM-a odrednice su za uspješno cijeljenje koštanih defekata, resorpciju i istodobnu zamjenu s novostvorenom kosti<sup>303</sup>. Geometrijski dizajn strukturnoga okvira pojačava aktivaciju signalnih molekula što dovodi do indukcije stvaranja kosti. Prema studijama Ripamontija i sur.<sup>304</sup>, geometrija biomaterijala, a posebno konkavnost stvorena u biokeramici na bazi hidroksiapatita i/ili bifaznog kalcijeva fosfata, kada se unese u mišićno tkivo primata, pokreće diferencijaciju stanica. Studije Khaleda i sur.<sup>305</sup> i Georgieva i sur.<sup>306</sup> korištenjem injekcijskih NKBM-a u kombinaciji s nanočesticama HA-a sugerirale su da HA u obliku manjih granula doprinosi boljoj staničnoj interakciji, što dovodi do brže resorpcije biomaterijala i stvaranja nove kosti. To je potvrđeno i u ovoj studiji u kojoj je korišten NKBM uz dodatak HA-a. Histološke analize pokazale su da su se čestice NKBM-a integrirale i postupno zamijenile novostvorenom kosti. S druge strane, resorpcija NKBM-a može se objasniti na način da se, neposredno nakon unošenja, vodeni dio gela otapa ostavljajući za sobom nano-HA i HA/ $\beta$ -TCP čestice. Kao što je poznato prema upustvima ovoga NKBM-a i iz nekih istraživanja poput studije Gotza i sur.<sup>307</sup>, nano-HA čestice pokazuju visoku biološku aktivnost zbog svoje velike površine. Čini se da nanoporoznost biomaterijala omogućuje

apsorpciju molekula i faktora rasta specifičnih za kost, kao što su alkalna fosfataza, BMP-2, kolagen tipa I, osteokalcin i osteopontin, čime se omogućuje regrutiranje prekursora osteoblasta i njihova diferencijacija u zrele osteoblaste, zajedno s adhezijom stanica monocitno–makrofagnoga sustava, što će konačno dovesti do postupne resorpcije NKBM-a i nastanka zreloga koštanog tkiva. Na temelju tih spoznaja može se zaključiti da takva aktivnost predstavlja snažnu interakciju sa stanicama koje stvaraju kost uz urastanje novih krvnih žila, kao i sa stanicama monocitno–makrofagnoga sustava. Sve navedene stanice i strukture opisane su i na reprezentativnim uzorcima ove studije. Bitno je istaknuti da na uzorcima nije bilo znakova upalnoga odgovora, dok su stanice monocitno–makrofagnoga sustava koje upućuju na resorpciju detektirane samo na granici NKBM-a. Prema prethodnim studijama,  $\beta$ -TCP će se resorbirati unutar ~ 3 - 6 mjeseci, a HA unutar ~ 2 - 3 godine<sup>308</sup>. To nam dokazuje da strukturni okvir podržava progresivni proces regeneracije kosti. Naime, ove specifične karakteristike temelje se na ravnoteži između manje topljivoga HA i više topljivoga TCP-a. Variranje omjera HA/TCP, tj. mehanička i biološka učinkovitost za induciranje stvaranja nove kosti mogu se prilagoditi<sup>309</sup>. Uspoređujući studije Weissa i sur.<sup>310</sup> i Lorenza i sur.<sup>218</sup> u smislu resorpcije biomaterijala, možemo zaključiti da proces resorpcije ovisi i o kemijskoj strukturi biomaterijala, tj. promjeru čestica. Male čestice vrlo se brzo resorbiraju, ali također potiču brzo stvaranje nove kosti u nastalim slobodnim prostorima. U isto vrijeme  $\beta$ -TCP/HA granule pružaju strukturni okvir za migraciju stanica koje stvaraju kost i taloženje nove koštane matrice. Logično, što su čestice biomaterijala veće, to je resorpcija sporija, što navodi na zaključak da korištenje nanočestica u injekcijskom obliku, koje se brzo resorbiraju i zamjenjuju novostvorenom kosti, za zahvate kao što je ugradnja implantata, dovode do boljega kliničkoga uspjeha i dugoročne stabilnosti implantata.

Štoviše, bitno je izdvojiti i neke druge biomehaničke prednosti injekcijskog oblika ovoga NKBM-a prilikom rukovanja, od kojih se među prvima ističu fluidnost, koja omogućava popunjavanje trodimenzionalnih šupljina uz sposobnost nestvrdnjavanja na licu mjesta, što je i zaključeno tijekom provođenja ove kliničke studije. Zahvaljujući svom specifičnom sastavu i viskoznosti prilikom popunjavanja defeka primijećeno je savršeno oblikovanje, uklapanje u defekt i prijanjanje na okolnu koštanu površinu. Uz to, poseban dizajn u obliku štrcaljke omogućio je izravan pristup i manjim defektima. Na temelju ovih činjenica može se zaključiti da je ovaj NKBM u injekcijskom obliku dizajniran za regeneraciju manjih oštećenja koja ne zahtijevaju dodatnu stabilnost volumena. S druge strane, NKBM-i u obliku blokova bili bi indicirani za mnogo složenije postupke gdje NKBM služi kao držać prostora kod većega

defekta kosti. S obzirom na to da u studiju nisu bili uključeni pacijenti s opsežnim alveolarnim koštanim defektima, primjena injekcijskog oblika NKBM-a bila je opravdana.

Nedavne *in vitro* i animalne studije posvećene su poboljšanju spomenutoga injekcijskog oblika kalcij-fosfatnih cemenata promjenom različitih čimbenika, uključujući sastav, veličinu čestica, omjer tekuće faze i praha te obrade prilikom pripreme. Mnogi organski ili anorganski aditivi, poput limunske kiseline, citozana, želatine, kolagena, natrijevoga alginata, polilaktične-koglikolne kiseline, matičnih stanica iz krvi, polimernih vlakana i njihovih primjesa, derivata matrice cakline, dodani su u prah ili tekuću fazu radi poboljšanja rukovanja i mehaničkih svojstava<sup>240,311–313</sup>.

Većina injekcijskih sintetskih biomaterijala temelji se na hidrofilnim polimerima kao što su kolagen, hijaluronska kiselina (HY) i celuloza, uz granule na bazi kalcijevog fosfata. U studiji Barbecka i sur.<sup>219</sup> pokazalo se da dodavanje HY i metilceluloze s  $\beta$ -TCP granulama rezultira nastankom NKBM-a koji ima integrativnu ulogu inducirajući kontinuiran rast stanica od periferije do jezgre, čime se povećava vaskularizacija oko implantata. Osim toga, Sa i sur.<sup>314</sup> otkrili su da ugradnja sinteriranih HA čestica milimetarske veličine značajno poboljšava osteokonduktivno ponašanje poroznoga injekcijskog cementa, što je i dokazano u ovom istraživanju.

Kalcij-fosfatni cementi bez ikakvih aditiva obično pokazuju lošu injektibilnost zbog razdvajanja tekuće i krute faze. U većini slučajeva čiste anorganske kalcij-fosfatne paste imaju tendenciju raspadanja u ranim fazama kontakta s biološkim tekućinama (krv) zbog slabe kohezije. Naposljetku, otpuštanje čestica kalcijevog fosfata u krvotok može uzrokovati određene komplikacije, pojačanom kolagulacijom krvi može doći do poremećaja u kardiovaskularnom sustavu te uzrokovati stanje kao što je plućna embolija<sup>241</sup>.

Buduća istraživanja trebala bi se usredotočiti na biomehanička svojstva ovih NKBM-a, poput kohezije tijekom stvrdnjavanja i povećanja viskoznosti različitim aditivima, tako da ubrizgani oblik biomaterijala zadovoljava sve kriterije za upotrebu u kirurškim zahvatima, tj. omogućuje lako rukovanje i kontrolu od strane terapeuta.

Zaključci koji se odnose na ispitivanu skupinu sugeriraju da augmentacija kosti injekcijskim BCP-om (maxresorb® inject) omogućuje stvaranje nove kosti i zadovoljava sve kriterije za upotrebu u kirurškim zahvatima, u ovom slučaju odgovarajućega postavljanja dentalnog implantata. Injekcijski oblik NKBM-a nudi moderniji pristup unošenja u defekt, točnije, može se točno prilagoditi u trodimenzionalni okvir, za razliku od drugih oblika, koji su obično u

obliku bloka i potrebno ih je posebno prilagoditi svakom pojedinom defektu. Na temelju dosad istraženih animalnih i studija na ljudima, uz ovu studiju, prednosti injekcijskog oblika BCP-a bolja su mogućnost rukovanja i primjena za manje defekte u smislu unošenja na teško dostupna mjesta, smanjenje vremena zahvata, čvrstoća, brza resorpcija povezana s uporabom manjih čestica i mogućnost miješanja NKBM-a s različitim dodacima (kao što je HA), koji naposljetku povećavaju interakciju između stanica.

Imunohistokemijska analiza kontrolne i ispitivane skupine provedena je u svrhu detekcije transkripcijskoga faktora *Osx*-a i BMP-2 proteina, a specifični ciljevi bili su identificirati ekspresiju *Osx*-a u remodelaciji kosti i ekspresiju BMP-2 proteina u diferencijaciji mezenhimnih stanica na koštanom bioplatima šest mjeseci nakon augmentacije. Imunohistokemijski nalazi s razinom ekspresije (*Osx* i BMP-2) pregledani su na svjetlosnom mikroskopu i semikvantitativno procijenjeni od strane iskusnoga patologa koji je prema jačini obojenosti dodijelio razine od 0 – 3 „pluseva“ na način: (0 = negativno; 1 = slabo obojenje (+); 2 = umjereno obojenje (++) ; 3 = jako obojenje (+++). U obje skupine prikazana je razina jačine 3 (+++), tj. jako obojenje koja upućuje na osteokonduktivna svojstva oba NKBM-a. Reprezentativni uzorci kontrolne i ispitivane skupine te *Osx* imunohistokemijskoga bojenja prikazali su stanice s ekspresijom jačine 3 (+++) *Osx*-a u pre-osteoblastima usidrenima na granici novostvorene kosti, što upućuje na njihov prijelaz u zrele osteoblaste i osteocite. Štoviše, primijećena je i trabekularizacija nove kosti koja upućuje na kontinuiranu remodelaciju. Prateći trenutno dostupnu literaturu, prethodne studije pokazale su da je *Osx* bitan transkripcijski čimbenik u osteogenoj diferencijaciji <sup>3,27</sup>. Naime, potvrđeno je da je *Osx* uključen u diferencijaciju, sazrijevanje i aktivnost osteoblasta <sup>315</sup>, tj. njegove sposobnosti regulacije ekspresije raznih markera, odnosno proteina osteoblasta od kojih su najznačajniji osteopontin (OPN) i osteokalcin (OCN) i dr. <sup>316,317</sup>. S obzirom na navedenu ulogu *Osx*-a u novostvorenoj kosti i indukciji navedenih osteoblastičnih markera, a i na nedostatak istraživanja s kojima su uspoređivani rezultati, istraživanja sa specifičnim proteinima poput OPN-a i OCN-a koji su s pojačanom ekspresijom detektirani u novostvorenoj kosti, potvrdili su dobru integraciju između NKBM-a te osteoblasta i osteocita <sup>318–320</sup>.

S druge strane, reprezentativni uzorci kontrolne i ispitivane skupine i BMP-2 imunohistokemijskoga bojenja prikazali su stanice s ekspresijom jačine 3 (+++) BMP-2, uglavnom prisutnoga u zonama u kojima se nastavila diferencijacija mezenhimnih stanica u pre-osteoblaste koje upućuju na obnavljanje, tj. regeneraciju oštećenoga tkiva. Sukladno literaturi, BMP-2 je protein koji djeluje kao snažan osteogeni faktor i promotor diferencijacije

osteoblasta eksprimiran i u sličnim studijama s ovom vrstom NKBM-a koje potvrđuju dobivene rezultate<sup>307,318</sup>. Imunohistokemijska analiza s ova dva protutijela obrađena je na samo par uzoraka u kontrolnoj i ispitivanoj skupini, a dobiveni rezultati bez statističke analize ne mogu u potpunosti omogućiti konkretan zaključak. No, semikvantitativna analiza transkripcijskoga faktora *Osx*-a i BMP-2 proteina na histološkim uzorcima potvrđuje njihovu ulogu u osteogenoj diferencijaciji što je u skladu s prethodno objavljenim studijama.

Ova studija uspoređivala je dva NKBM-a koja se koriste u augmentaciji alveolarnog grebena: Bio-Oss®-a i maxresorb® injecta. Histopatološke, histomorfometrijske i imunohistokemijske analize pokazale su usporedive rezultate za ove NKBM-e te su dokazale da je maxresorb® inject isto tako prikladan i uspješan kao NKBM za augmentaciju alveolarnog grebena, a iz vrijednosti t-testova vidljivo je kako ne postoji statistički značajna razlika između ispitivane i kontrolne grupe po pitanju novostvorene kosti, zaostatnoga biomaterijala i mekoga tkiva. Time su potvrđene hipoteze da injekcijski bifazni kalcijev fosfat pri augmentaciji alveolarnog grebena u komparaciji s anorganskom goveđom kosti postiže približno jednak učinak u postotku novostvorene kosti te da injekcijski bifazni kalcijev fosfat u usporedbi s anorganskom goveđom kosti pri augmentaciji alveolarnog grebena ima jednaku histokompatibilnost.

Potrebno je istaknuti prednosti ove studije. Studija je provedena kao randomizirana kontrolirana klinička studija na ljudima koja je uspoređivala kvantitativnu, kvalitativnu i imunohistokemijsku analizu dva NKBM-a. Zaključci su dakle ograničeni na usporedbu ukupnih ishoda između skupina, a ne usporedbu pojedinačnih komponenata između skupina. Histomorfometrijska, histološka i imunohistokemijska analiza i korištenje standardiziranoga besplatnog programa uz detaljan opis uzoraka omogućili su reprodukciju metodologije i usporedbu dobivenih rezultata s budućim studijama. Svi ispitanici u studiji prošli su standardizirani protokol u pogledu operativnih postupaka i vremena od koštane augmentacije do uzimanja biopsije. Međutim, zbog male količine obrađenih uzoraka, posebno u imunohistokemijskoj analizi, daljnja klinička ispitivanja s većim uzorkom i dužim vremenom praćenja mogu poslužiti prije konačnih izjava u tom pogledu.

Bez obzira na neka metodološka ograničenja, usporedivi rezultati dobiveni korištenjem injekcijskog bifaznog kalcijeva fosfata u odnosu na alternativu zlatnom standardu tj. anorganski goveđi ksenograft, pružaju obećavajući ishod u svrhu augmentacije alveolarnog grebena nakon ekstrakcije zuba te konačne ugradnje dentalnog implantata.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Injekcijski bifazni kalcijev fosfat pri augmentaciji alveolarnog grebena u komparaciji s anorganskom goveđom kosti postiže približno jednak učinak u postotku novostvorene kosti.
2. Injekcijski bifazni kalcijev fosfat u usporedbi s anorganskom goveđom kosti pri augmentaciji alveolarnog grebena ima jednaku histokompatibilnost.
3. Ne postoji statistički značajna razlika između ispitivane i kontrolne grupe po pitanju novostvorene kosti.
4. Ne postoji statistički značajna razlika između ispitivane i kontrolne grupe po pitanju zaostatnoga biomaterijala.
5. Ne postoji statistički značajna razlika između ispitivane i kontrolne grupe po pitanju mekoga tkiva.
6. Kvalitativna analiza oba NKBM-a pokazala je sposobnost NKBM-a za obnavljanje oštećenoga tkiva, tj. osteoblasta na granici s novostvorenom kosti i zaostatnim biomaterijalom, osteocita u novostvorenoj kosti i Howshipovih lakuna u koštanoj gređici s krvnom žilom koja upućuje na integraciju biomaterijala i novostvorene kosti. Stanice monocitno-makrofagnoga sustava primijećene su samo oko zaostatnoga biomaterijala gdje upućuju na njegovu resorpciju.
7. Imunohistokemijska ekspresija transkripcijskoga faktora *Osx* primijećena je u pre-osteoblastima usidrenima na granici novostvorene kosti, što upućuje na njihov prijelaz u zrele osteoblaste i osteocite uz trabekularizacija nove kosti, tj. kontinuiranu remodelaciju.
8. Imunohistokemijska ekspresija BMP-2 proteina primijećena je u zonama u kojima se nastavila diferencijacija mezenhimnih stanica u pre-osteoblaste što upućuje na obnavljanje, tj. regeneraciju oštećenoga tkiva.

## 7. LITERATURA

1. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(3). doi:10.2215/CJN.04151206
2. Okamoto K, Nakashima T, Shinohara M, Negishi-Koga T, Komatsu N, Terashima A, Sawa S, Nitta T, Takayanagi H. Osteoimmunology: The conceptual framework unifying the immune and skeletal systems. *Physiol Rev*. 2017;97:1295-1349. doi:10.1152/physrev.00036.2016
3. Ono T, Nakashima T. Oral bone biology. *J Oral Biosci*. 2022;64(1):8-17. doi:10.1016/j.job.2022.01.008
4. Devlin H, Hoyland J, Newall JF, Ayad S. Trabecular Bone Formation in the Healing of the Rodent Molar Tooth Extraction Socket. *J Bone Miner Res*. 1997;12(12):2061-2067.
5. Stranding S. Gray's Anatomy, 39th Edition: The Anatomical Basis of Clinical Practice. *American Journal of Neuroradiology*. 2005;26(10).
6. Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater*. 2008;15:53-76. doi:10.22203/ECM.V015A05
7. Ortega N, Behonick DJ, Werb Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol*. 2004;14(2):86-93. doi:10.1016/J.TCB.2003.12.003
8. Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000;16:191-220. doi:10.1146/ANNUREV.CELLBIO.16.1.191
9. Hayashi M, Ono T, Nakashima T. Signaling in osteoblast differentiation. *Encyclopedia of Bone Biology*. 2020:416-426. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.11182-1
10. Rankin S, Lennon M. Bone augmentation in oral implantology. *British Dental Journal* 2007 203:2. 2007;203(2):112-112. doi:10.1038/bdj.2007.643
11. Karaplis A. Embryonic Development of Bone and the Molecular Regulation of Intramembranous and Endochondral Bone Formation. *Principles of Bone Biology*. 2002:33-58. doi:10.1016/B978-012098652-1/50105-0

12. Nefussi JR, Brami G, Modrowski D, Obœuf M, Forest N. Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997;45(4):493-503. doi:10.1177/002215549704500402
13. Dixon PM, du Toit N. Dental anatomy. *Equine Dentistry*. 2011:51-76. doi:10.1016/B978-0-7020-2980-6.00005-2
14. Gulabivala K, Ng YL. Tooth organogenesis, morphology and physiology. *Endodontics: Fourth Edition*. 2014:2-32. doi:10.1016/B978-0-7020-3155-7.00001-1
15. Chu TMG, Liu SSY, Babler WJ. Craniofacial Biology, Orthodontics, and Implants. *Basic and Applied Bone Biology*. 2014:225-242. doi:10.1016/B978-0-12-416015-6.00011-3
16. Hughes FJ. Periodontium and Periodontal Disease. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. 2015:433-444. doi:10.1016/B978-0-12-397157-9.00038-2
17. Einhorn TA, Lee CA. Bone regeneration: new findings and potential clinical applications. *J Am Acad Orthop Surg*. 2001;9(3):157-165. doi:10.5435/00124635-200105000-00002
18. Amler MH, Johnson PL, Salman I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. *J Am Dent Assoc*. 1960;61(1):32-44. doi:10.14219/JADA.ARCHIVE.1960.0152
19. Al-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res*. 2008;87(2):107-118. doi:10.1177/154405910808700215
20. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect*. 1996;45:371-386.
21. Marks SC, Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat*. 1988;183(1):1-44. doi:10.1002/AJA.1001830102
22. Candelieri GA, Liu F, Aubin JE. Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires. *Bone*. 2001;28(4):351-361. doi:10.1016/S8756-3282(01)00410-0



23. Noble BS, Reeve J. Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;159(1-2):7-13. doi:10.1016/S0303-7207(99)00174-4
24. Kogianni G, Noble BS. The biology of osteocytes. *Curr Osteoporos Rep.* 2007;5(2):81-86. doi:10.1007/S11914-007-0007-Z
25. Yang X, Karsenty G. Transcription factors in bone: developmental and pathological aspects. *Trends Mol Med.* 2002;8(7):340-345. doi:10.1016/S1471-4914(02)02340-7
26. Ducy P, Karsenty G. Genetic control of cell differentiation in the skeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10(5):614-619. doi:10.1016/S0955-0674(98)80037-9
27. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 2002;108(1):17-29. doi:10.1016/S0092-8674(01)00622-5
28. Hojo H, Ohba S, He X, Lai LP, McMahon AP. Sp7/Osterix Is Restricted to Bone-Forming Vertebrates where It Acts as a Dlx Co-factor in Osteoblast Specification. *Dev Cell.* 2016;37(3):238-253. doi:10.1016/J.DEVCEL.2016.04.002
29. Liu Q, Li M, Wang S, Xiao Z, Xiong Y, Wang G. Recent Advances of Osterix Transcription Factor in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:601224. doi:10.3389/FCELL.2020.601224
30. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet.* 2003;4(8):638-649. doi:10.1038/NRG1122
31. Bruzzaniti A, Baron R. Molecular regulation of osteoclast activity. *Rev Endocr Metab Disord.* 2006;7(1-2):123-139. doi:10.1007/S11154-006-9009-X
32. Ono T, Nakashima T. Recent advances in osteoclast biology. *Histochem Cell Biol.* 2018;149(4):325-341. doi:10.1007/S00418-018-1636-2
33. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect Tissue Res.* 2018;59(2):99-107. doi:10.1080/03008207.2017.1290085

34. Ono T, Hayashi M, Sasaki F, Nakashima T. RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond. *Inflamm Regen*. 2020;40(1). doi:10.1186/S41232-019-0111-3
35. Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001;12(1):9-18. doi:10.1016/S1359-6101(00)00030-7
36. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2001;16(6):1004-1014. doi:10.1359/JBMR.2001.16.6.1004
37. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 2006;12(1):17-25. doi:10.1016/J.MOLMED.2005.11.007
38. Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity*. 2019;50(4):778-795. doi:10.1016/J.IMMUNI.2019.03.012
39. Jimi E, Nakamura I, Duong LT, Ikebe T, Takahashi N, Rodan GA, Suda T. Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. *Exp Cell Res*. 1999;247(1):84-93. doi:10.1006/EXCR.1998.4320
40. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin TJ, Suda T. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med*. 2000;191(2):275-285. doi:10.1084/JEM.191.2.275
41. Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem*. 2000;275(7):4858-4864. doi:10.1074/JBC.275.7.4858
42. Lopes D, Martins-Cruz C, Oliveira MB, Mano JF. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. *Biomaterials*. 2018;185:240-275. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2018.09.028

43. Young MF. Skeletal biology: Where matrix meets mineral. *Matrix Biol.* 2016;52-54:1-6. doi:10.1016/J.MATBIO.2016.04.003
44. Hidalgo-Bastida LA, Cartmell SH. Mesenchymal stem cells, osteoblasts and extracellular matrix proteins: enhancing cell adhesion and differentiation for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(4):405-412. doi:10.1089/TEN.TEB.2009.0714
45. Halper J, Kjaer M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv Exp Med Biol.* 2014;802:31-47. doi:10.1007/978-94-007-7893-1\_3
46. Alford AI, Kozloff KM, Hankenson KD. Extracellular matrix networks in bone remodeling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015;65:20-31. doi:10.1016/J.BIOCEL.2015.05.008
47. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol 2000.* 2000;24(1):99-126. doi:10.1034/J.1600-0757.2000.2240106.X
48. Matalová E, Lungová V, Sharpe P. Development of Tooth and Associated Structures. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences.* 2015:335-346. doi:10.1016/B978-0-12-397157-9.00030-8
49. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1092:385-396. doi:10.1196/ANNALS.1365.035
50. Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche Introduction and historical perspective. 2005. doi:10.1182/blood-2004-06
51. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem.* 2010;285(33):25103-25108. doi:10.1074/JBC.R109.041087
52. Shiotani A, Shibasaki Y, Sasaki T. Localization of receptor activator of NFκB ligand, RANKL, in periodontal tissues during experimental movement of rat molars. *J Electron Microsc (Tokyo).* 2001;50(4):365-369. doi:10.1093/JMICRO/50.4.365

53. Oshiro T, Shiotani A, Shibasaki Y, Sasaki T. Osteoclast induction in periodontal tissue during experimental movement of incisors in osteoprotegerin-deficient mice. *Anat Rec.* 2002;266(4):218-225. doi:10.1002/AR.10061
54. Mogi M, Otagoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res.* 2004;83(2):166-169. doi:10.1177/154405910408300216
55. Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord.* 2001;2(1):81-94. doi:10.1023/A:1010011209064
56. Harada SI, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003;423(6937):349-355. doi:10.1038/NATURE01660
57. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *Journal of molecular medicine .* 2001;79(5-6):243-253. doi:10.1007/S001090100226
58. Li Y, Ling J, Jiang Q. Inflammasomes in Alveolar Bone Loss. *Front Immunol.* 2021;12. doi:10.3389/FIMMU.2021.691013
59. Tompkins KA. The osteoimmunology of alveolar bone loss. *Connect Tissue Res.* 2016;57(2):69-90. doi:10.3109/03008207.2016.1140152
60. Bénateau H, Chatellier A, Caillot A, Diep D, Kün-Darbois JD, Veysi re A. Temporomandibular ankylosis. *Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale.* 2016;117(4):245-255. doi:10.1016/J.REVSTO.2016.07.001
61. Mostafa Mostafa I, Abdelkader Mohamed A, Abdelrahman Moustapha A, Hassib Nehal F, MostafaSayed Inas S, B. Ahmed Nermeen El-Moataz, Abdelfattah Maha I, Mehrez Mennatahllah I, Khalil Yasmin M, El-Badry Tarek H, Abouzaid Maha R. Frequent genetic disorders associated with missing teeth and revisiting classification of anodontia: a retrospective study. *Middle East Journal of Medical Genetics.* 2021;10(2):95. doi:10.4103/MXE.MXE\_1\_22
62. Jonasson G, Ryth n M. Alveolar bone loss in osteoporosis: a loaded and cellular affair? *Clin Cosmet Investig Dent.* 2016;8:95-103. doi:10.2147/CCIDE.S92774

63. Erdoğan Ö, Shafer DM, Taxel P, Freilich MA. A review of the association between osteoporosis and alveolar ridge augmentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104(6):738.e1-738.e13. doi:10.1016/J.TRIPLEO.2007.04.008
64. Munhoz L, Takahashi DY, Nishimura DA, Ramos EADA, Tenorio JDR, Arita ES. Do Patients with Osteoporosis Have Higher Risk to Present Reduced Alveolar Ridge Height? An Imaging Analysis. *Indian J Dent Res.* 2019;30(5):747-750. doi:10.4103/IJDR.IJDR\_497\_18
65. Yu T, Klein OD. Molecular and cellular mechanisms of tooth development, homeostasis and repair. *Development.* 2020;147(2). doi:10.1242/DEV.184754
66. Ulm C, Tepper G, Blahout R, Rausch-Fan X, Hienz S, Matejka M. Characteristic features of trabecular bone in edentulous mandibles. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(6):594-600. doi:10.1111/J.1600-0501.2008.01701.X
67. Lindhe J, Cecchinato D, Bressan EA, Toia M, Araújo MG, Liljenberg B. The alveolar process of the edentulous maxilla in periodontitis and non-periodontitis subjects. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(1):5-11. doi:10.1111/J.1600-0501.2011.02205.X
68. Juodzbaly G, Kubilius M. Clinical and radiological classification of the jawbone anatomy in endosseous dental implant treatment. *J Oral Maxillofac Res.* 2013;4(2). doi:10.5037/JOMR.2013.4202
69. Trisi P, Rao W. Bone classification: clinical-histomorphometric comparison. *Clin Oral Implants Res.* 1999;10(1):1-7. doi:10.1034/J.1600-0501.1999.100101.X
70. Salvi GE, Bosshardt DD, Lang NP, Abrahamsson I, Berglundh T, Lindhe J, Ivanovski S, Donos N. Temporal sequence of hard and soft tissue healing around titanium dental implants. *Periodontol 2000.* 2015;68(1):135-152. doi:10.1111/PRD.12054
71. Laney WR, Jemt T, Harris D, Henry PJ, Krogh PH, Polizzi G, Zarb GA, Herrmann I. Osseointegrated implants for single-tooth replacement: progress report from a multicenter prospective study after 3 years. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997;9(1):49-54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8150512>
72. van Velzen FJJ, Ofec R, Schulten EAJM, ten Bruggenkate CM. 10-year survival rate and the incidence of peri-implant disease of 374 titanium dental implants with a SLA

- surface: a prospective cohort study in 177 fully and partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(10):1121-1128. doi:10.1111/CLR.12499
73. Goiato MC, dos Santos DM, Santiago JF, Moreno A, Pellizzer EP. Longevity of dental implants in type IV bone: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014;43(9):1108-1116. doi:10.1016/J.IJOM.2014.02.016
  74. González-García R, Monje F. Is micro-computed tomography reliable to determine the microstructure of the maxillary alveolar bone? *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(7):730-737. doi:10.1111/J.1600-0501.2012.02478.X
  75. Kuchler U, Pfingstner G, Busenlechner D, Dobsak T, Reich K, Heimel P, Gruber R. Osteocyte lacunar density and area in newly formed bone of the augmented sinus. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(3):285-289. doi:10.1111/J.1600-0501.2012.02533.X
  76. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM, Takayanagi H. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med.* 2011;17(10):1231-1234. doi:10.1038/NM.2452
  77. Hughes JM, Petit MA. Biological underpinnings of frost's mechanostat thresholds: The important role of osteocytes. *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions.* 2010;10(2):128-135.
  78. Hernandez CJ, Majeska RJ, Schaffler MB. Osteocyte density in woven bone. *Bone.* 2004;35(5):1095-1099. doi:10.1016/J.BONE.2004.07.002
  79. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem.* 2003;88(5):873-884. doi:10.1002/JCB.10435
  80. Brandi ML, Collin-Osdoby P. Vascular biology and the skeleton. *J Bone Miner Res.* 2006;21(2):183-192. doi:10.1359/JBMR.050917
  81. Galindo-Moreno P, Padial-Molina M, Fernández-Barbero JE, Mesa F, Rodríguez-Martínez D, O'Valle F. Optimal microvessel density from composite graft of autogenous maxillary cortical bone and anorganic bovine bone in sinus augmentation: influence of clinical variables. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(2):221-227. doi:10.1111/J.1600-0501.2009.01827.X

82. Khan SN, Bostrom MPG, Lane JM. Bone growth factors. *Orthop Clin North Am.* 2000;31(3):375-387. doi:10.1016/S0030-5898(05)70157-7
83. Ono T, Takayanagi H. Osteoimmunology in Bone Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep.* 2017;15(4):367-375. doi:10.1007/S11914-017-0381-0
84. Knight MN, Hankenson KD. Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2013;2(6):306-316. doi:10.1089/WOUND.2012.0420
85. Schlundt C, Schell H, Goodman SB, Vunjak-Novakovic G, Duda GN, Schmidt-Bleek K. Immune modulation as a therapeutic strategy in bone regeneration. *J Exp Orthop.* 2015;2(1):1-10. doi:10.1186/S40634-014-0017-6
86. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(1):45-54. doi:10.1038/NRRHEUM.2014.164
87. Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(2):179-186. doi:10.1089/TEN.TEB.2008.0038
88. Jones RE, Salhotra A, Robertson KS, Ransom RC, Foster DS, Shah HN, Quarto N, Wan DC, Longaker MT. Skeletal Stem Cell-Schwann Cell Circuitry in Mandibular Repair. *Cell Rep.* 2019;28(11):2757-2766.e5. doi:10.1016/J.CELREP.2019.08.021
89. Cameron JA, Milner DJ, Lee JS, Cheng J, Fang NX, Jasiuk IM. Employing the biology of successful fracture repair to heal critical size bone defects. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;367:113-132. doi:10.1007/82-2012-291
90. Gerber HP, Ferrara N. Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med.* 2000;10(5):223-228. doi:10.1016/S1050-1738(00)00074-8
91. El-Jawhari JJ, Jones E, Giannoudis P. The roles of immune cells in bone healing; what we know, do not know and future perspectives. *Injury.* 2016;47(11):2399-2406. doi:10.1016/J.INJURY.2016.10.008
92. Baht GS, Vi L, Alman BA. The Role of the Immune Cells in Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep.* 2018;16(2):138-145. doi:10.1007/S11914-018-0423-2/FIGURES/1
93. Alexander KA, Chang MK, Maylin ER, Kohler T, Müller R, Wu AC, Van Rooijen N, Sweet MJ, Hume DA, Raggatt LJ, Pettit AR. Osteal macrophages promote in vivo

- intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model. *J Bone Miner Res.* 2011;26(7):1517-1532. doi:10.1002/JBMR.354
94. Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg.* 2004;187(5):11-16. doi:10.1016/S0002-9610(03)00296-4
95. Schlundt C, El Khassawna T, Serra A, Dienelt A, Wendler S, Schell H, van Rooijen N, Radbruch A, Lucius R, Hartmann S, Duda GN, Schmidt-Bleek K. Macrophages in bone fracture healing: Their essential role in endochondral ossification. *Bone.* 2018;106:78-89. doi:10.1016/J.BONE.2015.10.019
96. Raggatt LJ, Wullschleger ME, Alexander KA, Wu AC, Millard SM, Kaur S, Maugham ML, Gregory LS, Steck R, Pettit AR. Fracture healing via periosteal callus formation requires macrophages for both initiation and progression of early endochondral ossification. *Am J Pathol.* 2014;184(12):3192-3204. doi:10.1016/J.AJPATH.2014.08.017
97. Brown BN, Londono R, Tottey S, Zhang L, Kukla KA, Wolf MT, Daly KA, Reing JE, Badylak SF. Macrophage phenotype as a predictor of constructive remodeling following the implantation of biologically derived surgical mesh materials. *Acta Biomater.* 2012;8(3):978-987. doi:10.1016/J.ACTBIO.2011.11.031
98. Spiller KL, Anfang RR, Spiller KJ, Ng J, Nakazawa KR, Daulton JW, Vunjak-Novakovic G. The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds. *Biomaterials.* 2014;35(15):4477-4488. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2014.02.012
99. Kovach TK, Dighe AS, Lobo PI, Cui Q. Interactions between MSCs and immune cells: implications for bone healing. *J Immunol Res.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/752510
100. Dighe AS, Yang S, Madhu V, Balian G, Cui Q. Interferon gamma and T cells inhibit osteogenesis induced by allogeneic mesenchymal stromal cells. *J Orthop Res.* 2013;31(2):227-234. doi:10.1002/JOR.22212
101. Toben D, Schroeder I, El Khassawna T, Mehta M, Hoffmann JE, Frisch JT, Schell H, Lienau J, Serra A, Radbruch A, Duda GN. Fracture healing is accelerated in the absence of the adaptive immune system. *J Bone Miner Res.* 2011;26(1):113-124. doi:10.1002/JBMR.185



102. Reinke S, Geissler S, Taylor WR, Schmidt-Bleek K, Juelke K, Schwachmeyer V, Dahne M, Hartwig T, Akyüz L, Meisel C, Unterwalder N, Singh NB, Reinke P, Haas NP, Volk HD, Duda GN. Terminally differentiated CD8<sup>+</sup> T cells negatively affect bone regeneration in humans. *Sci Transl Med.* 2013;5(177). doi:10.1126/SCITRANSLMED.3004754
103. Gruber R. Osteoimmunology: Inflammatory osteolysis and regeneration of the alveolar bone. *J Clin Periodontol.* 2019;46(21):52-69. doi:10.1111/jcpe.13056
104. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis P. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury.* 2005;36(12):1392-1404. doi:10.1016/J.INJURY.2005.07.019
105. Nefussi JR, Casamajor P, Serfaty R, Bolle M, Hugly C, Forest N. Activated adult human alveolar bone cells: a new model of matrix mineralization. *Eur J Oral Sci.* 1998;106(1):424-428. doi:10.1111/J.1600-0722.1998.TB02209.X
106. Pavalko FM, Norvell SM, Burr DB, Turner CH, Duncan RL, Bidwell JP. A model for mechanotransduction in bone cells: the load-bearing mechanosomes. *J Cell Biochem.* 2003;88(1):104-112. doi:10.1002/JCB.10284
107. Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int.* 1995;57(5):344-358. doi:10.1007/BF00302070
108. Al Nazer R, Lanovaz J, Kawalilak C, Johnston JD, Kontulainen S. Direct in vivo strain measurements in human bone-a systematic literature review. *J Biomech.* 2012;45(1):27-40. doi:10.1016/J.JBIOMECH.2011.08.004
109. Sokos D, Everts V, de Vries TJ. Role of periodontal ligament fibroblasts in osteoclastogenesis: a review. *J Periodontol Res.* 2015;50(2):152-159. doi:10.1111/JRE.12197
110. Shenoy VK. Single tooth implants: Pretreatment considerations and pretreatment evaluation. *Journal of Interdisciplinary Dentistry.* 2012;2(3):149. doi:10.4103/2229-5194.113239
111. Van der Weijden F, Dell'Acqua F, Slot DE. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2009;36(12):1048-1058. doi:10.1111/J.1600-051X.2009.01482.X

112. Tan WL, Wong TLT, Wong MCM, Lang NP. A systematic review of post-extraction alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(SUPPL. 5):1-21. doi:10.1111/j.1600-0501.2011.02375.x
113. Atwood DA, Coy WA. Clinical, cephalometric, and densitometric study of reduction of residual ridges. *J Prosthet Dent.* 1971;26(3):280-295. doi:10.1016/0022-3913(71)90070-9
114. Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2003;23:313-323.
115. Cohn SA. Disuse atrophy of the periodontium in mice following partial loss of function. *Arch Oral Biol.* 1966;11(1):95-105. doi:10.1016/0003-9969(66)90120-8
116. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 2005;32(2):212-218. doi:10.1111/J.1600-051X.2005.00642.X
117. Irinakis T, Tabesh M. Preserving the Socket Dimensions with Bone Grafting in Single Sites: An Esthetic Surgical Approach When Planning Delayed Implant Placement. *J Oral Implant.* 2006;33:917-922.
118. Araújo MG, Sukekava F, Wennström JL, Lindhe J. Ridge alterations following implant placement in fresh extraction sockets: an experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 2005;32(6):645-652. doi:10.1111/J.1600-051X.2005.00726.X
119. Botticelli D, Berglundh T, Lindhe J. Hard-tissue alterations following immediate implant placement in extraction sites. *J Clin Periodontol.* 2004;31(10):820-828. doi:10.1111/J.1600-051X.2004.00565.X
120. Hürzeler M, Kirsch A, Ackermann K, Quiñones C. Reconstruction of the severely resorbed maxilla with dental implants in the augmented maxillary sinus: a 5-year clinical investigation. *Int J Oral Maxillofac Implants .* 1996;11(4):466-475.
121. Chanavaz M. Maxillary sinus: anatomy, physiology, surgery, and bone grafting related to implantology--eleven years of surgical experience (1979-1990). *J Oral Implantol.* 1990;16(3):199-209.

122. Peleg M, Mazor Z, Garg AK. Augmentation grafting of the maxillary sinus and simultaneous implant placement in patients with 3 to 5 mm of residual alveolar bone height. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14(4):549-556.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10453671>
123. Clayman L. Implant reconstruction of the bone-grafted maxilla: Review of the literature and presentation of 8 cases. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2006;64(4):674-682. doi:10.1016/j.joms.2005.12.026
124. Darby I, Chen S, de Poi R. Ridge preservation: what is it and when should it be considered. *Aust Dent J*. 2008;53(1):11-21. doi:10.1111/J.1834-7819.2007.00008.X
125. Nevins M, Mellonig JT, Clem DS, Reiser GM, Buser DA. Implants in regenerated bone: long-term survival. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1998;18(1):34-45.  
Accessed August 19, 2022. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9558555>
126. Froum S, Cho SC, Rosenberg E, Rohrer M, Tarnow D. Histological comparison of healing extraction sockets implanted with bioactive glass or demineralized freeze-dried bone allograft: a pilot study. *J Periodontol*. 2002;73(1):94-102.  
doi:10.1902/JOP.2002.73.1.94
127. Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: histomorphometric evaluations at 9 months. *J Periodontol*. 2000;71(6):1015-1023. doi:10.1902/JOP.2000.71.6.1015
128. Serino G, Biancu S, Iezzi G, Piattelli A. Ridge preservation following tooth extraction using a polylactide and polyglycolide sponge as space filler: a clinical and histological study in humans. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14(5):651-658. doi:10.1034/J.1600-0501.2003.00970.X
129. Fiorellini JP, Howell TH, Cochran D, Malmquist J, Lilly LC, Spagnoli D, Toljanic J, Jones A, Nevins M. Randomized study evaluating recombinant human bone morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation. *J Periodontol*. 2005;76(4):605-613. doi:10.1902/JOP.2005.76.4.605
130. Iasella JM, Greenwell H, Miller RL, Hill M, Drisko C, Bohra AA, Scheetz JP. Ridge preservation with freeze-dried bone allograft and a collagen membrane compared to extraction alone for implant site development: a clinical and histologic study in humans. *J Periodontol*. 2003;74(7):990-999. doi:10.1902/JOP.2003.74.7.990

131. Barone A, Aldini NN, Fini M, Giardino R, Calvo Guirado JL, Covani U. Xenograft versus extraction alone for ridge preservation after tooth removal: a clinical and histomorphometric study. *J Periodontol.* 2008;79(8):1370-1377.  
doi:10.1902/JOP.2008.070628
132. Mardas N, Chadha V, Donos N. Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: a randomized, controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(7):688-698.  
doi:10.1111/J.1600-0501.2010.01918.X
133. Horváth A, Mardas N, Mezzomo LA, Needleman IG, Donos N. Alveolar ridge preservation. A systematic review. *Clin Oral Investig.* 2013;17(2):341-363.  
doi:10.1007/S00784-012-0758-5
134. Ten Heggeler JM, Slot DE, Van der Weijden GA. Effect of socket preservation therapies following tooth extraction in non-molar regions in humans: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22(8):779-788. doi:10.1111/J.1600-0501.2010.02064.X
135. Vignoletti F, Matesanz P, Rodrigo D, Figuero E, Martin C, Sanz M. Surgical protocols for ridge preservation after tooth extraction. A systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(5):22-38. doi:10.1111/J.1600-0501.2011.02331.X
136. Vittorini Orgeas G, Clementini M, de Risi V, de Sanctis M. Surgical techniques for alveolar socket preservation: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013;28(4):1049-1061. doi:10.11607/JOMI.2670
137. Mardas N, Trullenque-Eriksson A, MacBeth N, Petrie A, Donos N. Does ridge preservation following tooth extraction improve implant treatment outcomes: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26:180-201. doi:10.1111/CLR.12639
138. Hämmerle CHF, Araújo MG, Simion M. Evidence-based knowledge on the biology and treatment of extraction sockets. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(5):80-82.  
doi:10.1111/J.1600-0501.2011.02370.X
139. Cho YD, Ku Y. Guided bone regeneration using K-incision technique. *J Periodontal Implant Sci.* 2018;48(3):193-200. doi:10.5051/JPIS.2018.48.3.193

140. Kumar P, Vinitha B, Fathima G. Bone grafts in dentistry. *J Pharm Bioallied Sci.* 2013;5(1):125-127. doi:10.4103/0975-7406.113312
141. Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature* 2004 428:6982. 2004;428(6982):487-492. doi:10.1038/nature02388
142. Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg.* 1996;35(5):413-417. doi:10.1016/S1067-2516(96)80061-5
143. Salyer KE, Taylor DP. Bone grafts in craniofacial surgery. *Craniofacial Trauma Reconstr.* 2009;2(3):27-35. doi:10.1055/S-0029-1215875
144. Bhatt RA, Rozental TD. Bone graft substitutes. *Hand Clin.* 2012;28(4):457-468. doi:10.1016/J.HCL.2012.08.001
145. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater.* 2017;2(4):224-247. doi:10.1016/J.BIOACTMAT.2017.05.007
146. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg.* 2001;71(6):354-361. doi:10.1046/J.1440-1622.2001.02128.X
147. Fernandez de Grado G, Keller L, Idoux-Gillet Y, Wagner Q, Musset AM, Benkirane-Jessel N, Bornert F, Offner D. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *J Tissue Eng.* 2018;9:2041731418776819. doi:10.1177/2041731418776819
148. Kao ST, Scott DD. A review of bone substitutes. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2007;19(4):513-521. doi:10.1016/J.COMS.2007.06.002
149. Misch CE, Dietsch F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent.* 1993;2(3):158-167. doi:10.1097/00008505-199309000-00003
150. Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M, Heiland M, Wolff KD, Smeets R. Current trends and future perspectives of bone substitute materials - from space holders to innovative biomaterials. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012;40(8):706-718. doi:10.1016/J.JCMS.2012.01.002
151. Roberts TT, Rosenbaum AJ. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis.* 2012;8(4):114-124. doi:10.4161/ORG.23306

152. Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M, Heiland M, Wolff KD, Smeets R. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*. 2006;27(17):3230-3237. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.01.031
153. Berube P, Yang Y, Carnes DL, Stover RE, Boland EJ, Ong JL. The Effect of Sputtered Calcium Phosphate Coatings of Different Crystallinity on Osteoblast Differentiation. *J Periodontol*. 2005;76(10):1697-1709. doi:10.1902/JOP.2005.76.10.1697
154. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol*. 2008;20(2):86-100. doi:10.1016/J.SMIM.2007.11.004
155. Marin E, Boschetto F, Pezzotti G. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. *J Biomed Mater Res A*. 2020;108(8):1617-1633. doi:10.1002/JBM.A.36930
156. Raut HK, Das R, Liu Z, Liu X, Ramakrishna S. Biocompatibility of Biomaterials for Tissue Regeneration or Replacement. *Biotechnol J*. 2020;15(12). doi:10.1002/BIOT.202000160
157. Buser D, Martin W, Belser UC. Optimizing esthetics for implant restorations in the anterior maxilla: anatomic and surgical considerations. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004;19:43-61. Accessed August 21, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15635945/>
158. Buser D, Chen ST, Weber H, Belser U. Early implant placement following single-tooth extraction in the esthetic zone: biologic rationale and surgical procedures. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2008;28(5):441-451.
159. Hämmerle CHF, Chiantella GC, Karring T, Lang NP. The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Clin Oral Implants Res*. 1998;9(3):151-162. doi:10.1034/J.1600-0501.1998.090302.X
160. Lee J, Byun H, Madhurakkat Perikamana SK, Lee S, Shin H. Current Advances in Immunomodulatory Biomaterials for Bone Regeneration. *Adv Healthc Mater*. 2019;8(4):e1801106. doi:10.1002/ADHM.201801106
161. Tejero-Trujeque R. Understanding the final stages of wound contraction. *J Wound Care*. 2001;10(7):259-264. doi:10.12968/JOWC.2001.10.7.26339

162. Yamada M, Egusa H. Current bone substitutes for implant dentistry. *J Prosthodont Res.* 2018;62(2):152-161. doi:10.1016/j.jpor.2017.08.010
163. Koide M, Osaki K, Konishi J, Oyamada K, Katakura T, Takahashi A, Yoshizato K. A new type of biomaterial for artificial skin: dehydrothermally cross-linked composites of fibrillar and denatured collagens. *J Biomed Mater Res.* 1993;27(1):79-87. doi:10.1002/JBM.820270111
164. Kihara H, Shiota M, Yamashita Y, Kasugai S. Biodegradation process of alpha-TCP particles and new bone formation in a rabbit cranial defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006;79(2):284-291. doi:10.1002/JBM.B.30540
165. Yamada M, Shiota M, Yamashita Y, Kasugai S. Histological and histomorphometrical comparative study of the degradation and osteoconductive characteristics of alpha- and beta-tricalcium phosphate in block grafts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007;82(1):139-148. doi:10.1002/JBM.B.30715
166. Horch HH, Sader R, Pautke C, Neff A, Deppe H, Kolk A. Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006;35(8):708-713. doi:10.1016/J.IJOM.2006.03.017
167. 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(3):137-150. doi:10.1034/J.1600-0501.1998.090301.X
168. Mayer Y, Zigdon-Giladi H, Machtei EE. Ridge Preservation Using Composite Alloplastic Materials: A Randomized Control Clinical and Histological Study in Humans. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2016;18(6):1163-1170. doi:10.1111/cid.12415
169. Karabuda C, Ozdemir O, Tosun T, Anil A, Olgaç V. Histological and clinical evaluation of 3 different grafting materials for sinus lifting procedure based on 8 cases. *J Periodontol.* 2001;72(10):1436-1442.
170. Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Rossi F, Perale G. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *J Clin Periodontol.* 2019;46(21):92-102. doi:10.1111/JCPE.13058

171. Pikos MA. Block autografts for localized ridge augmentation: Part II. The posterior mandible. *Implant Dent.* 2000;9(1):67-75. doi:10.1097/00008505-200009010-00012
172. Deshpande S, Deshmukh J, Deshpande S, Khatri R, Deshpande S. Vertical and horizontal ridge augmentation in anterior maxilla using autograft, xenograft and titanium mesh with simultaneous placement of endosseous implants. *J Indian Soc Periodontol.* 2014;18(5):661-665. doi:10.4103/0972-124X.142469
173. Misch CM. Autogenous bone: is it still the gold standard? *Implant Dent.* 2010;19(5):361. doi:10.1097/ID.0B013E3181F8115B
174. Bernardi S, Macchiarelli G, Bianchi S. Autologous Materials in Regenerative Dentistry: Harvested Bone, Platelet Concentrates and Dentin Derivates. *Molecules.* 2020;25(22). doi:10.3390/MOLECULES25225330
175. Misch CM. Use of the mandibular ramus as a donor site for onlay bone grafting. *J Oral Implantol.* 2000;26(1):42-49. doi:10.1563/1548-1336(2000)026<0042:UOTMRA>2.3.CO;2
176. Smith BR, Rajchel JL, Waite DE, Read L. Mandibular ramus anatomy as it relates to the medial osteotomy of the sagittal split ramus osteotomy. *J Oral Maxillofac Surg.* 1991;49(2):112-116. doi:10.1016/0278-2391(91)90095-4
177. Johansson B, Grepe A, Wannfors K, Hirsch JM. A clinical study of changes in the volume of bone grafts in the atrophic maxilla. *Dentomaxillofacial Radiology.* 2001;30(3):157-161. doi:10.1038/sj.dmfr.4600601
178. Lindhe J, Cecchinato D, Donati M, Tomasi C, Liljenberg B. Ridge preservation with the use of deproteinized bovine bone mineral. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(7):786-790. doi:10.1111/clr.12170
179. Helder MN, van Esterik FAS, Kwehandjaja MD, Ten Bruggenkate CM, Klein-Nulend J, Schulten EAJM. Evaluation of a new biphasic calcium phosphate for maxillary sinus floor elevation: Micro-CT and histomorphometrical analyses. *Clin Oral Implants Res.* 2018;29(5):488-498. doi:10.1111/clr.13146
180. Ohayon L. Maxillary Sinus Floor Augmentation Using Biphasic Calcium Phosphate: A Histologic and Histomorphometric Study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014;29(5):1143-1148. doi:10.11607/jomi.3422



181. Von Arx T, Buser D. Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: A clinical study with 42 patients. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(4):359-366. doi:10.1111/j.1600-0501.2005.01234.x
182. Martinez A, Balboa O, Gasamans I, Otero-Cepeda XL, Guitian F. Deproteinized bovine bone vs. beta-tricalcium phosphate as bone graft substitutes: Histomorphometric longitudinal study in the rabbit cranial vault. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(6):623-632. doi:10.1111/clr.12349
183. Jensen SS, Brogгинi N, Hjørtning-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(3):237-243. doi:10.1111/j.1600-0501.2005.01257.x
184. Franco M, Viscioni A, Rigo L, Guidi R, Zollino I, Avantaggiato A, Carinci F. Wide Diameter Implants Inserted in Jaws Grafted with Homologue Bone. *Acta Stomatol Croat.* 2008;42(3):273-282.
185. Chiapasco M, Zaniboni M, Boisco M. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(2):136-159. doi:10.1111/J.1600-0501.2006.01357.X
186. Bostrom MPG, Seigerman DA. The clinical use of allografts, demineralized bone matrices, synthetic bone graft substitutes and osteoinductive growth factors: a survey study. *HSS J.* 2005;1(1):9-18. doi:10.1007/S11420-005-0111-5
187. Hoexter DL. Bone regeneration graft materials. *J Oral Implantol.* 2002;28(6):290-294.
188. Ratnayake JTB, Mucalo M, Dias GJ. Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2017;105(5):1285-1299. doi:10.1002/JBM.B.33651
189. Ratnayake JT, Ross ED, Dias GJ, Shanafelt KM, Taylor SS, Gould ML, Guan G, Cathro PR. Preparation, characterisation and in-vitro biocompatibility study of a bone graft developed from waste bovine teeth for bone regeneration. *Mater Today Commun.* 2020;22. doi:10.1016/J.MTCOMM.2019.100732

190. Allen F. Bone biology, harvesting and grafting for dental implants: rationale and clinical applications. *Br Dent J*. 2005;199(1):59-59. doi:10.1038/sj.bdj.4812564
191. Nomura T, Katz JL, Powers MP, Saito C. Evaluation of the micromechanical elastic properties of potential bone-grafting materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;73(1):29-34. doi:10.1002/JBM.B.30201
192. Cornu O, Banse X, Docquier PL, Luyckx S, Delloye C. Effect of freeze-drying and gamma irradiation on the mechanical properties of human cancellous bone. *J Orthop Res*. 2000;18(3):426-431. doi:10.1002/JOR.1100180314
193. Schwartz Z, Mellonig JT, Carnes DL Jr, de la Fontaine J, Cochran DL, Dean DD, Boyan BD. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J Periodontol*. 1996;67(9):918-926. doi:10.1902/JOP.1996.67.9.918
194. Wei L, Miron RJ, Shi B, Zhang Y. Osteoinductive and Osteopromotive Variability among Different Demineralized Bone Allografts. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015;17(3):533-542. doi:10.1111/CID.12118
195. Winkler T, Sass FA, Duda GN, Schmidt-Bleek K. A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge. *Bone Joint Res*. 2018;7(3):232-243. doi:10.1302/2046-3758.73.BJR-2017-0270.R1
196. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res*. 2014;9(1). doi:10.1186/1749-799X-9-18
197. Kwon KJ, Seok H. Silk Protein-Based Membrane for Guided Bone Regeneration. *Applied Sciences* 2018, Vol 8, Page 1214. 2018;8(8):1214. doi:10.3390/APP8081214
198. Sheikh Z, Hamdan N, Ikeda Y, Grynpas M, Ganss B, Glogauer M. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomater Res*. 2017;21(1). doi:10.1186/S40824-017-0095-5
199. Coughlin MJ, Grimes JS, Kennedy MP. Coralline hydroxyapatite bone graft substitute in hindfoot surgery. *Foot Ankle Int*. 2006;27(1):19-22. doi:10.1177/107110070602700104

200. Kim Y, Nowzari H, Rich SK. Risk of prion disease transmission through bovine-derived bone substitutes: a systematic review. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013;15(5):645-653. doi:10.1111/J.1708-8208.2011.00407.X
201. Oliveira G, Pignaton TB, De Almeida Ferreira CE, Peruzzo LC, Marcantonio E. New bone formation comparison in sinuses grafted with anorganic bovine bone and  $\beta$ -TCP. *Clin Oral Implants Res*. 2019;30(19):483. doi:10.1111/CLR.438\_13509
202. Tadic D, Epple M. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials*. 2004;25(6):987-994. doi:10.1016/S0142-9612(03)00621-5
203. Accorsi-Mendonça T, Conz MB, Barros TC, de Sena LÁ, Soares G de A, Granjeiro JM. Physicochemical characterization of two deproteinized bovine xenografts. *Braz Oral Res*. 2008;22(1):5-10. doi:10.1590/S1806-83242008000100002
204. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32(12):3233-3243. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.01.057
205. Ong JL, Hoppe CA, Cardenas HL, Cavin R, Carnes DL, Sogal A, Raikar GN. Osteoblast precursor cell activity on HA surfaces of different treatments. *J Biomed Mater Res*. 1998;39(2):176-183. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199802)39:2<176::AID-JBM2>3.0.CO;2-M
206. Thorwarth M, Wehrhan F, Srouf S, Schultze-Mosgau S, Felszeghy E, Bader RD, Schlegel KA. Evaluation of substitutes for bone: comparison of microradiographic and histological assessments. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2007;45(1):41-47. doi:10.1016/J.BJOMS.2006.03.013
207. Benezra Rosen V, Hobbs LW, Spector M. The ultrastructure of anorganic bovine bone and selected synthetic hydroxyapatites used as bone graft substitute materials. *Biomaterials*. 2002;23(3):921-928. doi:10.1016/S0142-9612(01)00204-6
208. Chackartchi T, Iezzi G, Goldstein M, Klinger A, Soskolne A, Piattelli A, Shapira L. Sinus floor augmentation using large (1–2 mm) or small (0.25–1 mm) bovine bone mineral particles: a prospective, intra-individual controlled clinical, micro-computerized tomography and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res*. 2011;22(5):473-480. doi:10.1111/J.1600-0501.2010.02032.X

209. Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 1997;8(2):117-124. doi:10.1034/J.1600-0501.1997.080206.X
210. Urban IA, Ravidà A, Saleh MHA, Galli M, Lozada J, Farkasdi S, Wang HL. Long-term crestal bone changes in implants placed in augmented sinuses with minimal or moderate remaining alveolar bone: A 10-year retrospective case-series study. *Clin Oral Implants Res.* 2021;32(1):60-74. doi:10.1111/CLR.13680
211. Galindo-Moreno P, Abril-García D, Carrillo-Galvez AB, Zurita F, Martín-Morales N, O'Valle F, Padial-Molina M. Maxillary sinus floor augmentation comparing bovine versus porcine bone xenografts mixed with autogenous bone graft. A split-mouth randomized controlled trial. *Clin Oral Implants Res.* 2022;33(5):524-536. doi:10.1111/CLR.13912
212. Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials.* 2001;22(12):1599-1606. doi:10.1016/S0142-9612(00)00312-4
213. Mellonig JT. Donor selection, testing, and inactivation of the HIV virus in freeze-dried bone allografts. *Pract Periodontics Aesthet Dent.* 1995;7(6):13-22. Accessed August 30, 2022. <https://europepmc.org/article/med/9002884>
214. Perić Kačarević Z, Kavehei F, Houshmand A, Franke J, Smeets R, Rimashevskiy D, Wenisch S, Schnettler R, Jung O, Barbeck M. Purification processes of xenogeneic bone substitutes and their impact on tissue reactions and regeneration. *International Journal of Artificial Organs.* 2018;41(11):789-800. doi:10.1177/0391398818771530
215. Torres J, Tamimi F, Alkhraisat MH, Manchón A, Linares R, Prados-Frutos JC, Hernández G, López Cabarcos E. Platelet-rich plasma may prevent titanium-mesh exposure in alveolar ridge augmentation with anorganic bovine bone. *J Clin Periodontol.* 2010;37(10):943-951. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01615.x
216. Schmitt CM, Doering H, Schmidt T, Lutz R, Neukam FW, Schlegel KA. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann® BoneCeramic, Bio-Oss®, Puros®, and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(5):576-585. doi:10.1111/j.1600-0501.2012.02431.x

217. Piattelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G, Piattelli A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14(6):835-840.
218. Lorenz J, Barbeck M, Kirkpatrick C, Sader R, Lerner H, Ghanaati S. Injectable Bone Substitute Material on the Basis of  $\beta$ -TCP and Hyaluronan Achieves Complete Bone Regeneration While Undergoing Nearly Complete Degradation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2018;33(3):636-644. doi:10.11607/jomi.6026
219. Barbeck M, Jung O, Smeets R, Gosau M, Schnettler R, Rider P, Houshmand A, Korzinskas T. Implantation of an injectable bone substitute material enables integration following the principles of guided bone regeneration. *In Vivo (Brooklyn)*. 2020;34(2):557-568. doi:10.21873/invivo.11808
220. Ku JK, Hong I, Lee BK, Yun PY, Lee JK. Dental alloplastic bone substitutes currently available in Korea. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2019;45(2):51-67. doi:10.5125/jkaoms.2019.45.2.51
221. Al-Nawas B, Schiegnitz E. Augmentation procedures using bone substitute materials or autogenous bone - a systematic review and meta-analysis. *Eur J Oral Implantol*. 2014;7(2):219-234.
222. Onișor-Gligor F, Juncar M, Câmpian RS, Băciuț G, Bran S, Băciuț MF. Subantral bone grafts, a comparative study of the degree of resorption of alloplastic versus autologous grafts. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 2015;56(3):1003-1009.
223. Kakar A, Rao BHS, Hegde S, Deshpande N, Lindner A, Nagursky H, Patney A, Mahajan H. Ridge preservation using an in situ hardening biphasic calcium phosphate ( $\beta$ -TCP/HA) bone graft substitute—a clinical, radiological, and histological study. *Int J Implant Dent*. 2017;3(1):25. doi:10.1186/s40729-017-0086-2
224. Kakar A, Rao BHS, Hegde S, Deshpande N, Lindner A, Nagursky H, Patney A, Mahajan H. Histological and histomorphometric human results of HA-Beta-TCP 30/70 compared to three different biomaterials in maxillary sinus augmentation at 6 months: A preliminary report. *Biomed Res Int*. 2015;2015: 156850. doi:10.1155/2015/156850
225. Kattimani VS, Kondaka S, Lingamaneni KP. Hydroxyapatite—Past, Present, and Future in Bone Regeneration: *Bone Tissue Regen Insights*. 2016;7:36138. doi:10.4137/BTRIS36138

226. Dewi AH, Ana ID. The use of hydroxyapatite bone substitute grafting for alveolar ridge preservation, sinus augmentation, and periodontal bone defect: A systematic review. *Heliyon*. 2018;4(10). doi:10.1016/J.HELIYON.2018.E00884
227. Funda G, Taschieri S, Bruno GA, Grecchi E, Paolo S, Girolamo D, Del Fabbro M. Nanotechnology Scaffolds for Alveolar Bone Regeneration. *Materials (Basel)*. 2020;13(1). doi:10.3390/MA13010201
228. Wang H, Leeuwenburgh SCG, Li Y, Jansen JA. The Use of Micro- and Nanospheres as Functional Components for Bone Tissue Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2012;18(1):24. doi:10.1089/TEN.TEB.2011.0184
229. Mygind T, Stiehler M, Baatrup A, Li H, Zou X, Flyvbjerg A, Kassem M, Bünger C. Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials*. 2007;28(6):1036-1047. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.10.003
230. Sánchez-Salcedo S, Arcos D, Vallet-Regí M. Upgrading Calcium Phosphate Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Key Eng Mater*. 2008;377:19-42. doi:10.4028/WWW.SCIENTIFIC.NET/KEM.377.19
231. Horowitz R, Leventis M, Rohrer M, Prasad H. Bone grafting: history, rationale, and selection of materials and techniques. *Compend Contin Educ Dent*. 2014;35(4):1-6.
232. Suneelkumar C, Datta K, Srinivasan MR, Kumar ST. Biphasic calcium phosphate in periapical surgery. *Journal of Conservative Dentistry*. 2008;11(2):92. doi:10.4103/0972-0707.44059
233. Stavropoulos A, Windisch P, Szendrői-Kiss D, Peter R, Gera I, Sculean A. Clinical and histologic evaluation of granular Beta-tricalcium phosphate for the treatment of human intrabony periodontal defects: a report on five cases. *J Periodontol*. 2010;81(2):325-334. doi:10.1902/JOP.2009.090386
234. Nakajima Y, Fiorellini J, Kim D, Weber H. Regeneration of standardized mandibular bone defects using expanded polytetrafluoroethylene membrane and various bone fillers. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2007;27(2):151-159.

235. Gallinetti S, Canal C, Ginebra MP. Development and Characterization of Biphasic Hydroxyapatite/ $\beta$ -TCP Cements. *J Am Ceram Soc.* 2014;97(4):1065-1073. doi:10.1111/JACE.12861
236. Saikia KC, Bhattacharya TD, Bhuyan SK, Talukdar DJ, Saikia SP, Jitesh P. Calcium phosphate ceramics as bone graft substitutes in filling bone tumor defects. *Indian J Orthop.* 2008;42(2):169-172. doi:10.4103/0019-5413.39588
237. Spivak JM, Hasharoni A. Use of hydroxyapatite in spine surgery. *European spine journal* . 2001;10(2):197-204. doi:10.1007/S005860100286
238. Lee KS, Chang JS, Kim JH, You CK, Kwon H, Lee DH. Resorption Mechanism of Hydroxyapatite and  $\beta$ -Tricalcium Phosphate Coating Layer. *Key Eng Mater.* 2009;396-398:81-84. doi:10.4028/WWW.SCIENTIFIC.NET/KEM.396-398.81
239. Sariibrahimoglu K, Wolke JGC, Leeuwenburgh SCG, Yubao L, Jansen JA. Injectable biphasic calcium phosphate cements as a potential bone substitute. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2014;102(3):415-422. doi:10.1002/jbm.b.33018
240. Fujioka-Kobayashi M, Schaller B, Zhang Y, Pippenger BE, Miron RJ. In vitro evaluation of an injectable biphasic calcium phosphate (BCP) carrier system combined with recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP)-9. *Biomed Mater Eng.* 2017;28(3):293-304. doi:10.3233/BME-171675
241. Liu W, Zhang J, Rethore G, Khairoun K, Pilet P, Tancret F, Bouler JM, Weiss P. A novel injectable, cohesive and toughened Si-HPMC (silanized-hydroxypropyl methylcellulose) composite calcium phosphate cement for bone substitution. *Acta Biomater.* 2014;10(7):3335-3345. doi:10.1016/j.actbio.2014.03.009
242. Barbeck M, Hoffmann C, Sader R, Peters F, Hübner WD, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S. Injectable bone substitute based on  $\beta$ -TCP combined with a hyaluronan-containing hydrogel contributes to regeneration of a critical bone size defect towards restitutio ad integrum. *Journal of Oral Implantology.* 2016;42(2):127-137. doi:10.1563/aaid-joi-D-14-00203
243. Hwang D, Wang HL. Medical contraindications to implant therapy: part I: absolute contraindications. *Implant Dent.* 2006;15(4):353-360. doi:10.1097/01.ID.0000247855.75691.03

244. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013;310(20):2191-2194. doi:10.1001/JAMA.2013.281053
245. Field A. *Discovering Statistics 3rd edition*. SAGE Publications. Published online 2009.
246. Atieh MA, Alsabeeha NH, Payne AG, Duncan W, Faggion CM, Esposito M. Interventions for replacing missing teeth: alveolar ridge preservation techniques for dental implant site development. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;2015(5). doi:10.1002/14651858.CD010176.PUB2
247. Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*. 2003;30(9):809-818. doi:10.1034/J.1600-051X.2003.00366.X
248. Araújo MG, Silva CO, Misawa M, Sukekava F. Alveolar socket healing: what can we learn? *Periodontol 2000*. 2015;68(1):122-134. doi:10.1111/PRD.12082
249. Couso-Queiruga E, Stuhr S, Tattan M, Chambrone L, Avila-Ortiz G. Post-extraction dimensional changes: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2021;48(1):126-144. doi:10.1111/JCPE.13390
250. Moreno AR, Magdaleno MO, Islas MM, Mercado JAV, Del Pilar Goldaracena Azuara M, Cruz ER, Ramírez GFR. Postextraction Alveolar Preservation and Use of the Crown of the Extracted Tooth as a Temporary Restoration. *Case Rep Dent*. 2019;2019. doi:10.1155/2019/4262067
251. Pagni G, Pellegrini G, Giannobile W, Rasperini G. Postextraction alveolar ridge preservation: biological basis and treatments. *Int J Dent*. 2012;2012. doi:10.1155/2012/151030
252. Al Qabbani A, Al Kawas S, A Razak NH, Al Bayatti SW, Enezei HH, Samsudin AR, Sheikh Ab Hamid S. Three-Dimensional Radiological Assessment of Alveolar Bone Volume Preservation Using Bovine Bone Xenograft. *J Craniofac Surg*. 2018;29(2):e203-e209. doi:10.1097/SCS.0000000000004263
253. Lee JH, Yi GS, Lee JW, Kim DJ. Physicochemical characterization of porcine bone-derived grafting material and comparison with bovine xenografts for dental



- applications. *J Periodontal Implant Sci.* 2017;47(6):388-401.  
doi:10.5051/JPIS.2017.47.6.388
254. Richardson CR, Mellonig JT, Brunsvold MA, McDonnell HT, Cochran DL. Clinical evaluation of Bio-Oss: a bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J Clin Periodontol.* 1999;26(7):421-428.  
doi:10.1034/J.1600-051X.1999.260702.X
255. Matsumoto MA, Filho HN, Francischone aE, Consolaro A. Microscopic analysis of reconstructed maxillary alveolar ridges using autogenous bone grafts from the chin and iliac crest. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002;17(4):507-16.  
doi:10.2/JQUERY.MIN.JS
256. Glowacki J, Altobelli D, Mulliken JB. Fate of mineralized and demineralized osseous implants in cranial defects. *Calcif Tissue Int.* 1981;33(1):71-76.  
doi:10.1007/BF02409414
257. Alonso N, de Almeida OM, Jorgetti V, Amarante MTJ. Cranial versus iliac onlay bone grafts in the facial skeleton: a macroscopic and histomorphometric study. *J Craniofac Surg.* 1995;6(2):113-118. doi:10.1097/00001665-199503000-00006
258. Barone A, Toti P, Quaranta A, Alfonsi F, Cucchi A, Negri B, Di Felice R, Marchionni S, Calvo-Guirado JL, Covani U, Nannmark U. Clinical and Histological changes after ridge preservation with two xenografts: preliminary results from a multicentre randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2017;44(2):204-214.  
doi:10.1111/JCPE.12655
259. Knöfler W, Barth T, Graul R, Krampe D. Retrospective analysis of 10,000 implants from insertion up to 20 years-analysis of implantations using augmentative procedures. *Int J Implant Dent.* 2016;2(1). doi:10.1186/S40729-016-0061-3
260. Serrano Méndez CA, Lang NP, Caneva M, Ramírez Lemus G, Mora Solano G, Botticelli D. Comparison of allografts and xenografts used for alveolar ridge preservation. A clinical and histomorphometric RCT in humans. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2017;19(4):608-615. doi:10.1111/CID.12490
261. Trimmel B, Gede N, Hegyi P, Szakács Z, Mezey GA, Varga E, Kivovics M, Hanák L, Rumbus Z, Szabó G. Relative performance of various biomaterials used for maxillary

- sinus augmentation: A Bayesian network meta-analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2021;32(2):135-153. doi:10.1111/CLR.13690
262. Schwartz-Arad D, Levin L, Sigal L. Surgical success of intraoral autogenous block onlay bone grafting for alveolar ridge augmentation. *Implant Dent.* 2005;14(2):131-138. doi:10.1097/01.ID.0000165031.33190.0D
263. Calasans-Maia MD, Mourão CF De AB, Alves ATNN, Sartoretto SC, De Uzeda MJPG, Granjeiro JM. Maxillary Sinus Augmentation with a New Xenograft: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015;17(2):586-593. doi:10.1111/cid.12289
264. Čandrlić M, Tomas M, Karl M, Malešić L, Včev A, Perić Kačarević Ž, Matijević M. Comparison of Injectable Biphasic Calcium Phosphate and a Bovine Xenograft in Socket Preservation: Qualitative and Quantitative Histologic Study in Humans. *Int J Mol Sci.* 2022;23(5):2539. doi:10.3390/ijms23052539
265. Jelusic D, Zirk ML, Fienitz T, Plancak D, Puhar I, Rothamel D. Monophasic  $\beta$ -TCP vs. biphasic HA/ $\beta$ -TCP in two-stage sinus floor augmentation procedures – a prospective randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(10):e175-e183. doi:10.1111/clr.12983
266. Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss® or Straumann® Bone Ceramic: Histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(8):796-803. doi:10.1111/j.1600-0501.2008.01565.x
267. Mangano C, Perrotti V, Shibli JA, Mangano F, Ricci L, Piattelli A, Iezzi G. Maxillary sinus grafting with biphasic calcium phosphate ceramics: clinical and histologic evaluation in man. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013;28(1):51-56. doi:10.11607/JOMI.2667
268. Oh JS, Seo YS, Lee GJ, You JS, Kim SG. A Comparative Study with Biphasic Calcium Phosphate to Deproteinized Bovine Bone in Maxillary Sinus Augmentation: A Prospective Randomized and Controlled Clinical Trial. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2019;34(1):233-242. doi:10.11607/JOMI.7116
269. Menezes JD, Pereira RDS, Bonardi JP, Griza GL, Okamoto R, Hochuli-Vieira E. Bioactive glass added to autogenous bone graft in maxillary sinus augmentation: a

- prospective histomorphometric, immunohistochemical, and bone graft resorption assessment. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:e20170296. doi:10.1590/1678-7757-2017-0296
270. Nizam N, Eren G, Akcalı A, Donos N. Maxillary sinus augmentation with leukocyte and platelet-rich fibrin and deproteinized bovine bone mineral: A split-mouth histological and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res.* 2018;29(1):67-75. doi:10.1111/CLR.13044
271. Cömert Kılıç S, Güngörmüş M, Parlak SN. Histologic and histomorphometric assessment of sinus-floor augmentation with beta-tricalcium phosphate alone or in combination with pure-platelet-rich plasma or platelet-rich fibrin: A randomized clinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2017;19(5):959-967. doi:10.1111/CID.12522
272. Artzi Z, Nemcovsky CE, Tal H, Dayan D. Histopathological morphometric evaluation of 2 different hydroxyapatite-bone derivatives in sinus augmentation procedures: a comparative study in humans. *J Periodontol.* 2001;72(7):911-920. doi:10.1902/JOP.2001.72.7.911
273. Dos Anjos TLMR, De Molon RS, Paim PRF, Marcantonio E, Marcantonio E, Faeda RS. Implant stability after sinus floor augmentation with deproteinized bovine bone mineral particles of different sizes: a prospective, randomized and controlled split-mouth clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2016;45(12):1556-1563. doi:10.1016/j.ijom.2016.09.004
274. Jensen S, Aaboe M, Pinholt E, Hjørtting-Hansen E, Melsen F, Ruyter IE. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996;11(1):55-66.
275. McAllister B, Margolin M, Cogan A, Taylor M, Wollins J. Residual lateral wall defects following sinus grafting with recombinant human osteogenic protein-1 or Bio-Oss in the chimpanzee. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1998;18(3):227-239.
276. McAllister B, Margolin M, Cogan A, Buck D, Hollinger J, Lynch S. Eighteen-month radiographic and histologic evaluation of sinus grafting with anorganic bovine bone in the chimpanzee. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14(3):361-368.

277. Mah J, Hung J, Wang J, Salih E. The efficacy of various alloplastic bone grafts on the healing of rat calvarial defects. *Eur J Orthod.* 2004;26(5):475-482.  
doi:10.1093/EJO/26.5.475
278. Scarano A, Piattelli A, Pecora G, Petrizzi L, Valbonetti L, Varasano V, Iezzi G. A histomorphometric comparison of anorganic bovine bone (ABB) and calcium sulfate (CaS) used in sinus augmentation procedures: a study in sheep. *Journal of Osseointegration.* 2009;2(2):75-81. doi:10.23805/JO.2010.02.02.01
279. Aludden H, Mordenfeld A, Dahlin C, Hallman M, Starch-Jensen T. Histological and histomorphometrical outcome after lateral guided bone regeneration augmentation of the mandible with different ratios of deproteinized bovine bone mineral and autogenous bone. A preclinical in vivo study. *Clin Oral Implants Res.* 2020;31(10):1025-1036.  
doi:10.1111/CLR.13649
280. Zitzmann NU, Schärer P, Marinello CP, Schüpbach P, Berglundh T. Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss: a histologic study in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2001;21(3):288-295.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11490406>
281. Amoian B, Moudi E, Majidi MS, Ali Tabatabaei SM. A histologic, histomorphometric, and radiographic comparison between two complexes of CenoBoen/CenoMembrane and Bio-Oss/Bio-Gide in lateral ridge augmentation: A clinical trial. *Dent Res J (Isfahan).* 2016;13(5):446-453. doi:10.4103/1735-3327.192304
282. Scarano A, Degidi M, Iezzi G, Pecora G, Piattelli M, Orsini G, Caputi S, Perrotti V, Mangano C, Piattelli A. Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. *Implant Dent.* 2006;15(2):197-207. doi:10.1097/01.ID.0000220120.54308.F3
283. Froum S, Wallace S, Cho SC, Elian N, Tarnow D. Histomorphometric comparison of a biphasic bone ceramic to anorganic bovine bone for sinus augmentation: 6- to 8-month postsurgical assessment of vital bone formation. A pilot study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2008;28(3):273-281.
284. Lorenz J, Kubesch A, Korzinskas T, Barbeck M, Landes C, Sader RA, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S. TRAP-Positive Multinucleated Giant Cells Are Foreign Body Giant Cells

- Rather Than Osteoclasts: Results From a Split-Mouth Study in Humans. *J Oral Implantol.* 2015;41(6):e257-e266. doi:10.1563/AAID-JOI-D-14-00273
285. Fienitz T, Moses O, Klemm C, Happe A, Ferrari D, Kreppel M, Ormianer Z, Gal M, Rothamel D. Histological and radiological evaluation of sintered and non-sintered deproteinized bovine bone substitute materials in sinus augmentation procedures. A prospective, randomized-controlled, clinical multicenter study. *Clin Oral Investig.* 2017;21(3):787-794. doi:10.1007/S00784-016-1829-9
286. Sivolella S, Botticelli D, Prasad S, Ricci S, Bressan E, Prasad H. Evaluation and comparison of histologic changes and implant survival in extraction sites immediately grafted with two different xenografts: A randomized clinical pilot study. *Clin Oral Implants Res.* 2020;31(9):825-835. doi:10.1111/CLR.13626
287. Pignatton TB, Spin-Neto R, Ferreira CE De A, Martinelli CB, De Oliveira GJPL, Marcantonio E. Remodelling of sinus bone grafts according to the distance from the native bone: A histomorphometric analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2020;31(10):959-967. doi:10.1111/CLR.13639
288. Santos A, Botelho J, Machado V, Borrecho G, Proença L, Mendes JJ, Mascarenhas P, Alcoforado G. Autogenous Mineralized Dentin versus Xenograft granules in Ridge Preservation for Delayed Implantation in Post-extraction Sites: A Randomized controlled clinical trial with an 18 months follow-up. *Clin Oral Implants Res.* 2021;32(8):905-915. doi:10.1111/CLR.13765
289. Özkan Y, Akoğlu B, Kulak-Özkan Y. Maxillary sinus floor augmentation using bovine bone grafts with simultaneous implant placement: a 5-year prospective follow-up study. *Implant Dent.* 2011;20(6):455-459. doi:10.1097/ID.0B013E3182386CBC
290. Tetè S, Mastrangelo F, Carone L, Nargi E, Costanzo G, Vinci R, Burrano F, Tortorici S, Dadorante V, Caciagli F, Traini T, Gherlone E, Caraffa A, Salini V, Conti P, Ciccarelli R. Morphostructural analysis of human follicular stem cells on highly porous bone hydroxyapatite scaffold. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2007;20(4):819-826. doi:10.1177/039463200702000418
291. Traini T, Degidi M, Sammons R, Stanley P, Piattelli A. Histologic and elemental microanalytical study of anorganic bovine bone substitution following sinus floor

- augmentation in humans. *J Periodontol.* 2008;79(7):1232-1240.  
doi:10.1902/JOP.2008.070504
292. Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012;41(1):114-120.  
doi:10.1016/J.IJOM.2011.08.010
293. Uzbek UH, Rahman SAB, Alam MK, Gillani SW. Bone Forming Potential of An-Organic Bovine Bone Graft: A Cone Beam CT study. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(12):73-76. doi:10.7860/JCDR/2014/8557.5352
294. Aral A, Yalçın S, Karabuda ZC, Anl A, Jansen JA, Mutlu Z. Injectable calcium phosphate cement as a graft material for maxillary sinus augmentation: An experimental pilot study. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(6):612-617.  
doi:10.1111/j.1600-0501.2007.01518.x
295. Wolff KD, Swaid S, Nolte D, Böckmann RA, Hölzle F, Müller-Mai C. Degradable injectable bone cement in maxillofacial surgery: Indications and clinical experience in 27 patients. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery.* 2004;32(2):71-79.  
doi:10.1016/j.jcms.2003.12.002
296. Gauthier O, Boix D, Grimandi G, Aguado E, Bouler JM, Weiss P, Daculsi G. A New Injectable Calcium Phosphate Biomaterial for Immediate Bone Filling of Extraction Sockets: A Preliminary Study in Dogs. *J Periodontol.* 1999;70(4):375-383.  
doi:10.1902/jop.1999.70.4.375
297. Boix D, Gauthier O, Guicheux J, Pilet P, Weiss P, Grimandi G, Daculsi G. Alveolar Bone Regeneration for Immediate Implant Placement Using an Injectable Bone Substitute: An Experimental Study in Dogs. *J Periodontol.* 2004;75(5):663-671.  
doi:10.1902/jop.2004.75.5.663
298. Struillou X, Boutigny H, Badran Z, Fellah BH, Gauthier O, Sourice S, Pilet P, Rouillon T, Layrolle P, Weiss P, Soueidan A. Treatment of periodontal defects in dogs using an injectable composite hydrogel/biphasic calcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med.* 2011;22(7):1707-1717. doi:10.1007/s10856-011-4344-1
299. Papanchev G, Georgiev T, Peev S, Arnautska H, Zgurova N, Tsvetelina BP, Dzhongova E. Comparison of the rates of bone regeneration in Sinus lift grafting with a

- Calcium-Phosphate paste between the 6th and the 9th month – A clinical case. *Scripta Scientifica Medicinae Dentalis*. 2015;1(1):41. doi:10.14748/.v1i1.635
300. Nery JC, Pereira LAVD, Guimarães GF, Scardueli CR, França FMG, Spin-Neto R, Stavropoulos A.  $\beta$ -TCP/HA with or without enamel matrix proteins for maxillary sinus floor augmentation: a histomorphometric analysis of human biopsies. *Int J Implant Dent*. 2017;3(1):18. doi:10.1186/S40729-017-0080-8
301. Flichy-Fernández AJ, Blaya-Tárraga JA, O’Valle F, Padial-Molina M, Peñarrocha-Diago M, Galindo-Moreno P. Sinus floor elevation using particulate PLGA-coated biphasic calcium phosphate bone graft substitutes: A prospective histological and radiological study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019;21(5):895-902. doi:10.1111/cid.12741
302. Mastrangelo F, Nargi E, Carone L, Dolci M, Caciagli F, Ciccarelli R, De Lutiis MA, Karapanou V, Shaik BY, Conti P, Teté S. Tridimensional response of human dental follicular stem cells onto a synthetic hydroxyapatite scaffold. *Journal of Health Science*. 2008;54(2):154-161. doi:10.1248/JHS.54.154
303. Stevens B, Yang Y, Mohandas A, Stucker B, Nguyen KT. A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008;85(2):573-582. doi:10.1002/jbm.b.30962
304. Ripamonti U, Richter PW, Nilen RWN, Renton L. The induction of bone formation by smart biphasic hydroxyapatite tricalcium phosphate biomimetic matrices in the non-human primate *Papio ursinus*. *J Cell Mol Med*. 2008;12(6B):2609-2621. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00312.x
305. Khaled H, Atef M, Hakam M. Maxillary sinus floor elevation using hydroxyapatite nano particles vs tenting technique with simultaneous implant placement: A randomized clinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019;21(6):1241-1252. doi:10.1111/cid.12859
306. Georgiev T, Peev S, Arnautska H, Gencheva A, Gerdzhikov I. An Evaluation of Three-Dimensional Scans of the Time-Dependent Volume Changes in Bone Grafting Materials. *International Journal of Science and Research (IJSR)*. 2017;6(1):562-571. doi:10.21275/art20164039

307. Götz W, Gerber T, Michel B, Lossdörfer S, Henkel KO, Heinemann F. Immunohistochemical characterization of nanocrystalline hydroxyapatite silica gel (NanoBone®) osteogenesis: A study on biopsies from human jaws. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(10):1016-1026. doi:10.1111/j.1600-0501.2008.01569.x
308. Mangano C, Scarano A, Perrotti V, Iezzi G PA. Maxillary Sinus Augmentation Using an Engineered Porous Hydroxyapatite: A Clinical, Histological, and Transmission Electron Microscopy Study in Man. *J Oral Implantol.* 2007;22(6):980-986.
309. Raynaud S, Champion E, Lafon JP, Bernache-Assollant D. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio III. Mechanical properties and degradation in solution of hot pressed ceramics. *Biomaterials.* 2002;23(4):1081-1089. doi:10.1016/S0142-9612(01)00220-4
310. Weiss P, Layrolle P, Clergeau LP, Enckel B, Pilet P, Amouriq Y, Daculsi G, Giumelli B. The safety and efficacy of an injectable bone substitute in dental sockets demonstrated in a human clinical trial. *Biomaterials.* 2007;28(22):3295-3305. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.04.006
311. Mai Y, Wu H, Mai Z, Li X, Huang L, Liao H. Preliminary application of injectable calcium phosphate cement/poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres for extraction site preservation. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2014;49(3):180-183.
312. Han X, Liu H, Wang D, Su F, Zhang Y, Zhou W, Li S, Yang R. Alveolar bone regeneration around immediate implants using an injectable nHAC/CSH loaded with autogenic blood-acquired mesenchymal progenitor cells: An experimental study in the dog mandible. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2011;15(3):390-401. doi:10.1111/j.1708-8208.2011.00373.x
313. Oortgiesen DA, Walboomers XF, Bronckers AL, Meijer GJ JJA. Periodontal regeneration using an injectable bone cement combined with BMP-2 or FGF-2. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012;8(3):202-209. doi:10.1002/term
314. Sa Y, Yu N, Wolke JGC, Chanchareonsook N, Goh BT, Wang Y, Yang F, Jansen JA. Bone Response to Porous Poly(methyl methacrylate) Cement Loaded with Hydroxyapatite Particles in a Rabbit Mandibular Model. *Tissue Eng Part C Methods.* 2017;23(5):262-273. doi:10.1089/ten.tec.2016.0521



315. Ramazzotti G, Fiume R, Chiarini F, Campana G, Ratti S, Billi AM, Manzoli L, Follo MY, Suh PG, McCubrey J, Cocco L, Faenza I. Phospholipase C- $\beta$ 1 interacts with cyclin E in adipose- derived stem cells osteogenic differentiation. *Adv Biol Regul.* 2019;71:1-9. doi:10.1016/j.jbior.2018.11.001
316. Ortuño MJ, Susperregui ARG, Artigas N, Rosa JL, Ventura F. Osterix induces Colla1 gene expression through binding to Sp1 sites in the bone enhancer and proximal promoter regions. *Bone.* 2013;52(2):548-556. doi:10.1016/j.bone.2012.11.007
317. Yang Y, Huang Y, Zhang L, Zhang C. Transcriptional regulation of bone sialoprotein gene expression by Osx. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;476(4):574-579. doi:10.1016/j.bbrc.2016.05.164
318. Friedmann A, Gissel K, Konermann A, Götz W. Tissue reactions after simultaneous alveolar ridge augmentation with biphasic calcium phosphate and implant insertion— histological and immunohistochemical evaluation in humans. *Clin Oral Investig.* 2015;19(7):1595-1603. doi:10.1007/s00784-014-1385-0
319. Solakoglu Ö, Götz W, Heydecke G, Schwarzenbach H. Histological and immunohistochemical comparison of two different allogeneic bone grafting materials for alveolar ridge reconstruction: A prospective randomized trial in humans. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2019;21(5):1002-1016. doi:10.1111/cid.12824
320. Bonardi JP, Pereira RDS, Boos Lima FBDJ, Faverani LP, Griza GL, Okamoto R, Hochuli-Vieira E. Prospective and Randomized Evaluation of ChronOS and Bio-Oss in Human Maxillary Sinuses: Histomorphometric and Immunohistochemical Assignment for Runx 2, Vascular Endothelial Growth Factor, and Osteocalcin. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2018;76(2):325-335. doi:10.1016/j.joms.2017.09.020

## 8. SAŽETAK

**Ciljevi istraživanja:** Utvrditi sposobnost cijeljenja koštanih defekata alveole pri augmentaciji injekcijskim bifaznim kalcijevim fosfatom na humanim bioptatima te ga s histološkoga aspekta usporediti s anorganskom goveđom kosti. Dodatni ciljevi bili su izračunati postotak novostvorene kosti, zaostatnoga biomaterijala i mekotkivnih struktura na koštanim bioptatima šest mjeseci nakon augmentacije, kvalitativno procijeniti sposobnost nadomjesnog koštanog biomaterijala u obnavljanju oštećenoga tkiva, opisati patohistološke promjene na koštanim bioptatima šest mjeseci nakon augmentacije te imunohistokemijski identificirati ekspresiju Osx-a i BMP-2 u remodelaciji kosti i diferencijaciji mezenhimnih stanica.

**Nacrt istraživanja:** randomizirana kontrolirana klinička studija

**Ispitanici i metode:** U studiju su bila uključena 38 ispitanika randomiziranih u dvije skupine. Prvu skupinu činili su ispitanici koji su primili ispitivani nadomjesni koštani biomaterijal tj. injekcijski bifazni kalcijev fosfat, a drugu oni koji su primili alternativu zlatnom standardu, tj. goveđi ksenograft. Šest mjeseci nakon augmentacije pristupilo se biopsiji alveolarne kosti s konačnom ugradnjom dentalnog implantata. Koštani bioptati proslijeđeni su u laboratorij na kvantitativnu, kvalitativnu i imunohistokemijsku analizu.

**Rezultati:** Histopatološke, histomorfometrijske i imunohistokemijske analize pokazale su usporedive rezultate za ove nadomjesne koštane biomaterijale te su dokazale da je injekcijski bifazni kalcijev fosfat isto tako prikladan i uspješan za augmentaciju alveolarnog grebena, a iz vrijednosti t-testova vidljivo je kako ne postoji statistički značajna razlika između ispitivane i kontrolne grupe po pitanju novostvorene kosti, zaostatnoga biomaterijala i mekoga tkiva. Time je potvrđeno da injekcijski bifazni kalcijev fosfat pri augmentaciji alveolarnog grebena u komparaciji s anorganskom goveđom kosti postiže približno jednak učinak u postotku novostvorene kosti te da injekcijski bifazni kalcijev fosfat u usporedbi s anorganskom goveđom kosti ima jednaku histokompatibilnost. Također, semikvantitativna analiza ekspresije Osx-a i BMP-2 proteina potvrđuje njihovu ulogu u osteogenoj diferencijaciji.

**Zaključak:** Usporedivi rezultati dobiveni korištenjem injekcijskog bifaznog kalcijeva fosfata u odnosu na alternativu zlatnom standardu tj. anorganski goveđi ksenograft, pružaju obećavajući ishod u svrhu augmentacije alveolarnog grebena nakon ekstrakcije zuba te konačne ugradnje dentalnog implantata.

**Ključne riječi:** aloplast; augmentacija; histologija; imunohistokemija; ksenograft

## 9. SUMMARY

**Aims and Objectives:** To determine the healing ability of alveolar bone defects during augmentation with injectable biphasic calcium phosphate on human biopsies and to compare them with anorganic bovine bone from a histologic standpoint. Additional objectives were to calculate the percentage of newly formed bone, residual biomaterial, and soft tissue structures on bone biopsies six months after augmentation, to qualitatively assess the ability of the replacement bone biomaterial to restore damaged tissue, to describe pathohistological changes on bone biopsies six months after augmentation, and to immunohistochemically determine the expression of *Osx* and *BMP-2* during bone remodeling and mesenchymal cell differentiation.

**Study Design:** randomized controlled clinical trial

**Subjects and Methods:** 38 subjects randomly divided into two groups participated in the study. The first group consisted of subjects who received the tested bone substitute biomaterial, i.e., injectable biphasic calcium phosphate and the second group consisted of subjects who received an alternative to the gold standard, i.e., a bovine xenograft. Six months after augmentation, a biopsy of the alveolar bone was performed with final placement of a dental implant. The bone biopsies were sent to the laboratory for quantitative, qualitative and immunohistochemical analysis.

**Results:** The histopathological, histomorphometric and immunohistochemical analyzes gave comparable results for these substitute bone biomaterials, proving that injectable biphasic calcium phosphate is equally suitable and successful for alveolar ridge augmentation, and the t-test values show that there is no statistically significant difference between the tested and control groups in terms of newly formed bone, residual biomaterial and soft tissue. Thus, it was confirmed that injectable biphasic calcium phosphate achieves approximately the same effect in terms of the percentage of newly formed bone in augmentation of the alveolar ridge compared with anorganic bovine bone and that injectable biphasic calcium phosphate has the same histocompatibility compared with anorganic bovine bone. Semiquantitative analysis of protein expression of *Osx* and *BMP-2* confirmed their role in osteogenic differentiation.

**Conclusion:** The comparable results obtained with injectable biphasic calcium phosphate compared with the gold standard alternative, i.e., anorganic bovine xenograft, are a promising outcome for augmentation of the alveolar ridge after tooth extraction and final placement of a dental implant.

**Keywords:** alloplast; augmentation; histology; immunohistochemistry; xenograft

## 10. ŽIVOTOPIS

Matej Tomas rođen je u Osijeku 24. kolovoza 1991. godine. Nakon Osnovne škole „Grigor Vitez“ i I. Gimnazije u Osijeku završava Studij dentalne medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu 2016. godine. Nakon Fakulteta zapošljava se u Domu zdravlja Osječko – baranjske županije u kojem radi do 11. mjeseca 2019. godine nakon čega prelazi na Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek kao znanstveni novak – asistent na Katedri za dentalnu medicinu. Kontinuirano se educira u području parodontologije i oralne kirurgije. Autor je više znanstvenih i stručnih radova u međunarodnim i domaćim časopisima. Član je Hrvatske komore dentalne medicine. Aktivno sudjeluje na domaćim i inozemnim znanstvenim i stručnim skupovima te tečajevima trajnog usavršavanja za doktore dentalne medicine.

### POPIS PUBLIKACIJA

#### Originalni znanstveni rad citiran u CC (Q1, Q2, Q3, Q4)

1. Čandrlić, Marija; Perić Kačarević, Željka; Ivanišević, Zrinka; **Tomas, Matej**; Včev, Aleksandar; Faj, Dario; Matijević, Marko. Histological and Radiological Features of a Four-Phase Injectable Synthetic Bone Graft in Guided Bone Regeneration: A Case Report // International journal of environmental research and public health, 18 (2020), 1; 206, 9 doi:10.3390/ijerph18010206 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)
2. **Tomas, Matej**; Čandrlić, Marija; Juzbašić, Martina; Ivanišević, Zrinka; Matijević, Nikola; Včev, Aleksandar; Cvijanović Pelosa, Olga; Matijević, Marko; Perić Kačarević, Željka. Synthetic Injectable Biomaterials for Alveolar Bone Regeneration in Animal and Human Studies // Materials, 14 (2021), 11; 2858-2858 doi:10.3390/ma14112858 (međunarodna recenzija, pregledni rad, znanstveni)
3. Jerbić Radetić, Ana Terezija; Zoričić Cvek, Sanja; **Tomas, Matej**; Erjavec, Igor; Oguić, Matko; Perić Kačarević, Željka; Cvijanović Pelosa, Olga. CSBD Healing in Rats after Application of Bovine Xenogeneic Biomaterial Enriched with Magnesium Alloy // International journal of molecular sciences, 22 (2021), 16; 9089, 16 doi:10.3390/ijms22169089 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

4. Talapko, Jasminka; Frauenheim, Erwin; Juzbašić, Martina; **Tomas, Matej**; Matić, Suzana; Jukić, Melita; Samardžić, Marija; Škrlec, Ivana. Legionella pneumophila—Virulence Factors and the Possibility of Infection in Dental Practice // *Microorganisms*, 10 (2022), 2; 255, 15 doi:10.3390/microorganisms10020255 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

5. Čandrlić, Marija; **Tomas, Matej**; Karl, Matej; Malešić, Lucija; Včev, Aleksandar; Perić Kačarević, Željka; Matijević, Marko. Comparison of Injectable Biphasic Calcium Phosphate and a Bovine Xenograft in Socket Preservation: Qualitative and Quantitative Histologic Study in Humans // *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (2022), 5; 2539, 14 doi:10.3390/ijms23052539 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

6. Talapko, Jasminka; Meštrović, Tomislav; Juzbašić, Martina; **Tomas, Matej**; Erić, Suzana; Horvat Aleksijević, Lorena; Bekić, Sanja; Schwarz, Dragan; Matić, Suzana; Neuberg, Marijana; Škrlec, Ivana. Antimicrobial Peptides—Mechanisms of Action, Antimicrobial Effects and Clinical Applications // *Antibiotics*, 11 (2022), 10; 1417, 17 doi:10.3390/antibiotics11101417 (međunarodna recenzija, pregledni rad, znanstveni)

7. **Tomas, Matej**; Karl, Matej; Čandrlić, Marija; Matijević, Marko; Juzbašić, Martina; Pelosa, Olga Cvijanović; Radetić, Ana Terezija Jerbić; Kuiš, Davor; Vidaković, Bruno; Ivanišević, Zrinka; Kačarević, Željka. A Histologic, Histomorphometric, and Immunohistochemical Evaluation of Anorganic Bovine Bone and Injectable Biphasic Calcium Phosphate in Humans: A Randomized Clinical Trial // *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (2023), 6; 24065539, 19 doi:10.3390/ijms24065539 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

#### **Originalni znanstveni rad citiran u ISI (Q3, Q4), ali ne i u CC**

1. Čandrlić, Marija; Dvorski, Manuela; Matijević, Marko; Petrović, Đorđe; Matijević, Nikola; Juzbašić, Martina; Ivanišević, Zrinka; **Tomas, Matej**. Knowledge and Attitudes of Patients about Dental Implants as a Treatment Option after Tooth Extraction // *Collegium antropologicum*, 45 (2021), 2; 121-133 doi:10.5671/ca.45.2.8 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

#### **Originalni znanstveni rad citiran u drugim bazama podataka**

1. Juzbašić, Martina; Seifert, Davor; **Tomas, Matej**; Čandrlić, Marija; Matijević, Marko. Importance of Oral Hygiene and Maintaining Oral Health in Persons With Disabilities // *Southeastern European medical journal*, 5 (2021), 1; 170-175 doi:10.26332/seemedj.v5i1.176 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

### **Kongresna priopćenja- usmena prezentacija na međunarodnom skupu**

1. **Tomas, Matej.** Stomatološka skrb osoba s invaliditetom // 1. Međunarodna umjetnička i znanstvena konferencija Osobe s invaliditetom u umjetnosti, znanosti, odgoju i obrazovanju (The 1st International Artistic and Scientific Conference Persons with Disabilities in Arts, Science and Education) / Sabljar, Mirna ; Šulentić Begić, Jasna ; Ileš, Tatjana (ur.).

Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Akademija za umjetnost i kulturu u Osijeku, 2019. str. 208-209 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

2. **Tomas, Matej;** Čandrlić, Marija; Juzbašić, Martina; Matijević, Marko; Perić Kačarević, Željka. Preliminary histological analysis of two biomaterials after socket preservation // 3rd Young Scientists Day - Book of Abstracts / Drenjančević, Ines (ur.). Osijek: Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine, 2021. str. 18-18 (predavanje, sažetak, znanstveni)

### **Kongresni sažetak u zborniku radova:**

1. **Tomas, Matej;** Čandrlić, Marija; Karl, Matej; Juzbašić, Martina; Matijević, Nikola; Perić Kačarević, Željka; Matijević, Marko. Histological analysis of two biomaterials after socket preservation – Preliminary histological findings // Special Issue of Clinical Oral Implant Research: 29th Annual Scientific Meeting of the European Association for Osseointegration, 5–11 October 2020 / Heitz-Mayfield, Lisa J.A. (ur.). Berlin, Germany: John Wiley & Sons Ltd, 2020. str. 100-100 doi:[https://doi.org/10.1111/clr.41\\_13644](https://doi.org/10.1111/clr.41_13644) (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

2. Kirsch, Sanja; Grdiša, Antonija; Čandrlić, Marija; Juzbašić, Martina; **Tomas, Matej;** Matijević, Marko; Career choice motivations of Dental Medicine and Dental Hygiene students' at Faculty of Dental Medicine and Health osijek // International Congress: "Current Practice in Croatian Pediatric Dentistry – 2020" Zagreb, Hrvatska, 2020. str. 111-111 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

3. **Tomas, Matej;** Čandrlić, Marija; Juzbašić, Martina; Vidaković, Bruno; Popić Mileusnić, Janko; Kuiš, Davor; Perić Kačarević, Željka; Lešić Stjepanka; Matijević Marko. Preliminary histological comparison of injectable biphasic calcium phosphate and anorganic bovine bone in alveolar bone regeneration // Abstracts of EuroPerio10, E-Poster | Clinical Report Presentation / John Wiley & Sons A/S (ur.)

Danska: Wiley, 2022. str. 250-251 doi:[10.1111/jcpe.13636](https://doi.org/10.1111/jcpe.13636) (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

4. Vidaković, Bruno; Matijević, Marko; Dujmenović, Kristijan; **Tomas, Matej**. Fraktura vijka abutmenta, izazov u kliničkoj praksi // Abstracts of 9th International Congress of the Croatian Society of Dental Implantology of the Croatian Medical Association / Ivan Salarić, Davor Brajdić (ur.). Zagreb: Acta Stomatologica Croatica, 2022. str. 326-327 (predavanje, recenziran, sažetak, znanstveni)
5. Bruno, Vidaković; Kristijan, Dujmenović; **Matej, Tomas**; Ivana, Uljanić Vidaković; Ana, Božinović. Palijativni pacijent u specijalističkoj ambulanti oralne kirurgije // 5. Konferencija o palijativnoj skrbi s međunarodnim sudjelovanjem "Integrirana opća i specijalistička palijativna skrbi" Knjiga sažetaka Pula, 2022. str. 37-37 (predavanje, recenziran, sažetak, stručni)
6. Kristijan, Dujmenović; Ana, Božinović; Bruno, Vidaković; **Matej, Tomas**; Ivana, Uljanić Vidaković. Stomatološka njega kod bolesnika u palijativnoj skrbi // 5. Konferencija o palijativnoj skrbi s međunarodnim sudjelovanjem "Integrirana opća i specijalistička palijativna skrbi" Knjiga sažetaka Pula, 2022. str. 45-45 (predavanje, recenziran, sažetak, stručni)

#### **Sudjelovanje na domaćem ili međunarodnom skupu bez priopćenja**

**Tomas, Matej**; Suzana Varga; Čandrić, Marija; Juzbašić, Martina; Dozet Matea; Nikola Matijević; Marko Matijević. Interdisciplinary collaboration during the treatment of orthodontic patients // 2nd International Translational Medicine Congress of Students and Young Physicians - Abstract Book / Pušeljčić, Nora - Osijek : University of Osijek, Faculty of Medicine, 2020 Osijek, Hrvatska, 2020. str. 48-48 (predavanje, podatak o recenziji nije dostupan, sažetak, ostalo)

#### **Projekti**

IP-FDMZ-2021 - „Histološka analiza ksenografta i alopastičnog biomaterijala u dentalnoj medicini“ (suradnik)

IP-FDMZ-2022 - „Klinička primjena nove metalne resorptivne membrane za regeneraciju alveolarnog grebena“ (suradnik)

#### **Ostalo**

Dekanova nagrada za najbolji znanstveni rad mladog znanstvenika u 2021. godini za rad pod naslovom: „Synthetic Injectable Biomaterials for Alveolar Bone Regeneration in Animal and Human Studies“ Materials. 2021;14(11):2858 (IF 3.748, Q1)