



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ



Милена Б. Раденковић Стошић

**КОМПАРАТИВНА АНАЛИЗА ОДГОВОРА ТКИВА НА
КОЛАГЕНСКЕ БИОМАТЕРИЈАЛЕ ПРИМЕЊЕНЕ НА
РАЗЛИЧИТЕ НАЧИНЕ И У РАЗЛИЧИТИМ АНИМАЛНИМ
МОДЕЛИМА ИМПЛАНТАЦИЈЕ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ниш, 2024.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS



Milena B. Radenković Stošić

**COMPARATIVE ANALYSIS OF TISSUE RESPONSE TO
COLLAGEN-BASED BIOMATERIALS APPLIED IN VARIOUS
WAYS AND IN DIFFERENT ANIMAL MODELS OF
IMPLANTATION**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2024.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор: Проф. др Стево Најман,
Редовни професор, Медицински факултет Универзитета у Нишу

Наслов: Компаративна анализа одговора ткива на колагенске биоматеријале примењене на различите начине и у различитим анималним моделима имплантације

Резиме: Колагенски биоматеријали су популаран избор за употребу у ткивном инжењерству, захваљујући својој биокомпатибилности, биоресорбилности и могућности модификације током производње која омогућава контролу времена стабилности и разградње у организму. Колаген се за потребе производње биоматеријала може добити из различитих извора, при чему се мора водити рачуна о потенцијалној примени колагенског биоматеријала која је условљена начином производње и извором одакле је изолован. Циљ ове докторске дисертације је био упоредна анализа одговора ткива на колагенске биоматеријале различитог специјског и ткивног порекла, различитог начина производње и структуре, као и са различитим додацима физиолошких фактора као што су крв и деривати крви. Истраживање је рађено на различитим експерименталним анималним моделима и то ортотопичним, који су подразумевали имплантацију различито припремљених колагенских биоматеријала различитог порекла у коштане дефекте на калварији пацова и у тибији кунића као и имплантацију различито припремљених колагенских биоматеријала различитог порекла на моделу поткожне имплантације мишевима и пацовима. Одговор ткива на имплантиране колагенске биоматеријале је праћен у неколико различитих временских периода након имплантације а експлантирани узорци биоматеријала са околним ткивом су анализирани применом хистолошких, имунохистохемијских, хистоморфометријских метода и методом скенинг електронске микроскопије. Резултати су показали да колагенски биоматеријали пореклом из несисарских врста, као што су медузе, могу бити одговарајући алтернативни извор за колаген сисарског порекла у регенерацији коштаног и меких ткива. Колаген различитог порекла и начина производње има различите ефекте на репарацију коштаног ткива и изазива различит одговор поткожног и коштаног ткива, а додатак крви и крвних деривата утиче на време ресорпције колагенских биоматеријала и одговор ткива. Ови налази наглашавају значај избора одговарајућег колагенског биоматеријала у складу са условима у којима се примењују као и приступа у клиничкој примени а ради постизања жељених резултата у области регенеративне медицине.

Научна област: Биолошке науке
Научна дисциплина: Биомедицина

Кључне речи:	Одговор ткива, колаген, биоматеријали, анимални модели, дефекти кости, регенерација кости, ткивно инжењерство, имплантати, имплантација
УДК:	(547.962.9 + 615.4) : 636.028
CERIF класификација:	B 210; B 360; B 490; B 500; B 580; B 600;
Тип лиценце Креативне заједнице:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	PhD Stevo Najman Full professor, Faculty of Medicine, University of Niš
Title:	Comparative analysis of tissue response to collagen-based biomaterials applied in various ways and in different animal models of implantation
Abstract:	<p>Collagen-based biomaterials represents a popular choice for use in tissue engineering, thanks to their biocompatibility, bioresorbability and the possibility of modification during the production process that allows a control of stability and degradation time in the organism. Collagen used for the production of biomaterials can be obtained from various sources, while taking into account the potential application of collagen-based biomaterial, which is conditioned by the method of production and the source from which it was isolated. The aim of this doctoral dissertation was a comparative analysis of the tissue response to collagen-based biomaterials of different species and tissue origin, different production method and structure, as well as with different additions of physiological factors such as blood and blood derivatives. The research was carried out on different experimental animal models, namely orthotopic ones, which involved the implantation of differently prepared collagen-based biomaterials of different origin into the bone defects on rat calvaria and in the rabbit tibia models, as well as the implantation of differently prepared collagen biomaterials of different origin in the subcutaneous implantation models in mice and rats. The tissue response to the implanted collagen-based biomaterials was monitored and analyzed in several different time periods after implantation, and the explanted biomaterial samples with the surrounding tissue were analyzed using histological, immunohistochemical and histomorphometric methods as well as scanning electron microscopy.</p> <p>The results showed that collagen-based biomaterials originating from non-mammalian species, such as jellyfish, can be a suitable alternative source for collagen of mammalian origin in bone and soft</p>

tissue regeneration. Collagens of different origins and production methods have different effects on bone tissue repair and causes a different response of subcutaneous and bone tissue, while the addition of blood and blood derivatives affects the resorption time of collagen-based biomaterials and tissue response. These findings emphasize the importance of choosing the appropriate collagen-based biomaterial in accordance with the conditions in which they are applied as well as applied approaches in clinical application in order to achieve the desired results in the field of regenerative medicine.

Scientific
Field:

Biological sciences

Scientific
Discipline:

Biomedicine

Key Words:

Tissue response, collagen, biomaterials, animal models, bone defects, bone regeneration, tissue engineering, implants, implantation

UDC:

(547.962.9 + 615.4) : 636.028

CERIF
Classification:

B 210; B 360; B 490; B 500; B 580; B 600;

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Милена Б. Раденковић Стошић
Ментор, МН:	Стево Најман
Наслов рада, НР:	Компаративна анализа одговора ткива на колагенске биоматеријале примењене на различите начине и у различитим анималним моделима имплантације
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2024.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: <small>(поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)</small>	8 поглавља, 209 страна, 238 цитат, 2 табеле, 58 слика, 9 графика, 2 прилога
Научна област, НО:	Биолошке науке
Научна дисциплина, НД:	Биомедицина
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	Одговор ткива, колаген, биоматеријали, анимални модели
УДК	(547.962.9 + 615.4) : 636.028
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	Експериментални део докторске дисертације је урађен у одељењима и лабораторијама Научноистраживачког центра за биомедицину, Медицинског факултета Универзитета у Нишу као и у Лабораторији за ћелијску и ткивну биологију Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу.



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Извод, **ИЗ:**

Колагенски биоматеријали су популаран избор за употребу у ткивном инжењерству, захваљујући својој биокомпатибилности, биоресорбилности и могућности модификације током производње која омогућава контролу времена стабилности и разградње у организму. Колаген се за потребе производње биоматеријала може добити из различитих извора, при чему се мора водити рачуна о потенцијалној примени колагенског биоматеријала која је условљена начином производње и извором одакле је изолован. Циљ ове докторске дисертације је био упоредна анализа одговора ткива на колагенске биоматеријале различитог специјског и ткивног порекла, различитог начина производње и структуре, као и са различитим додацима физиолошких фактора као што су крв и деривати крви. Истраживање је рађено на различитим експерименталним анималним моделима и то ортотопичним, који су подразумевали имплантацију различито припремљених колагенских биоматеријала различитог порекла у коштане дефекте на калварији пацова и у тибији кунића као и имплантацију различито припремљених колагенских биоматеријала различитог порекла на моделу поткожне имплантације мишевима и пацовима. Одговор ткива на имплантиране колагенске биоматеријале је праћен у неколико различитих временских периода након имплантације а експлантирани узорци биоматеријала са околним ткивом су анализирани применом хистолошких, имунохистохемијских, хистоморфометријских метода и методом скенинг електронске микроскопије.

Резултати су показали да колагенски биоматеријали пореклом из несисарских врста, као што су медузе, могу бити одговарајући алтернативни извор за колаген сисарског порекла у регенерацији коштаног и меких ткива. Колаген различитог порекла и начина производње има различите ефекте на репарацију коштаног ткива и изазива различит одговор поткожног и коштаног ткива, а додатак крви и крвних деривата утиче на време ресорпције колагенских биоматеријала и одговор ткива. Ови налази наглашавају значај избора одговарајућег колагенског биоматеријала у складу са условима у којима се примењују као и приступа у клиничкој примени а ради постизања жељених резултата у области регенеративне медицине.

Датум прихватања теме, **ДП:**

08.06.2020. године

Датум одбране, **ДО:**



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Чланови комисије, КО: _____
Председник: _____
Члан: _____
Члан, ментор: _____



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Milena B. Radenković Stošić
Mentor, MN :	Stevo Najman
Title, TI :	Comparative analysis of tissue response to collagen-based biomaterials applied in various ways and in different animal models of implantation
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2024.
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	8 chapters, 209 pages/239ref./2tables/58pictures/9graphs/2appendixes
Scientific field, SF :	Biological sciences
Scientific discipline, SD :	Biomedicine
Subject/Key words, S/KW :	Tissue response, collagen, biomaterials, animal models
UC	(547.962.9 + 615.4) : 636.028
Holding data, HD :	library
Note, N :	The experimental part of the doctoral thesis was conducted in departments and laboratories of Scientific Research Center for Biomedicine, Faculty of Medicine, University of Niš as well as at the Laboratory for Cellular and Tissue Biology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš.



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

KEY WORDS DOCUMENTATION

Abstract, **AB:**

Collagen-based biomaterials represents a popular choice for use in tissue engineering, thanks to their biocompatibility, bioresorbability and the possibility of modification during the production process that allows a control of stability and degradation time in the organism. Collagen used for the production of biomaterials can be obtained from various sources, while taking into account the potential application of collagen-based biomaterial, which is conditioned by the method of production and the source from which it was isolated. The aim of this doctoral dissertation was a comparative analysis of the tissue response to collagen-based biomaterials of different species and tissue origin, different production method and structure, as well as with different additions of physiological factors such as blood and blood derivatives. The research was carried out on different experimental animal models, namely orthotopic ones, which involved the implantation of differently prepared collagen-based biomaterials of different origin into the bone defects on rat calvaria and in the rabbit tibia models, as well as the implantation of differently prepared collagen biomaterials of different origin in the subcutaneous implantation models in mice and rats. The tissue response to the implanted collagen-based biomaterials was monitored and analyzed in several different time periods after implantation, and the explanted biomaterial samples with the surrounding tissue were analyzed using histological, immunohistochemical and histomorphometric methods as well as scanning electron microscopy.

The results showed that collagen-based biomaterials originating from non-mammalian species, such as jellyfish, can be a suitable alternative source for collagen of mammalian origin in bone and soft tissue regeneration. Collagens of different origins and production methods have different effects on bone tissue repair and causes a different response of subcutaneous and bone tissue, while the addition of blood and blood derivatives affects the resorption time of collagen-based biomaterials and tissue response. These findings emphasize the importance of choosing the appropriate collagen-based biomaterial in accordance with the conditions in which they are applied as well as applied approaches in clinical application in order to achieve the desired results in the field of regenerative medicine.

Accepted by the Scientific Board on, **ASB:**

08.06.2020.

Defended on, **DE:**

Defended Board, **DB:** President:

Member:

Member, Mentor:

ЗАХВАЛНИЦА

Ова докторска дисертација је урађена у оквиру пројеката Министарства просвете, науке и технолошког развоја и Министарства науке, технолошког развоја и иновација (Ш 41017, 451-03-68/2020-14/200113, 451-039/2021-14/200113, 451-03-68/2022-14/200113, 451-03-47/2023-01/200113, 451-03-65/2024-03/200113, 451-03-66/2024-03/200113).

Експериментални део докторске дисертације је урађен у одељењима и лабораторијама Научноистраживачког центра за биомедицину, Медицинског факултета Универзитета у Нишу (у Одељењу за ћелијско и ткивно инжењерство, Одељењу за експерименталну медицину, Виваријуму, Лабораторији за експерименталну патологију и имунологију и Лабораторији за електронску микроскопију), као и у Лабораторији за ћелијску и ткивну биологију Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу.

Велику захвалност за реализацију ове докторске дисертације дугујем:

***Проф. др Стеви Најману** на указаном поверењу и прилици да закорачим у свет науке и будем део његовог изванредног истраживачког тима. Велико хвала на менторском руковођењу током докторских студија и на свакодневном подстреку за научно усавршавање. Хвала на пренетом знању, подељеним искуствима и саветима, несебичној подршци и издвојеном времену за свако моје питање и научну недоумицу. Највећу захвалност за израду ове докторске дисертације, као и за моје професионално узрастање у научним сферама, дугујем Вама.*

***Доц. др Сањи Стојановић** на несебично пренетом теоријском и практичном знању, као и свакодневној професионалној подршци у савладавању нових техника и метода још од почетка мојих истраживачких дана. Хвала на увођењу у свет рада са анималним моделима, на пренетом знању из хистолошких и хистоморфометријских техника и на сваком савету. Највеће хвала на немерљиво великој помоћи у свакој фази израде ове докторске дисертације, као и у свим фазама мог стручног усавршавања током докторских студија.*

***Др Mike Varbeck** са Универзитетског Медицинског центра Росток на помоћи у имунохистохемијској анализи имплантата, као и на стручној сарадњи у којој сам стекла велико знање о експерименталном раду на анималним моделима и која је резултирала великим бројем публикација.*

***Др Ole Jung** са Универзитетског Медицинског центра Росток на подршци у савладавању техника имплантације.*

***Проф. др Перици Васиљевићу** на учешћу у комисији за одбрану доктората и спремности да увек пружи професионални савет и подели своје стручно знање. Хвала на могућности да припремим ткива за хистолошку анализу у Лабораторији за Ћелијску и Ткивну Биологију Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу.*

***Проф. др Љубиши Ђорђевићу и проф. др Јелени Живковић** на помоћи и подршци у одређеним фазама мојих докторских студија, као и на бројним стручним саветима.*

***Проф. др Јелени Најдановић** на пријатној сарадњи током мојих докторских студија.*

Проф. др Мирославу Трајановићу на прилици да будем део пројекта којим је руководио, чиме је отпочело моје истраживачко ангажовање на докторским студијама.

Декану Медицинског факултета **проф. др Добрили Станковић Ђорђевић** на могућности да допринесем истраживањима која се реализују на Медицинском факултету Универзитета у Нишу.

Запосленима у Научноистраживачком Центру за Биомедицину, Медицинског факултета у Нишу хвала на љубазности, техничкој помоћи и свакодневној сарадњи.

Тањи Прокић огромно хвала на немерљивој помоћи током рада на анималним моделима и великом броју заједничких сати проведених у бројним експериментима. Хвала на спремности да увек помогне и охрабри.

Мирославу Миљковићу и **Драгану Илићу** велико хвала на помоћи у припреми и сликању узорака на СЕМ микроскопији.

Милени и **Снешки** хвала на охрабрењу и увек лепим речима.

Весни, **Сузи** и **Звонку** хвала на свакодневној бризи о добробити животиња у експериментима.

Колегама докторандима из „Собе 10“, и колегама и професорима са Департмана за биологију и Екологију ПМФ-а велико хвала на изузетној сарадњи у минулим годинама.

Мојој Породици која је темељ свих мојих успеха
се не могу довољно захвалити на свему што чине за мене,
и на свему што јесу.
Мами, Тати, Александру и Василију, посвећујем овај сан.

Милена Раденковић Стошић

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Колагенски биоматеријали у регенеративној медицини.....	1
1.2. Извор и физичко-хемијска карактеризација колагенских биоматеријала	2
1.3. Репарација ткива као инспирација за нове ткивноинжењерске приступе	5
1.4. Површински слој колагенских биоматеријала	7
1.5. Додатак крви и крвних деривата колагенским биоматеријалима	8
1.6. Проблем истраживања	10
2. ПРЕДМЕТ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	14
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ	16
3.1. Материјал	16
3.1.1. Биоматеријали.....	16
3.1.2. Експерименталне животиње.....	18
3.2. Модели.....	18
3.2.1. Ортопични модели	19
3.2.1.1. Ортопични модел на калварији пацова	19
3.2.1.2. Ортопични модел на тибији кунића	20
3.2.2. Ектопични модели	20
3.2.2.1. Модел ектопичне имплантације пацову	21
3.2.2.2. Модел ектопичне имплантације мишу	21
3.3. Експериментални дизајн	22
3.3.1. Студија 1: Компарација одговора ткива на различито припремљене колагенске биоматеријале различитог порекла у ортопичном моделу имплантације пацову	22
3.3.2. Студија 2: Компарација одговора ткива на колагенске биоматеријала различитог порекла на ектопичном моделу имплантације пацову	24
3.3.3. Студија 3: Компарација одговора ткива на колагенске мембране добијене из различитих ткива на ектопичном моделу имплантације пацову	25
3.3.4. Студија 4: Компарација одговора ткива на колагенске мембране различитог порекла на ектопичном моделу имплантације мишу	26
3.3.5. Студија 5: Компарација одговора ткива на колагенске мембране са додатком различитих физиолошких фактора на ектопичном моделу имплантације мишу	26
3.3.6. Студија 6: Испитивање остеорепарационог потенцијала колагенских мембрана у комбинацији са гранулираним коштанним заменицима на ортопичном моделу имплантације кунићу	28
3.4. Методи.....	29
3.4.1. Хистолошка обрада ткива	29
3.4.2. Хистохемијска анализа	29
3.4.2.1. Хематоксилин-еозин бојење	30
3.4.2.2. Пентахромно бојење по Movat-у	30
3.4.2.3. Трихромно бојење по Masson-у.....	30
3.4.2.4. Трихромно бојење по Azan-у	31
3.4.3. Имунохистохемијска анализа.....	31
3.4.4. Анализа обојених ткивних пресека светлосном микроскопијом	32
3.4.6. Скенинг електронска микроскопија	33
3.4.7. Статистичка анализа добијених резултата.....	33

4. РЕЗУЛТАТИ	35
4.1. Студија 1: Компарација одговора ткива на различито припремљене колагенске биоматеријале различитог порекла у ортотопичном моделу имплантације пацову	35
4.1.1. Хистолошка анализа дефеката калварије и имплантата	35
4.1.2. Имунохистохемијска анализа инфламаторног одговора ткива на имплантацију КскМ+Ф типа имплантата	41
4.1.3. Хистоморфометријска анализа имплантата.....	42
4.1.3.1. Регенерација коштаног ткива.....	42
4.1.3.2. Ресорпција биоматеријала	43
4.1.3.3. Васкуларизованост имплантата	44
4.1.3.4. Густина крвних судова	45
4.1.3.5. Хистоморфометријска анализа инфламаторног одговора на КскМ+Ф тип имплантата.....	46
4.2. Студија 2: Компарација одговора ткива на колагенске биоматеријала различитог порекла на ектопичном моделу имплантације пацову	47
4.2.1. Анализа макроскопског изгледа супкутаных имплантата и околног поткожног ткива пацова	47
4.2.2. Хистолошка анализа супкутаных имплантата и околног поткожног ткива пацова.....	48
4.2.2.1. Хистолошка анализа имплантата и околног поткожног ткива десет дана након имплантације.....	48
4.2.2.2. Хистолошка анализа имплантата и околног поткожног ткива тридесет дана након имплантације.....	50
4.2.2.3. Хистолошка анализа имплантата и околног поткожног ткива шездесет дана након имплантације.....	52
4.2.2.4. Васкуларизованост имплантата	54
4.2.3. Имунохистохемијска анализа одговора ткива на имплантацију биоматеријала типа КскМ и КмтСПк	57
4.2.4. Хистоморфометријска анализа инфламаторног одговора ткива на КскМ и КмтСПк тип имплантата.....	61
4.3. Студија 3: Компарација одговора ткива на колагенске мембране добијене из различитих ткива на ектопичном моделу имплантације пацов	62
4.3.1. Хистолошка анализа имплантата, околног поткожног ткива и поткожног џепа без имплантата	62
4.3.1.1. Хистолошка анализа структуре колагенских мембрана пре имплантације.....	62
4.3.1.2. Хистолошка анализа имплантата, околног поткожног ткива и поткожног џепа без имплантата десет дана након имплантације.....	62
4.3.1.3. Хистолошка анализа имплантата, околног поткожног ткива и поткожног џепа без имплантата тридесет дана након имплантације.....	65
4.3.1.4. Хистолошка анализа имплантата, околног поткожног ткива и поткожног џепа без имплантата шездесет дана након имплантације	67
4.3.1.5. Имунохистохемијска анализа инфламаторног одговора ткива на имплантацију КмСТе, КмСПт, КмСПк имплантата и поткожног џепа без имплантата	70
4.3.2. Хистоморфометријска анализа инфламаторног одговора ткива на имплантиране колагенске мембране КмСТе, КмСПт и КмСПк и ткива у поткожном џепу без имплантиране колагенске мембране	75
4.3.3. Хистоморфометријска анализа дебљине КмСТе, КмСПк и КмСПт типа имплантата	77

4.4. Студија 4: Компарација одговора ткива на колагенске мембране различитог порекла на ектопичном моделу имплантације мишу	79
4.5. Студија 5: Компарација одговора ткива на колагенске мембране са додатком различитих физиолошких фактора на ектопичном моделу имплантације мишу	83
4.5.1. Анализа макроскопског изгледа супкутаных имплантата и околног поткожног ткива миша	83
4.5.2. Хистолошка анализа супкутаных имплантата и околног поткожног ткива миша.....	86
4.5.2.1. Хистолошка анализа имплантата и околног поткожног ткива три дана након имплантације	86
4.5.2.2. Хистолошка анализа имплантата и околног поткожног ткива десет дана након имплантације.....	90
4.5.2.3. Хистолошка анализа имплантата и околног поткожног ткива тридесет дана након имплантације.....	90
4.5.3. Хистоморфометријска анализа дебљине супкутаных имплантата миша	98
4.5.4. СЕМ анализа имплантата и околног поткожног ткива миша.....	100
4.5.4.1. СЕМ анализа површине имплантата три дана након имплантације	101
4.5.4.2. СЕМ анализа површине имплантата десет дана након имплантације	105
4.5.4.3. СЕМ анализа површине имплантата десет дана након имплантације	109
4.6. Студија 6: Испитивање остеорепарационог потенцијала колагенских мембрана у комбинацији са гранулираним коштанним заменицима на ортотопичном моделу имплантације кунићу	113
4.6.1. Стање животиња и изглед тибија током експеримента	113
4.6.2. Анализа макроскопског изгледа тибија испод коже	113
5. ДИСКУСИЈА	120
5.1. Остеорепарациони потенцијал колагенских биоматеријала различитог порекла без и са додатком крви на ортотопичном моделу имплантације пацову	121
5.2. Разлике у одговору поткожног ткива пацова на колагенске биоматеријале сисарског порекла и пореклом из медузе	130
5.3. Компарација одговора ткива на колагенске мембране добијене из различитих ткива на ектопичном моделу имплантације пацову	132
5.4. Инфламаторни одговор околног ткива на колагенске имплантате различитог порекла и структуре у ортотопичном и ектопичном моделу имплантације пацову.....	135
5.5. Компарација одговора ткива на колагенске мембране различитог порекла на ектопичном моделу имплантације мишу	141
5.6. Утицај додатка крви и крвних деривата на биофункционалност колагенских мембрана на моделу супкутане имплантације мишу	144
5.7. Улога колагенске мембране у стабилизацији гранулираног материјала имплантираног на моделу тибије кунића	150
6. ЗАКЉУЧЦИ	156

7. ЛИТЕРАТУРА.....	161
8. ПРИЛОЗИ.	189
Биографија и библиографија.....	189
Изјаве аутора	194



1. УВОД

1. УВОД

1.1. КОЛАГЕНСКИ БИОМАТЕРИЈАЛИ У РЕГЕНЕРАТИВНОЈ МЕДИЦИНИ

Колаген представља главни структурни протеин мултицелуларних животиња, који чини 30% суве масе тела човека, 25-30% целокупног протеинског састава код сисара, и 90% органске компоненте ванћелијског матрикса кости (*Fidler* и сар., 2018; *Junqueira* и *Carneiro*, 2005; *Muller*, 2003; *Fan* и сар., 2023). Описано је више од 25 различитих типова колагена који се класификују у групе колагена који формирају влакна (тип I, III, V, XI), колагене који се повезују са влакнима (IX, XII, XIV), колагене који стварају усидравајућа влаканца (VII) и колагене који стварају мрежу (IV). Колаген типа I је доминантан у телу сисара, где у виду влакана обезбеђује снагу и стабилност у костима, тетивама, дентину, органима и дермису коже (*Junqueira* и *Carneiro*, 2005, *Fidler* и сар., 2018).

Употреба биоматеријала на бази колагена је у експанзији последњих 20 година у свим пољима регенеративне медицине (*Fan* и сар., 2023). Материјали на бази колагена се користе у санирању рана, репарацији повреде коже изазване опекотинама, у урогениталној, абдоминалној, васкуларној и максилофацијалној хирургији. Потенцијално широка употреба колагена је базирана на његовом хемостатичком ефекту, иницијацији ћелијске пролиферације, адхезије и оријентације, интеракцији са тромбоцитма и фибронектином, као и на његовом утицају на поларизацију ћелија (*Mian* и сар., 1992; *George* и сар., 2006; *Stevens*, 2008; *Tierney* и сар., 2009).

Различите колагенске мембране су доступне за процедуре усмерене регенерације костију у пољима оралне и максилофацијалне хирургије, када треба да доведу до успешне регенерације или раста кости, најчешће виличне, ради уградње зубног имплантата (*Bunyaratavej* и *Wang*, 2001). Једна од главних улога колагенске мембране је да служи као баријера између меког ткива, углавном гингиве и суседног коштаног ткива, како би се створио простор за лечење кости. Поред тога, баријерна мембрана за готово све клиничке индикације мора бити и биоресорбилна без пропратних јаких инфламаторних одговора који могу ометати суседне процесе зарастања или реакције вишеједарних циновских ћелија страног тела које доводе до преране фрагментације материјала, што доводи до губитка функционалности баријере (*Al-Maawi* и сар., 2017). Поред тога, оптимална баријерна мембрана треба да обезбеди стабилност ткива, да спречи колапс у коштане дефекте и истовремено локализацију коштаных гранулираних супституената, као и полупропустљивост која би омогућила трансмембрански транспорт храњивих материја или урастање крвних

судова који би довели до евентуалне трансмембранске васкуларизације (*Bunyaratavej* и *Wang.*, 2001).

1.2. ИЗВОР И ФИЗИЧКО-ХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА КОЛАГЕНСКИХ БИОМАТЕРИЈАЛА

Примена колагенских биоматеријала умногоме је зависна од њихових физичко-хемијских карактеристика, које се условљене у највећој мери пореклом, а затим и начином производње. Колагенске мембране у ткивном инжењерству се разликују у пореклу од врсте организма, па тако могу бити свињског, говеђег и коњског порекла, изоловане из коже, тетива, перитонеума или перикарда, и најчешће су то фракције колагена типа I (*Bunyaratavej* и *Wang* 2001; *Meyer*, 2019; *Fan* и сар., 2023). Колагенске мембране, као што су хумана *fascia lata* и амнионска мембрана, мембрана из јајета птица и тетиве репа пацова, могу бити, такође, обећавајући извори колагена за вођену регенерацију кости (енг. *guided bone regeneration - GBR*) (*Kazakos* и сар., 2011; *Dupoirieux* и сар., 2001; *Wang* и сар., 2002). Алтернативни извор сисарском колагену представља и колаген пореклом из водених организама (медузе, рибе попут врсте *Nile tilapia*), чија примена захтева другачији приступ производње, али може да задовољава захтеве за биокомпатибилношћу (*Yamada* и сар., 2014; *Lau* и сар., 2019; *Flaig* и сар., 2020).

Приликом производње колагена од највећег значаја су физичко-хемијски третмани у циљу уклањања свих органских и имунолошки активних компоненти, као што су патогени и ћелије. Првенствено, колаген се изолује и очисти од перципитата променом *pH* вредности или повећањем температуре, након чега следи сушење замрзавањем и стерилизација. На крају се добије пречишћени колаген који треба да служи као функционална баријера. Упркос примени процедура за пречишћавање, употреба колагена може бити у вези и са одређеним болестима. На пример, имплантација биоматеријала на бази колагена са говеђим пореклом носи ризик од преноса зооноза као што су спонгиформна енцефалопатија говеда, преносна спонгиформна енцефалопатија или разне вирусне, док колагенске мембране свињског порекла могу бити одбијене за употребу због верских ограничења (*Silvipriia* и сар., 2015, *Flaig* и сар., 2020; *Tomić* и сар., 2024). Супротно томе, колаген коњског порекла није повезан са преносом вирусних болести и не одбија се његова употреба из етичких разлога (*Vagner-Ecker* и сар., 2013).

Аминокиселински низ, организација и асоцијација колагенских фибрила су зависни од врсте животиња, као и од врсте ткива одакле је колаген за производњу биоматеријала изолован (*Gauza-Vlodarczik* и сар., 2017; *Ferraro* и сар., 2017). Такође, упркос истом

животињском пореклу мембрана, могућа је разлика у структури и типизацији колагена, као и механичким карактеристикама (Ortolani и сар., 2015). Santo и сар. су уочили да различити узорци истих мембрана могу да се понашају на различите начине током истог начина тестирања, зависно од дебљине узорка или густине пора на површини, што има важну улогу у финалном понашању мембране, а често је последица неуниформног процеса екстракције колагена (Santo и сар., 2018). Стварање веза између влакана као и њихово реаранжирање кроз процес растезања и кидања, поред саме количине влакана може утицати на коначне механичке преформансе биодиградибилних полимера (Alvarez и сар., 2007; Ortolani и сар., 2015).

Иако ресорбилне колагенске мембране имају предност у односу на нересорбилне у усмереној регенерацији костију, јер није неопходна друга операција за њихово уклањање, поједине клиничке апликације захтевају одржавање стабилности колагенских мембрана које би имале јачу снагу и пролонгирано време за биодиградацију (Lee и Kim, 2014; Elgali и сар., 2017; Caballé-Serrano и сар., 2019). Продужено време биодиградације се може постићи применом нересорбилних синтетичких материјала базираних на титанијуму или на политетрафлуороетилену (енг. *polytetrafluorethylene – PTFE*) (Sbricoli и сар., 2020; Toledano и сар., 2020b). Са друге стране, ресорбилне колагенске мембране се развијају са техникама које могу водити ка продуженом времену биодиградације паралелно са развијањем прихватљиве инфилматорне реакције ткива [Lee и Kim, 2014; Sbricoli и сар., 2020; Toledano и сар., 2020b].

Технике продужавања времена биоресорпције колагена се најчешће базирају на различитим методама умрежавања колагенских влакана. Колаген припада групи хетерополимера, чија се примарна структура састоји од три полипептидна ланца која формирају троструки хеликс и формирају молекуле тропоколагена, при чему су два ланца идентична ($\alpha 1$), а трећи може да варира у својој хемијској структури ($\alpha 2$). Више од хиљаду аминокиселина улази у састав ових ланаца, а њихов редослед одређује тип колагена. Аминокиселинске секвенце присутне у грађи полипептидних ланаца су у виду понављајућих трипептида који се могу изразити формулом: $[Gly-X-Y]_n$. На свакој трећој позицији се налази глицин, чија је улога круцијална у паковању α ланца у молекуле тропоколагена, док су X и Y позиције најчешће заузеле пролином или хидроксипролином (Szpak, 2011; Silvipriya и сар., 2015; Fidler и сар., 2018; Lin и сар., 2019). Молекули колагена се у типовима I, II и III, удружују у колагена влаканца, затим у влакна где се јављају водоникове и хидрофобне везе. На крају долази до формирања снопова влакана, који обезбеђују снагу и стабилност кроз стварање попречних ковалентних веза (енг. *cross-linking*) (Junqueira и Carneiro, 2005). Овај феномен стварања попречних ковалентних веза при формирању снопова влакана се користи у ткивном инжењерству за продужавања времена биоресорпције колагена и постизања

његове дуготрајности након имплантације. Умрежавање колагена се може постићи хемијским агенсима, као што су алдехиди, физичким третманима, као што је радијација, или биолошким агенсима као што су трансглутаминаза и пероксидаза рена (*Lin* и сар., 2019; *Chevallay* и сар., 2000; *Bottino* и сар., 2012). Упркос доказаним бенефитима, показано је да поступци умрежавања колагена могу водити ка парцијалној цитотоксичности (*Ghanaati* и сар., 2012; *Brunel* и сар., 1996; *Behring* и сар., 2008; *Rothamel* и сар., 2005). Због тога су у развоју и алтернативне технике, попут гликолизације, која је и природна реакција колагенских влакана током старења због чега постоји претпоставка да то може бити оптималан начин за *cross-linking* колагена, који би резултовао мембраном која може обезбедити довољно дугу баријерну функцију и интегративно понашање које није штетно за пери-имплантирано ткиво (*Kinoshita* и сар., 2019).

Кључно је дефинисати механичке карактеристике мембрана, попут крутости и еластичности, с обзиром на то да су мембране индиковане у поступцима хоризонталне и вертикалне аугментације коштаног гребена, где је потребно прекрити велике дефекте. Мембране треба да издрже затезне силе, али истовремено и да се саме истегну. Пошто мембране долазе у директан контакт са телесним течностима, дефинисање тачних утицаја течности на потенцијалну промену физичко-хемијских карактеристика мембрана може побољшати смернице за предложену употребу. Хидратација колагенских влакана може ревитализовати нативну структуру колагена, што бива праћено повећањем еластичног капацитета, што би значило да се колагенска мембрана која је влажна може проширити на већу површину од исте мембране која је сува (*Raz* и сар., 2019; *Zeugolis* и сар., 2009). Способност апсорпције течности од стране баријерних мембрана које се користе у ткивном инжењерству може да варира од њиховог порекла, па тако мембране природног порекла апсорбују брже и веће количине течности у поређењу са синтетичким баријерним мембранама, посебно на храпавим површинама које омогућавају већи контактни угао са течношћу (*Caballé-Serrano* и сар., 2019; *Lee* и *Kim*, 2014; *Sanders* и *Kingsnorth*, 2012; *Raz* и сар., 2019).

Информације о способности биоматеријала да вежу молекуле воде могу се добити анализом контактног угла (*Lin* и сар., 2021; *Roohpour* и сар., 2010). Међутим, постојање слоја везане воде може и да смањи количину везујућих места за ћелије, што може моделирати адхезију ћелија. Од посебног су изазова полиуретени, јер задрже аморфне и тврде сегменте без функционалних група које су подложне одговарајућој хемијској модификацији (*Dennes* и сар., 2008).

Дебљина колагенске мембране *Bio-Gide®* у сувим условима је била идентична измереним вредностима након натапања физиолошким раствором (*Willershausen* и сар.,

2014). Међутим, *ex vivo* анализа *Al-Maawi* и сарадника је показала парцијалну пенетрацију течног *PRF*-а (eng. *Platelet Rich Fibrin*), што је било праћено повећањем масе мембране 4 пута (*Al-Maawi* и сар., 2019). Телије и фибрински матрикс су пенетрирали у компактни слој *Bio-Gide*® мембране парцијално, док је сунђерасти слој имао адхериран течни *PRF* угрушак на површини, што би требало да подржи ткивну регенерацију (*Al-Maawi* и сар., 2019). Повећан ангиогенетски потенцијал *Jason*® колагенске мембране након додатка *PRF*-а је доказан и *in vitro* и *in vivo* моделу (*Blatt* и сар., 2020).

1.3. РЕПАРАЦИЈА ТКИВА КАО ИНСПИРАЦИЈА ЗА НОВЕ ТКИВНОИНЖЕЊЕРСКЕ ПРИСТУПЕ

Репарација костију и меких ткива се дешава кроз три главне фазе: инфламацију, пролиферацију и ремоделовање ткива. Иницијални окидач за почетак ових фаза јесте тежња ткива да успостави хемостазу након трауме (*Harwood* и сар., 2010; *Shiu* и сар., 2014). Посебно кост представља веома добро васкуларизовано ткиво, где услед трауме долази до прекида континуитета у крвним судовима периоста и околног ткива уз настанак едема и крварења који могу смањити снабдевање остеоцита у костима кисеоником и потребним нутријентима, услед чега се може јавити и некроза повређене кости (*Carano* и *Filvaroff*, 2003). Да би се успоставио нормалан проток крви и спречило крварење, организам настоји да успостави хемостазу која се дешава кроз процесе вазоконстрикције, формирања тромбоцитног чепа и коагулације (*Minors*, 2007; *Allford* и сар., 2004; *Shiu* и сар., 2014). Током вазоконстрикције, субендотелни колаген, *von Willebrand* фактор и фибронектин интерагују за тромбоцитима посредством великог броја гликопротеинских рецептора чиме омогућавају адхезију тромбоцита на месту повреде што води ка формирању тромбоцитног чепа. У овом процесу, тромбоцити су физиолошки активни, долази до промене њиховог изгледа у сферични са псеудоподијама које омогућавају ефикасније кретање, испољавања рецептора на њихову површину, долази до њихове дегранулације, активације цитоскелетног контрактилног система и формирање микропартикула од стране тромбоцита (*Rand* и сар., 2010; *Nurden*, 2011; *Blair* и сар., 2009).

Тромбоцити су познати као извор различитих фактора раста, укључујући тромбоцитни фактор раста (енг. *platelet-derived growth factor* - *PDGF*), васкуларни ендотелски фактор раста (енг. *vascular endothelial growth factor* - *VEGF*), трансформишући фактор раста β (енг. *transforming growth factor* β – *TGF- β*) и друге. *PDGF* се понаша као хемоатрактант и митоген за мезенхимске ћелије и остеобласте и први иницира васкуларизацију, *VEGF* има велику улогу у васкуларизацији ткива, а *TGF- β* има регулаторни ефекат у неоформацији ткива

посредством фибробласта, преостеобласта и ћелија коштане сржи (*Wrotniak* и сар., 2007; *Arora* и сар., 2009; *Floege* и сар., 2008; *Ekström* и сар., 2013; *Perut* и сар., 2013).

Током коагулације која се може иницирати спољашњим и унутрашњим путем активације, долази до формирања стабилног хемостатског угрушка формирањем фибринске мреже на тромбоцитном чепу (*Yarovaya* и сар., 2002; *Zhuo* и сар., 2005; *Renné* и *Gailani*, 2007). Оба начина активације доводе до конверзије ензима протромбина у активну форму тромбина који даље катализује конверзију фибриногена у фибринску мрежу која се ствара на месту повређеног крвног суда. Током ране фазе репарације костију, тромбин делује на проферацију остеобласта, а фибрин подржава остеобласну диференцијацију при чему везивање тромбина за фибрин моделира везивни капацитет за фибронектин (*Laurens* и сар., 2006; *Ahmed* и сар., 2008; *Karp* и сар., 2004; *Oh* и сар., 2012). Поред тога фибриноген омогућава микроокружење које поспешује регенерацију ткива кроз модулацију активности моноцита и макрофага и повећава степен репарације костију осам недеља након имплантације (*Vasconcelos* и сар., 2016; *Zuchtriegel* и сар., 2016; *Kaur* и сар., 2017).

Захваљујући присуству тромбоцита, крвних ћелија и везаних протеина, крвни угрушак не делује само као проста баријера између прекинутог континуитета судова, већ и сам иницира неоваскуларизацију (*Jirouskova* и сар., 1997; *Clark* 2001; *Street* и сар., 2000). С обзиром да се крвни угрушак јавља одмах након трауме кости, на пример након прелома или вађења зуба, али и да он заједно са приспелим ћелијама иницира ткивну репарацију, он може као природни скафолд служити као извор различитих фактора од значаја за ткивно инжењерство (*Shapiro*, 2008; *Kolar* и сар., 2010; *de Sousa Gomes* и сар., 2019; *Li* и сар., 2023). *Melcher* и сарадници су посматрали формирање кости на ивицама дефекта и приметили су да се нова кост ствара на формираном крвном угрушку (*Melcher* и сар., 1962). Специфичне карактеристике крвног угрушка, као што је дебљина фибринских влакана, број тачака преплетања и адхезивна моћ фибрина, зависе од површине материјала на коме се формира (*Chen* и сар., 2014; *Chen* и сар., 2015; *Li* и сар., 2017). Груба површинска микротопографија повећава површину биоматеријала што последично повећава адсорпцију фибриногена, што објашњава повећање адхезије тромбоцита, активацију и агрегацију (*Collignon* и сар., 2017). У интеракцији ткива са биоматеријалима, иницијално долази до адхезије тромбоцита на присутан фибриноген који је везан за имплантат преко рецептора интегрин $\alpha 2\beta$ (*Broberg* и сар., 2002). Тромбоцити посредством својих излучених фактора стимулишу леукоците да иницирају рани имунски одговор (*Lam* и сар., 2015; *Zuchtriegel* и сар., 2016). Леукоцити који се групишу на месту повреде су саставни део процеса зарастања ране кроз међућелијску комуникацију и самим тим доприносе ангиогенези и лимфогенези, док фибринска мрежа служи као извор фактора раста (*Nami* и сар., 2016; *Schmidt-Bleek* и сар., 2015; *Kubesch* и сар.,

2019). Највећи део фактора раста се ослобађа из тромбоцита сат времена по њиховој активацији, при чему је та динамика много израженија уколико су тромбоцити активирани тромбином, док активација $CaCl_2$ води ка равномернијој активацији током седам дана упоредо са формирањем фибринског матрикса (*Alves и Grimalt, 2018; Foster и сар., 2009; Lu и сар., 2008*). Упоредо са постојећом некрозом ткива и факторима раста који се луче из тромбоцита, иницира се миграција ћелија имунског одговора и фобробласта чиме почиње инфламаторна фаза ткивне реакције која достиже свој пик до 48 ч након повреде и траје до 7 дана (*Cho и сар., 2002*). Главни носиоци инфламаторне фазе су макрофаги који мигрирају до места трауме и учествују у ремоделирању ткива (*Horowitz и сар., 1989*).

1.4. ПОВРШИНСКИ СЛОЈ КОЛАГЕНСКИХ БИОМАТЕРИЈАЛА

Присуство површинског протеинског слоја на колагенским мембранама може потенцијално утицати на различите интеракције молекула у биолошком окружењу, због различитих функција протеина, као што је сигнализација посредством различитих фактора, што даље одређује успех имплантације биоматеријала (*Meder и сар., 2012; Fernández-Montes и сар., 2016; Toledano и сар., 2020a*). Адсорпција протеина дешава се пре него што ћелије стигну на површину имплантиране мембране (*Sheikh и сар., 2016*). Преко 50 протеина плазме могу формирати протеински слој на површини биоматеријала након интеракције са крвљу, чиме се иницира ћелијски одговор и интеграција са ткивом (*Jeyachandran и сар., 2009; Toledano и сар., 2020b*).

Истраживања су показала да хемијска модификација површине баријерних мембрана може да моделује степен адсорпције протеина, као што су протеини плазме, фибриноген, фибронектин и говеђи серумски албумин (*eng. bovine serum albumin-BSA*). Мембране на бази поли(метил метакрилата) са цинковим јонима, обогаћене карбоксилним групама ($-COOH$) су адсорбовале значајно више албумина и мање фибриногена, у односу на на исте мембране обогаћене аминокиселинским групама ($-NH_2$). Карбоксилним групама обогаћене мембране су преципитовале и калцијум фосфат на површини што је од значаја за регенерацију коштаног ткива (*Toledano и сар., 2020b*). *Griffin* и сарадници су показали да обогаћивање површине скафолда карбоксилним групама може усмерити мезенхимске матичне ћелије из масног ткива ка хондрогеној диференцијацији, док је остеогена диференцијација подржана на скафолду обогаћеном аминокиселинским групама (*Griffin и сар., 2017*). Међутим, утицај на промену адсорбованих протеина и њихову замену другим протеинима појачавањем њиховог афинитета везивања кроз Вроманов ефекат могу се створити разне нестабилности у биолошком микросистему које се тешко контролишу (*Hirsh и сар., 2013*).

Осим присуства функционалних група, на адсорпцију протеина на површини материјала утичу и сама концентрација присутних протеина, као и њихова својства попут молекулске масе, изоелектричне тачке протеина, електростатског напона, и хидрофилност односно хидрофобност биоматеријала (*Fernández-Montes* и сар., 2016). *Nguyen* и сарадници су показали да се хумани фибронектин и албумин могу адсорбовати у различитој мери на силицијумски биоматеријал, зависно од укупне количине протеина, као и површине материјала (*Nguyen* и сар., 2016).

1.5. ДОДАТАК КРВИ И КРВНИХ ДЕРИВАТА КОЛАГЕНСКИМ БИОМАТЕРИЈАЛИМА

Имајући у виду важност и утицај макро- и микромолекула који се луче од стране активираних ћелија у биолошким процесима ткивне репарације и регенерације, као и могућност модификације понашања биоматеријала модификацијом њихове површине, у развоју су многе технике за обогаћивање биоматеријала ради оптимизације њихове функције посредством аутологних деривата пацијената, као што су разблажена крв, серум, плазма, плазма обогаћена тромбоцитима (енг. *platelet-rich plasma - PRP*), *PRF* (енг. *platelet-rich fibrin*) и *PRGF-a* (енг. *platelet-rich growth factor*) (*Li* и сар., 2017; *Kubesch* и сар., 2019; *Batas* и сар., 2019; *Milillo* и сар., 2021). Обогаћивање материјала биолошки активним агенсима представља изазов због апликације биолошких компоненти на само место повреде, активацију и контролу концентрације активних молекула који бивају ослобођени из активираних ћелија и тромбоцита и контроле самог процеса репарације коштаног ткива које траје 3-6 месеци до постизања потпуне механичке стабилности (*Rodriguez* и сар., 2014). Ситне модификације у припреми ових биолошких додатака, као што су карактеристике центрифуге и специфични протоколи центрифугирања могу резултовати разликама у ћелијама, факторима раста и архитектури жељених компоненти, попут фибрина у узорку фибрина обогаћеног леукоцитима и тромбоцитима (енг. *leukocyte- and platelet-rich fibrin - L-PRF*) (*Dohan Ehrenfest* и сар., 2018).

Плазма представља течни део некоагулисане крви који остаје након уклањања свих ћелија центрифугирањем. Коагулација се спречава изоловањем крви у присуству антикоагуланса, често хепарина који активира анти-тромбин или путам ЕДТА и натријум цитрата који спречавају коагулацију хелирајући калцијумове јоне (*Issaq* и сар., 2007).

Серум се лабораторијски добија колекцијом крвне плазме у одсуству антикоагуланса, при чему долази до формирања фибриноског угрушка који се уклања центрифугирањем, а у физиолошким условима се издваја из коагулисане крви на месту ткивне повреде. Процес коагулације који за собом повлачи фибриноген из плазме чини серум другачијим од плазме

где се не дешава коагулација. Ни серум, ни плазма не садрже крвне ћелије (*Issaq* и сар., 2007). Укупна концентрација протеина је нижа у серуму него у плазми, услед повлачења фибриногена у формирању фибриноског угрушка, као и одређених протеина који учествују у згрушавању попут фактора: *IX, X, XI* и *VII/VIIa* (*Lum* и сар., 1974; *Kimball* и сар., 1976).

Испитивања на ћелијским културама су показала да хумани серум може служити добро као подлога за култивацију фибробласта, али и хуманих остеобласта, хуманих ћелија коштане сржи и хондроцита, уз повећану пролиферацију у односу на култивацију у *FBS*-у (енг. *fetal bovine serum*) (*McAlinden* и *Wilson*, 2000; *Mazlyzam* и сар., 2008; *Hankey* и сар., 2021; *Yamamoto* и сар., 2023; *Badrul* и сар., 2024).

Иако се углавном серум користи за анализе биохемијских параметара крви, плазма, такође, може бити препарат од интереса због лакшег и бржег добијања од серума, као и могућности добијања већег волумена (*Lum* и сар., 1974). Разлике у процедури узорковања и утицај коагулационе каскаде могу да утичу на концентрацију протеина и метаболита у овим препаратима крви. Показано је да су узорци плазме испољили бољу репродуцибилност у односу на серум, можда услед процедуре узорковања која је једноставнија, јер у припреми плазме се не захтева додатно време за коагулацију као у припреми серума (*Yu* и сар., 2011). У серуму су детектоване више концентрације метаболита, попут аргинина, глукозе и декстрозе, у односу на плазму (*Ladenson* и сар., 1974; *Kronenberg* и сар., 1998; *Teerlink* и сар., 2002; *Yu* и сар., 2011). Ово се може објаснити депротеинизацијом серума када се елиминише запремински удео протеина уз распоређивање преосталих елемената мале тежине у мањој запремини, чиме се они више концентришу (*Yu* и сар., 2011). С друге стране, вредности за албумин, за однос албумин-глобулин и калијум су биле ниже у серуму него у плазми пилића (*Hrubec* и сар., 2002).

PRP представља аутологни концентрат тромбоцита који може да иницира и подржи репарацију ткива посредством фактора раста, цитокина и других микро- и макромолекула који се ослобађају након активације тромбоцита (*Marx* и сар., 1998; *Marx*, 2004; *Oryan* и сар., 2016; *Lang* и сар., 2018). Употреба *PRP*-а је испитивана у разним областима ткивног инжењерства меког и коштаног ткива, док је *PRF* проучаван у случајевима рецесије гингиве и третманима фуркације и интракоштаних дефеката (*Mijiritsky* и сар., 2021).

Изолатија серума, плазме и аутологних концентрата попут *PRP*-а и *PRF*-а подразумева концентрисање ћелија, и изолацију жељених биолошких агенаса без или са применом антикоагуланса. Смањење снаге центрифугирања уз продужетак времена центрифугирања доводи до формирања *PRF* матрица са значајно већим бројем тромбоцита и леукоцита, а последично и концентрације ослобођених фактора раста као што су *VEGF*, *PDGF-BB*, *EGF* и *TGF- β 1* (*El Bagdadi* и сар., 2017; *Wend* и сар., 2017; *Choukroun* и *Ghanaati*, 2018).

Модификације у припреми *PRF*-а имају утицај на одговор ткива, па тако је концентровани *PRF* добијен већом центрифугалном силом показао густу и стабилну фибринску структуру која служи као баријера, резистентна на ћелијску инфилтрацију, док порознија структура *PRF* матрице, добијена слабијим центрифугирањем, омогућава већу пенетрацију и миграцију ћелија уз иницијацију ангиогенезе на моделу супкутане имплантације мишу пет и десет дана по имплантацији (*Kubesch* и сар., 2019).

Употреба ињектибилног *PRF*-а побољшава апликацију и манипулацију честицама коштаних супституената и порозних блокова на бази калцијум фосфата и хидроксиапатита који се уграђују у фибринску мрежу у присуству леукоцита и тромбоцита, чиме се ствара биоактивни композитни блок за стабилизацију дефекта кости. Карактеристике ињектибилног *PRF*-а омогућавају агломерацију синтетичких или ксеногенских коштаних супституената и облагање порозног цирконијума и титанијумских површина, што би омогућило додатну стимулацију и диференцијацију остеогенних ћелија које воде ка унапређеном зарастању кости (*Oliveira* и сар., 2024).

Malhotra и сарадници доводе у питање да ли додаци попут *PRP*-а и фибрина могу посебно да допринесу регенерацији кости, наводећи да је веома битан фактор остеоиндукције комбинација ових фактора са остеокондуктивним скафолдима, као и сама техника припреме (*Malhotra* и сар., 2013).

Иако је главна улога баријерне мембране стабилизација крвног угрушка и спречавање урастања епителних ћелија, питање како крвни угрушак, или крвни деривати, тачно моделирају понашање колагенске мембране и одговор ткива у *in vivo* условима, није до сада у литератури потпуно објашњено.

1.6. ПРОБЛЕМ ИСТРАЖИВАЊА

Постоји велики број различитих модела испитивања *in vivo* који се користе за претклиничку евалуацију биокompatбилности материјала и проучавање ткивних повреда (*McGovern* и сар., 2018). Ектопични супкутани модел имплантација на мишу и пацову представља један од најзаступљенијих модела претклиничких испитивања одговора ткива на колагенске биоматеријале (*Ghanaati* и сар., 2011b; *Ghanaati* и сар., 2012; *Willershausen* и сар., 2014; *Barbeck* и сар., 2015a; *Al-Maawi* и сар., 2017). На овакав начин се могу добити информације које указују на биокompatбилност биоматеријала, способност индукције ангиогенезе и остеогенезе, степен и време биоресорбилности (*Xu* и сар., 2015; *Peric* и сар., 2015). Међутим, имплантациони регион у овом моделу је сиромашан крвним судовима док је

у регенеративној медицини контакт колагенских мембрана са крвљу, крвним угрушком и другим дериватима крви и другим биолошким факторима готово неизбежан.

Повреде коштаног ткива се често испитују на моделима артефицијалних дефеката калварије, костима вилице и дугих костију (најчешће тибије или фемура) (*McGovern* и сар., 2018). Калварија је сиромашна васкуларном мрежом, док у дефектима дугих костију који се праве пуном дубином долази до директног контакта између биоматеријала и коштане сржи. У моделима интракоштаних имплантација колагенске мембране се имплантирају самостално (*Schliephake* и сар., 2004) или у комбинацији са коштаном заменицима (*An YZ* и сар., 2017; *Sieger* и сар., 2019). Упркос великом броју претклиничких испитивања колагенских биоматеријала на анималним моделима, експерименти се најчешће спроводе са једним типом биоматеријала, једним имплантационим моделом и добијени резултати не могу бити погодни за компарирање са резултатима добијеним са другим биоматеријалима и на другом моделу имплантације. Тако, литературни подаци са компарацијом ткивног одговора на различите колагенске биоматеријале имплантиране под истим условима, на истим врстама животињама, а у различитим моделима имплантације су врло оскудни, као што су оскудни и подаци са поређењима ткивног одговора различитих животиња у различитим моделима имплантације на исти колагенски материјал што све чини да је ово истраживачко поље отворено за компаративне студије које ће дати научно релевантне и за праксу корисне податке.

Такође, недостаје експериментална евалуација ткивног одговора на колагенске биоматеријале које могу бити различито припремљени за имплантацију и тако последично примењени на различите начине. Та припрема биоматеријала за имплантацију, као и припрема на месту имплантације често иде са додатком крви и крвних деривата. То треба да симулира физиолошке услове у којима крв и крвни деривати играју важну улогу у иницијацији репарационог процеса у ткиву. Показано је да додаток ових физиолошких фактора може моделирати ткивни одговор на имплантирани биоматеријал (*Barbeck* и сар., 2015c; *Cvetković* и сар., 2015; *Najman* и сар., 2016; *Vukelić-Nikolić* и сар., 2018). Такође, постоје литературни подаци о регенерацији кости потпомогнутој колагенским биоматеријалима комбинованим са *PRP*-ом (*Wiltfang* и сар., 2004; *Pryor* и сар., 2005; *Sarkar* и сар., 2006) и о *ex vivo* испитивањима колагенских мембрана са фибрином обогаћеним тромбоцитима (енг. *Platelet-Rich Fibrin - PRF*) (*Chia-Lai* и сар. 2018, *Al-Maawi* и сар. 2019). Ипак недостају студије које би дале компаративне податке о томе колико припрема колагенских биоматеријала са додавањем физиолошких фактора крвног порекла може моделирати одговор ткива, као и како овакво обогаћивање колагенских имплантата утиче на брзину њихове биоресорбилности. Истраживање процене утицаја крви, крвног угрушка и

других деривата крви на понашање имплантата и одговор ткива је од велике важности за праксу у регенеративној медицини и регенеративној стоматологији.

The image features a central decorative frame with a scalloped top and bottom edge. Inside the frame is a grayscale microscopic image of a neural network, showing a dense web of interconnected neurons and their processes. The text is centered within this frame.

2. ПРЕДМЕТ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

2. ПРЕДМЕТ И ЦИЉЕВИ

Предмет ове докторске дисертације је процена и компарација одговора поткожног и коштаног ткива на колагенске биоматеријале који су различити по пореклу, специјском и ткивном, различите структуре, који су добијени различитим начинима производње и који су имплантирани у различитим условима, на различитим ортотопичним и ектопичним моделима експерименталних животиња. Вршиће се и утврђивање динамике ткивног одговора и потребног времена за биоресорпцију колагенских биоматеријала у зависности од места имплантације, врсте колагенског биоматеријала и начина њихове припреме за имплантацију. Анализираће се да ли, и на који начин, додати физиолошки фактори, као што је крв, мењају одговор ткива на имплантирани биоматеријал и исход примене колагенских биоматеријала у ткивном инжењерству, као и у којој мери одређена врста колагенских биоматеријала може бити добар носач за крв или деривате крви, као што су серум или плазма, и у којем моделу. Одговор ткива на имплантиране колагенске биоматеријале у свим наведеним условима и моделима ће се анализирати и пратити применом различитих метода анализе и у различитим временским периодима, како би се сагледала рана тј. иницијална инфламаторна фаза ткивног одговора на имплантирани биоматеријал и завршне фазе ткивне репарације и интеграције биоматеријала у имплантирано ткиво.

У складу са предметом докторске дисертације, постављени циљеви истраживања су:

- Анализирати и упоредити одговор ткива на колагенске биоматеријале различитог специјског порекла, са и без додатка крви, у ортотопичном моделу имплантације у дефекте на калварији пацова
- Анализирати и упоредити остерегенеративни потенцијал и биоресорбилност колагенских биоматеријала различитог специјског порекла, са и без додатка крви, у ортотопичном моделу имплантације у дефекте на калварији пацова
- Анализирати и упоредити одговор ткива на колагенске биоматеријале различитог специјског порекла на ектопичном моделу поткожне имплантације пацову
- Анализирати и упоредити одговор ткива на колагенске мембране добијене из различитих ткива исте животињске врсте, различите структуре и начина производње на ектопичном моделу поткожне имплантације пацову
- Анализирати и упоредити одговор ткива на колагенске мембране различитог специјског порекла на ектопичном моделу поткожне имплантације мишу

- Анализирати и упоредити одговор ткива на колагенске мембране различитог ткивног порекла на ектопичном моделу имплантације мишу
- Анализирати и упоредити како додаци различитих физиолошких фактора колагенским мембранама, као што су крв, плазма и серум, утичу на одговор ткива на колагенске мембране и биоресорбилност на ектопичном моделу имплантације мишу
- Испитати остеорепарациони потенцијал колагенских мембрана у комбинацији са гранулираним коштаном заменицима различитог порекла на ортотопичном моделу имплантације у коштане дефекте на тибиви кунића
- Направити анализу одговора ткива на одређени колагенски биоматеријал и његов регенеративни потенцијал у различитим моделима имплантације, са и без додатка крви
- Направити анализу у којој мери различити експериментални модели тј. место имплантације утиче на понашање биоматеријала и његов регенеративни потенцијал
- Сагледати који фактори и у којим условима и моделима доприносе успешној примени биоматеријала на бази колагена у ткивном инжењерству и регенеративној медицини

A grayscale microscopic image of biological tissue, showing a complex network of fibers and cells. The image is used as a background for a decorative frame containing text.

**3. МАТЕРИЈАЛ
И
МЕТОДИ**

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

3.1. МАТЕРИЈАЛ

3.1.1. Биоматеријали

У експериментима су коришћени следећи биоматеријали:

❖ **Колагенски скафолди и матрице:**

- Колагенски скафолд комерцијално доступан под називом **Jellagen®-3D** (*Jellagen® Limited*, Велика Британија) је добијен пречишћавањем колагена пореклом из медузе *Rhizostoma pulmo*. Према произвођачу, колагенски скафолд је модификован у процесу производње методом попречног повезивања у циљу постизања механичке стабилности. Модификација је постигнута третирањем колагенског скафолда раствором *EDC* (енг. *1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide – EDC*) у 95% алкохолу у трајању од 12 сати на температури од 4 °C, чиме је добијен колагенски биоматеријал модификован 1% *EDC*-ом, са просечном величином пора од 100 μm. После попречног повезивања, колагенски скафолди су испрани пет пута дејонизованом водом и подвргнути процесу лиофилизације. Скафолд је намењен за универзалну употребу у регенеративној медицини. (извор: <https://jellagen.co.uk/>)
- **PARASORB Sombrero®** (*RESORBA Medical GmbH*, Немачка) представља колагенску матрицу облика шеширића која се састоји од колагенске основе у виду мембране и 3Д скафолда од колагена који чини купу. Овај колагенски скафолд је добијен изолацијом колагена коњског порекла и садржи 31,2 mg фибрила коњског колагена умреженог без примене хемијских агенаса, чиме је ризик деловања хемијских резидуа на ткиво сведен на минимум (*Kunert-Keil* и сар. 2015). Према упутствима произвођача, порозна микроструктура овог скафолда представља добру основу за раст и усмеравање ћелија коштаног ткива у процедурама које се изводе у максилофацијалној хирургији.
- Колагенска матрица добијена из свињског перикарда (енг. *Porcine Pericardium-Based Collagen Matrices*) (*botiss biomaterials GmbH*, Немачка) са повећаним садржајем колагена типа III. Процес пречишћавања свињског перикарда се базирао на иницијалној влажној хемијској обради која је праћена лиофилизацијом и стерилизацијом применом гаса етилен оксида (*Flaig* и сар. 2020). У коначном обрађеном облику матрица добијена из свињског перикарда има порозну тродимензионалну структуру.

❖ **Колагенске мембране**

- **Jason®** мембрана (*botiss biomaterials GmbH*, Немачка) је порозна колагенска мембрана пореклом из перикарда свиње богата колагеном типа III. Процес пречишћавања у току производње је укључивао лиофилизацију и стерилизацију етилен оксидом. Процењено време биодеградације је између 12 и 28 недеља. (извор: <https://botiss.com/product/jason-membrane/>)
- **Collprotect®** (*botiss biomaterials GmbH*, Немачка) је колагенска мембрана добијена од коже свиња. Ова колагенска мембрана има двослојну структуру, састоји се од порозног слоја и глатког, компактног слоја. (извор: <https://botiss.com/product/collprotect-membrane/>)
- **Ossix® Plus** (*Datum Dental Biotech*, Израел) је непорозна колагенска мембрана која је добијена изолацијом колагена из тетива свиња, богата колагеном типа I. Умрежавање колагенских влакана у процесу производње је постигнуто применом шећера рибозе. Стерилизација материјала је постигнута применом етилен оксида. (извор: <https://regenerative.dentsplysirona.com/ossix-brand/ossix-plus>)
- **Bio-Gide®** мембрана (*Geistlich Biomaterials*, Швајцарска) је колагенска мембрана пореклом из свињског перитонеума и састоји се изколагена типа I и III. Ова мембрана је двослојна, састоји се од густог спољашњег слоја и сунђерастог унутрашњег слоја, није хемијски модификована у процесу производње у циљу умрежавања и стерилисина је гама зрачењем (*Jin и сар. 2023*).
- **4BONE RCM** (*MIS Implants Technologies Ltd.*, Израел) је ресорбилна колагенска мембрана пореклом из коже свиња која садржи колаген тип I и III. Колагенска влакна су умрежена методом хемијског умрежавања применом формалдехида као умреживача, чиме је постигнуто продужено време ресорпције мембране па се она може користити као ефикасна баријера у вођеној ткивној регенерацији у трајању од четири до шест месеци, на основу информација које даје произвођач. (извор: [https://www.mis-implants.com/upload/PDF/4BONE_RCM_Leaflet_\(MC-RCMCE\)_Rev2.pdf](https://www.mis-implants.com/upload/PDF/4BONE_RCM_Leaflet_(MC-RCMCE)_Rev2.pdf))
- **PARASORB RESODONT®** (*RESORBA Medical GmbH*, Немачка) је колагенска мембрана коњског порекла која садржи 2.8 mg колагенских влакана по cm². Према информацијама датим од стране произвођача, ова мембрана је ресорбилна и произведена је процедуром која укључује методу умрежавања без употребе хемијских умреживача. (извор: <https://ccdentistry.ro/wp-content/uploads/2019/06/resorba-membrane-resodont-2019.pdf>)

❖ Гранулирани коштани супституенти

- **Maxresorb®** (*botiss biomaterials GmbH*, Немачка), је синтетски заменик костију са контролисаним временом ресорпције које је постигнуто комбинацијом 60% хидроксиапатита који се спорије ресорбује, и 40% брзо ресорбујућег бета-трикалцијум фосфата. Специфичним процесом производње је омогућено стварање комплетне хомогене дистрибуције обе минералне фазе. Овакав специфичан састав порозне и хидрофилне површине треба да омогући брзо формирање нове кости, механичку и запреминску стабилност. (извор: <https://botiss.com/product/maxresorb/>)
- **Maxgraft®** (*botiss biomaterials GmbH*, Немачка), представља пречишћен алогенски продукт, хуманог порекла, произведен у Банци ћелија и ткива у Аустрији (енг. *Cells+Tissuebank Austria, CTA*). Као хумани алогенски продукт он има очуване биомеханичке особине, стерилан је и постојан на собној температури у трајању од 5 година. Показује остеокондуктивне особине које подржавају спонтано и усмерено ремоделовање коштаног ткива. (извор: <https://botiss.com/product/maxgraft-granules/>)

3.1.2. Експерименталне животиње

У експериментима су коришћене експерименталне животиње из Виваријума Медицинског факултета Универзитета у Нишу а експерименти су обављени у Научноистраживачком центру за биомедицину Медицинског факултета Универзитета у Нишу. Животиње су одгајане у стандардним условима који подразумевају период од 12 часова светла и 12 часова мрака, са приступом храни и води *ad libitum*. Експерименталне процедуре над животињама су одобрене од стране Етичке Комисије за заштиту добробити експерименталних животиња Медицинског факултета Универзитета у Нишу и Управе за ветерину Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије, број одлуке 323-07-00278/2017-05/6 од 13.07.2017. године и 323-07-09101/2020-05/5, од 26.08.2020. Све процедуре су спроведене у складу са Актом о добробити животиња Републике Србије. У експериментима су коришћени пацови Wistar соја и мишеви BALB/c соја, оба пола, два до четири месеца старости.

3.2. МОДЕЛИ

У експериментима су коришћени ортотопични и ектопични модели. Сви експериментални модели су креирани након увођења животиња у општу анестезију која је постигнута комбинацијом кетамина (10% Кетамидор, раствор за ињекцију, 100 мг/мл,

Richter pharma, Аустрија) у дози 100 мг/кг телесне масе (за мишеве и пацове) или 50 мг/кг телесне масе (за куниће) и ксилазина (*Xylazin Bio 2%*, раствор за ињекцију, 20 мг/мл, *BIOVETA*, Чешка Република) у дози 5 мг/кг телесне масе (за мишеве, пацове и куниће), у складу са стандардним протоколима за анестезију експерименталних животиња. Пре креирања коштаних дефеката и поткожне имплантације, оперативни регион је припреман бријањем длаке и дезинфекцијом коже 10% раствором повидон јода (*Хемофарм*, Република Србија). Мониторинг животиња је вршен свакодневно након имплантације биоматеријала, где је праћен изглед оперативног подручја као и опште здравствено стање животиња. Оперативна нега животиња пре и после интервенције је спроведена по принципима добробити животиња (енг. *Animal Health and Welfare*).

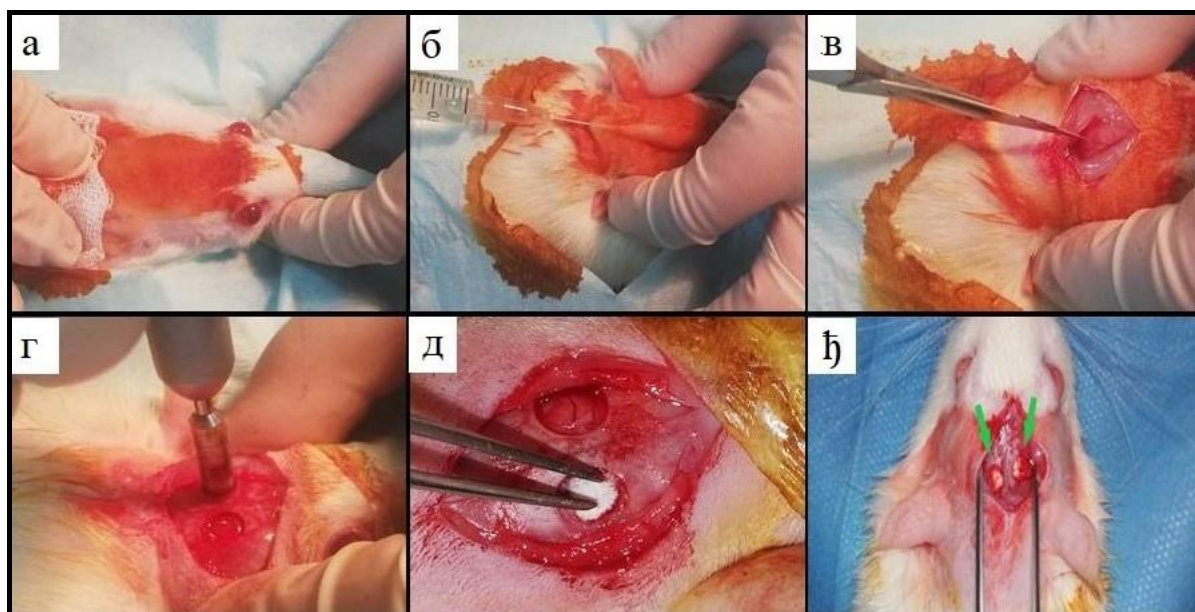
3.2.1. Ортогипични модели

У експериментима су коришћени ортогипични модели који су подразумевали:

1. креирање коштаних дефеката у калварији пацова и
2. креирање коштаних дефеката у тибији кунића.

3.2.1.1. Ортогипични модел на калварији пацова

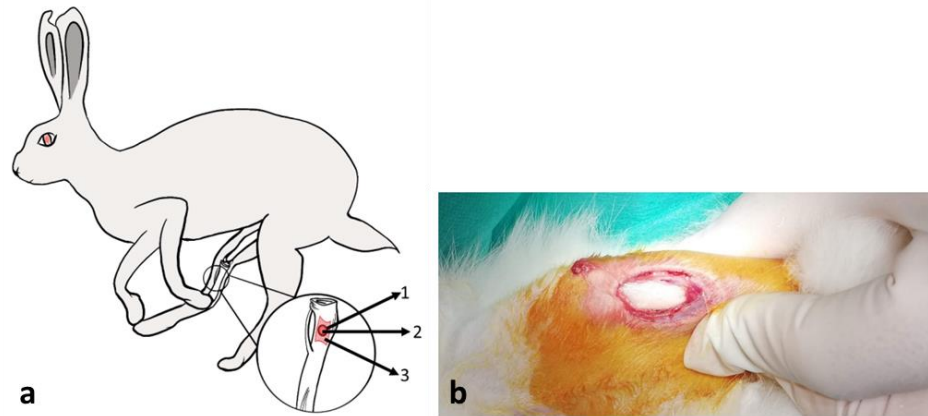
У експериментима креирања коштаних дефеката на калварији пацова су коришћене животиње мушког пола, соја *Wistar*, старости 10-12 недеља. Након увођења животиња у општу анестезију применом кетамина и ксилазина интраперитонеално, и по припреми оперативне регије у ортогипичном моделу имплантације пацову, на кожи главе је прављена инзиција дужине око 2 цм, након чега су по померању периоста са мишићима креирана по два коштана дефекта пуне дубине, дијаметра 5 мм. Дефекти су прављени трепанским борерима пречника 5 мм (*Denti System*, Мађарска) уз претходну примену локалног анестетика (лидокаин 2% -андреналин, раствор за ињекцију 40 мг /2 мл + 0,025 мг/2 мл, Галеника, Република Србија) и константног испирања физиолошким раствором. Након креирања коштаних дефеката, приступило се имплантацији биоматеријала. Процедура креирања коштаних дефеката на калварији пацова и имплантација биоматеријала у дефекте је приказана на слици 3.1.



Слика 3.1. Креирање коштаних дефеката и имплантација биоматеријала на калварији пацова. Припрема оперативне регије (а), ињектирање локалног анестетика (б), прављење инцизије и уклањање периоста (в), прављење дефекта (г), позиционирање имплантата (д), изглед коштаних дефеката попуњених имплантатима (ђ).

3.2.1.2. Ортопични модел на тибији кунџа

Ортопичне имплантације на кунџима су вршене на женкама, соја новозеландски бели. Општа анестезија животиња је постигнута применом комбинације кетамина и ксилазина интрамускуларно. Након увођења у општу анестезију, оперативна регија потколенице је обријана и дезинфикована раствором повидон јода. Инцизија дужине око 2 цм је прављена хируршким скалпелом, након чега су кожа, мишићи и периост уклоњени хируршким форцепсом како би се изложило место имплантације на медијалном делу тибије. На тибији је прављен по један дефект пуне дубине и пречника 5 mm, трепанским борерима уз константно испирање физиолошким раствором. Процедура креирања коштаних дефеката у тибији кунџа и имплантација биоматеријала у дефекте је приказана на слици 3.2.



Слика 3.2. Шематски приказ креирања и попуњавања дефекта у тибији кунућа (а) и изглед дефекта у тибији кунућа прекривеног биоматеријалом и оперативног поља након завршене имплантације (б); (1) дефект, (2) коштани заменик и (3) колагенска мембрана. Преузето и адаптирано из: *Coraca-Huber* и сар. 2022, *Jung* и сар. 2021.

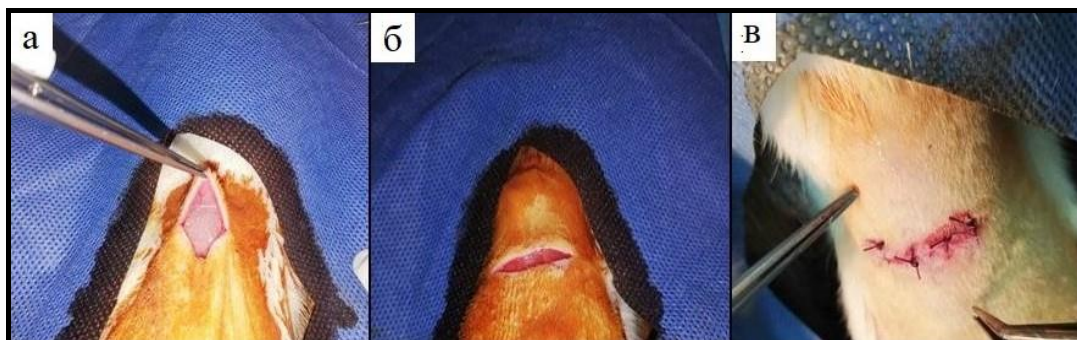
3.2.2. Ектопични модели

У експериментима су коришћени ектопични модели који су подразумевали:

1. модел ектопичне поткожне имплантације пацову
2. модел ектопичне поткожне имплантације мишу

3.2.2.1. Модел ектопичне имплантације пацову

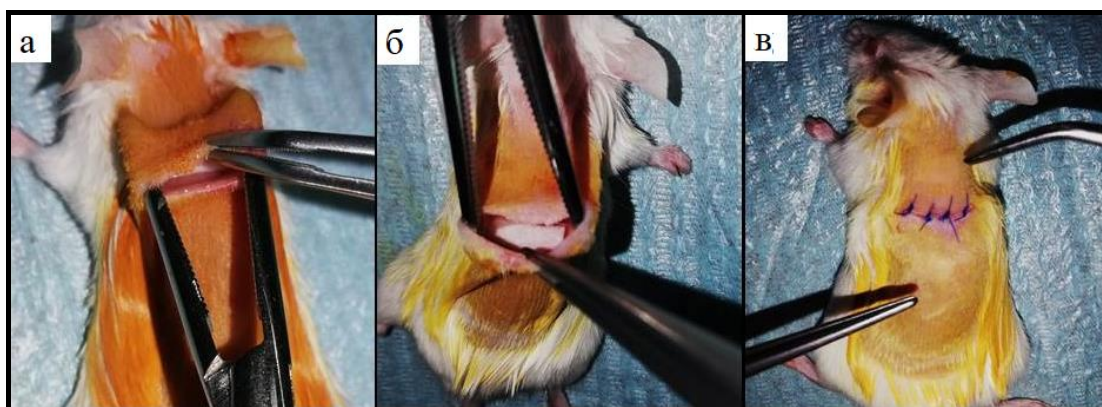
У ектопичном моделу поткожне имплантације пацову су коришћени пацови мушког и женског пола, Wistar соја. На обријаном и дезинфикованом интер- и субскапуларном региону анестезираних пацова је прављен хоризонтални хируршки рез дужине око 1,5 цм, а затим и поткожни џеп изнад инцизије у који је убациван биоматеријал (по методама: *Barbeck* и сар., 2016а; *Barbeck* и сар., 2016б; *Barbeck* и сар., 2015с; *Ghanaati* и сар., 2014). Процедура поткожне имплантације биоматеријала пацову је приказана на слици 3.3.



Слика 3.3. Поткожна имплантација пацову. Имплантиран материјал (а), затварање реза (б), ушивена рана након имплантације (в).

3.2.2.2. Модел ектопичне имплантације мишу

У оквиру ектопичног модела поткожне имплантације мишу су коришћени мишеви соја BALB/с, женског и мушког пола, старости 8-10 недеља. Мишеви су уведени у општу анестезију применом мешавине кетамина (100 мг/кг телесне масе) и ксилазина (5 мг/кг телесне масе) интраперитонеално, а хируршки поступак је изведен према описаним протоколима (Korzinskas и сар., 2018; Gueldenpfennig и сар., 2020; Jung и сар., 2020). У интерскапуларном и субскапуларном пределу леђа је хируршким ножем направљен је рез величине око 1 цм, а затим је направљен по један поткожни џеп изнад и испод инцизије. Свака животиња је носила по два импланта биоматеријала исте врсте, припремљена на исти начин. По имплантацији биоматеријала поткожно, хируршки рез је ушивен хируршким нересорбилним концем, а рана је затим дезинфикована раствором повидон јода. Процедура поткожне имплантације биоматеријала мишу је приказана на слици 3.4.



Слика 3.4. Поткожна имплантација мишу. Импантиран материјал изнад реза (а), импантиран материјал испод реза (б), ушивена рана након имплантације и позиција импантираних материјала (в).

3.3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДИЗАЈН

Експерименти у оквиру ове докторске дисертације су груписани у студије према коришћеном моделу, типу испитиваног биоматеријала и конструисаног импланта. Називи експерименталних група у оквиру студија су дати према типу материјала, пореклу и додатку који коришћен у припреми имплантата. Ознаке које су коришћене у називима експерименталних група су дате на начин који је представљен у Табели 3.1.

Табела 3.1. Начин обележавања експерименталних група.

Тип биоматеријала	Порекло биоматеријала	Ткивно из којег је добије биоматеријал	Додатак биоматеријалу
Кск – колагенски скафолд Кмт – колагенска матрица Км – колагенска мембрана СиКз – синтетски коштани заменик ХуКз – хумани коштани заменик	М – пореклом из медуза С – свињског порекла К – коњског порекла	Пт – перитонеум Пк – перикард Те – тетива Кж – кожа	Ф – физиолошки раствор Кр – разблажена крв Се – серум Пл – плазма

3.3.1. Студија 1: Компарација одговора ткива на различито припремљене колагенске биоматеријале различитог порекла у ортотопичном моделу имплантације пацову

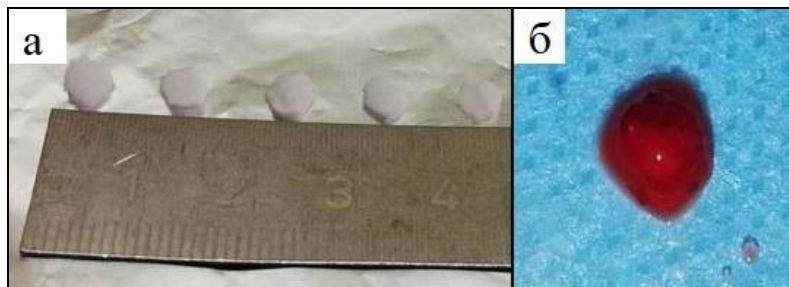
Имплантације биоматеријала на калварији пацова су вршене у оквиру Студије 1 након креирања коштаног дефекта, ради компарације колагенских скафолда различитог порекла, са додатком физиолошког раствора и разблажене крви. У овој студији су формиране четири експерименталне групе, при чему су једну експерименталну групу чиниле животиње са имплантатима који су припремљени од истог биоматеријала и на исти начин тј. са истим додатком:

1. Група **КскМ+Ф** (*Jellagen®-3D* колагенски скафолд пореклом из медузе+ физиолошки раствор);
2. Група **КскМ+Кр** (*Jellagen®-3D* колагенски скафолд пореклом из медузе + разблажена крв);
3. Група **КскК+Ф** (*PARASORB Sombrero®* колагенски скафолд коњског порекла + физиолошки раствор);
4. Група **КскК+Кр** (*PARASORB Sombrero®* колагенски скафолд коњског порекла + разблажена крв).

Свака експериментална група имала је своју контролну групу коју су чинили празни коштани дефекти на калварији. Калварија сваког пацова имала је један празан контролни дефект (контролна група) и један дефект попуњен колагенским биоматеријалом (експериментална група).

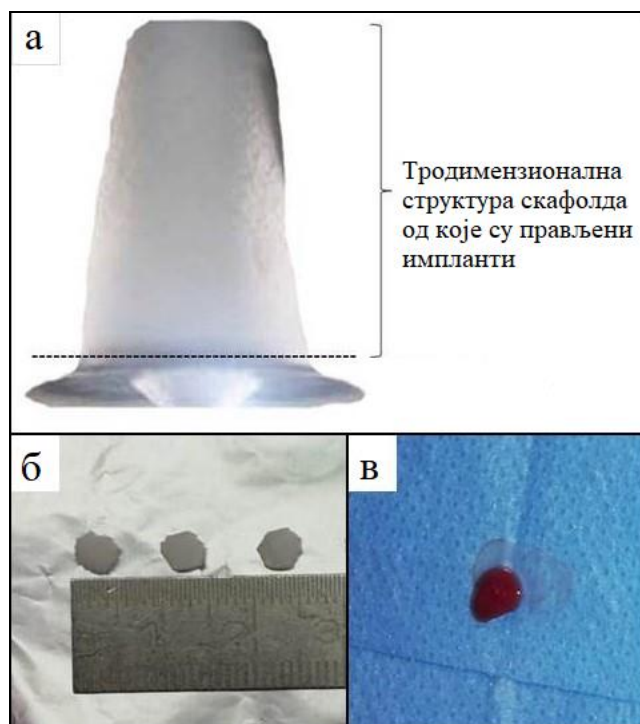
Крв која је коришћена за формирање имплантата је изолована из репне вене истог пацова коме је и вршена имплантација, а потом разблажена физиолошким раствором три пута.

Од једног *Jellagen®-3D* колагенског скафолда у комерцијално доступном облику у форми диска, пречника 1 цм и дебљине 0,5 цм су формирана по два имплантата пречника 0,5 цм и дебљине 0,5 цм како би пречник скафолда одговарао пречнику креираних дефеката на калварији (Слика 3.5).



Слика 3.5. Изглед имплантата **КскМ** (а) и **КскМ+Кр** (б) непосредно пред имплантацију.

За формирање имплантата група **КскК+Ф** и **КскК+Кр** коришћен је тродимензионални део облика „шеширића“ биоматеријала *PARASORB Sombrero®*. Од тродимензионалне структуре биоматеријала су формирана дискови пречника 0,5 цм и дебљине 0,5 цм који су имплантирани у дефекте калварије (Слика 3.6).



Слика 3.6. Шематски приказ колагенског скафолда *PARASORB Sombrero®* (а). Изглед имплантата **КскК+Ф** (б) и **КскК+Кр** (в) непосредно пред имплантацију.

Непосредно пред имплантацију, колагенским материјалима је додато по 30 микролитара физиолошког раствора или разблажене крви и инкубирани су на собној

температури до имплантације (око 10 минута). Након затварања хируршког реза и дезинфекције оперативног подручја животиње су пробуђене из анестезије и њихово стање је праћено свакодневно. У складу са циљем ове студије, 10 и 60 дана након креирања дефеката и имплантације, животиње су еутаназиране употребом прекомерне дозе анестетика и калварије су узете и фиксиране у формалину за даљу анализу процеса регенерације коштаног ткива хистолошким, хистоморфометријским и имунохистохемијским методама.

3.3.2. Студија 2: Компарација одговора ткива на колагенске биоматеријала различитог порекла на ектопичном моделу имплантације пацову

У Студији 2 је компариран одговор поткожног ткива на колагенске биоматеријале различите структуре и порекла: колагенски скафолд пореклом из медузе и колагенска матрица добијена из свињског перикарда. У оквиру ове студије су формиране две експерименталне групе, при чему су једну групу чиниле животиње којима је имплантирана иста врста имплантата:

1. **Група КскМ** (*Jellagen®-3D* колагенски скафолд пореклом из медузе);
2. **Група КмтСПк** (колагенска матрица пореклом из свињског перикарда).

Сваку експерименталну групу је чинило 20 животиња, а имплантирани биоматеријали су експлантирани са околним поткожним ткивом и кожом након 10, 30, 60 и 90 дана од имплантације ради процене и компарације одговора поткожног ткива на имплантиране биоматеријале. По свакој експерименталној групи и сваком термину је анализирано по пет животиња. Експлантирани материјал је фиксиран у формалину ради даље хистолошке, хистоморфометријске и имунохистохемијске анализе.

3.3.3. Студија 3: Компарација одговора ткива на колагенске мембране добијене из различитих ткива на ектопичном моделу имплантације пацову

У Студији 3 је компариран одговор поткожног ткива на колагенске мембране свињског порекла али које су добијене из различитих ткива и произведене на различите начине. У оквиру ове студије су формиране три експерименталне групе и једна контролна група. У оквиру три експерименталне групе имплантиране су колагенске мембране величине 1*1 цм, а контролна група се састојала од лажно оперисаних животиња које су прошле исту

оперативну процедуру са креирањем поткожног џепа, али им није имплантиран биоматеријал:

1. **Група КмСТе** (*Ossixplus*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из тетиве);
2. **Група КмСПт** (*Bio-gide*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из перитонеума);
3. **Група КмСПк** (*Jason*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из перикарда);
4. **Контролна група ЛО**: лажно оперисане животиње.

Експерименталне групе животиња којима су имплантиране колагенске мембране су се састојале од по 15 животиња, а одговор ткива на имплантиране мембране је анализиран 10, 30 и 60 дана након имплантације (по сваком термину је било пет животиња), док је контролна група бројала 12 животиња (четири по сваком термину) са истим терминима анализе. Имплантиране мембране тј. остаци мембрана су експлантирани са околним поткожним ткивом и кожом и фиксирани формалином ради даље хистолошке, хистоморфометријске и имунохистохемијске анализе.

3.3.4. Студија 4: Компарација одговора ткива на колагенске мембране различитог порекла на ектопичном моделу имплантације мишу

У **Студији 4** је компариран одговор поткожног ткива на колагенске мембране различитог порекла. Формиране су две експерименталне групе, према типу мембране, којима су имплантиране колагенске мембране величине 1*1 цм:

1. **Група КмС** (4BONE RCM колагенска мембрана свињског порекла)
2. **Група КмК** (PARASORB RESODONT® колагенска мембрана коњског порекла)

У свакој експерименталној групи је било по пет животиња којима су имплантиране колагенске мембране. Одговор ткива на имплантиране колагенске мембране је анализиран у три временска термина: 3, 10 и 30 дана након имплантације при чему је по сваком термину било пет животиња. Остаци имплантиране колагенске мембране са околним поткожним ткивом и кожом фиксирани су у формалину ради даље хистолошке и хистоморфометријске анализе.

3.3.5. Студија 5: Компарација одговора ткива на колагенске мембране са додатком различитих физиолошких фактора на ектопичном моделу имплантације мишу

У оквиру Студије 5 је компариран одговор поткожног ткива на колагенске мембране свињског порекла добијених из различитих ткива, уз додатак различитих физиолошких фактора као што су крв, плазма и серум. У оквиру ове студије је формирано осам група:

1. **Група КмСПк+Ф** (*Jason*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из перикарда + физиолошки раствор);
2. **Група КмСПк+Се** (*Jason*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из перикарда + серум);
3. **Група КмСПк+Пл** (*Jason*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из перикарда + плазма);
4. **Група КмСПк+Кр** (*Jason*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из перикарда + разблажена крв);
5. **Група КмСКж+Ф** (*Collprotect*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из коже + физиолошки раствор);
6. **Група КмСКж+Се** (*Collprotect*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из коже + серум);
7. **Група КмСКж+Пл** (*Collprotect*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из коже + плазма);
8. **Група КмСКж+Кр** (*Collprotect*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из коже + разблажена крв).

Групе са физиолошким раствором (група **КмСПк+Ф** и група **КмСКж+Ф**) су биле контролне групе за групе са физиолошким факторима (крв, плазма и серум) које су биле експерименталне.

Имплантиране колагенске мембране су биле величине 0,5*1 цм, а по једној животињи су имплантиране две такве мембране истог типа и са истим додатком. Крв која је коришћена за формирање имплантата са крвљу је претходно изолована из ретроорбиталног плексуса неколико миша и пулована а затим разблажена физиолошким раствором три пута и додата мембранама. За припрему имплантата група у којима је колагенској мембрани додат серум, крв је изолована из ретроорбиталног плексуса, без антикоагуланса ради добијања серума, и остављена да коагулише на собној температури. Након формирања коагулума серум је издвојен центрифугирањем у трајању од 10 минута на 3000 обртаја по минути. За формирање имплантата група у којима је колагенској мембрани додата плазма, крв је изолована из

ретроорбиталног плексуса уз примену 4% натријум-цитрата као антикоагуланса у односу 1:9 ради добијања крвне плазме и центрифугирана је 10 минута на 3000 обртаја/мин на собној температури (Cheng и сар., 2017; Denapoli и сар., 2016; Borhani-Haghighi и Mohamadi, 2019; Messori и сар., 2019). Колагенским мембранама је непосредно пред имплантацију додато око 25 микролитара одређеног физиолошког фактора (разблажене крви, плазме или серума) или физиолошког раствора, у стерилним плочама са 24 бунарчића на собној температури (Слика 3.7). Предложено је да време рехидратације колагенских мембрана буде барем два минута а максимално четири часа пре употребе, што је у случају наших припрема испоштовано (Schröger и сар., 2024).



Слика 3.7. Изглед колагенских мембрана након додавања биолошких фактора и физиолошког раствора непосредно пред имплантацију: изглед имплантата у групама КмСПк+Ф (а), КмСПк+Кр (б), КмСКж+Ф (в) и КмСКж+Кр (г)

С обзиром да се колагенска мембрана *Collprotect*, која је у основи имплантата група 5 до 8, састоји од две стране, глатке и храпаве, имплантати ове групе су имплантирани са храпавом страном окренутом ка мишићу поткожног ткива (по методама: Ghanaati и сар., 2011; Ghanaati 2012; Bozkurt и сар., 2014).

Свака експериментална група се састојала од 15 животиња. Одговор ткива на имплантиране колагенске мембране са различитим додацима је анализиран три, 10 и 30 дана након имплантације. По сваком анализираном термину је било пет животиња по свакој

експерименталној групи. Животиње су у наведеним терминима еутаназиране употребом прекомерне дозе анестетика и остаци имплантираних мембрана са околним поткожним ткиво и кожом су након узорковања фиксирани у формалину ради даље хистолошке и хистоморфометријске анализе као и у глутералдехиду ради даље анализе применом електронске микроскопије.

3.3.6. Студија 6: Испитивање остеорепарационог потенцијала колагенских мембрана у комбинацији са гранулираним коштаном заменицима на ортотопичном моделу имплантације кунићу

Модел ортотопичне имплантације на тибиви кунића је изведен у оквиру Студије 6, са циљем проучавања остеорепарационог потенцијала колагенских мембрана у комбинацији са гранулираним коштаном заменицима различитог порекла. Једна врста имплантата се састојала од једне врсте гранулираног коштаног заменика којим је пуњен коштан дефект и од колагенске мембране *Jason*® која је прекривала гранулирани коштан заменик у дефекту. Једна врста имплантата је чинила једну експерименталну групу и била имплантирана у једну тибиви кунића. Сваки кунић је имао по два дефекта и имплантирана два имплантата, у обе тибиве по један, при чему је увек иста група имплантата била имплантирана у исту тибиву:

1. **Група СиКз+КмСПк** (синтетски коштан заменик *Maxresorb*® + *Jason*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из перикарда; имплантати у десним тибивама);
2. **Група ХуКз+КмСПк** (коштански заменик *Maxgraft*® хуманог порекла + *Jason*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из перикарда; имплантати у левим тибивама).

Након попуњавања коштаног дефекта и покривања колагенском мембраном, извршена је репозиција периоста и мишића и ушивање ране. Укупно је у овој студији било укључено 15 животиња, а анализе су рађене 10, 30 и 90 дана након хируршке интервенције, након еутаназирања животиња употребом прекомерне дозе анестетика.

3.4. МЕТОДИ

Материјал који је добијен у спроведеним студијама, а који подразумева имплантиране биоматеријале са околним ткивом, је обрађен и припремљен за даље анализе као што су хистолошка, хистохемијска, имунихистохемијска и хистоморфометријска као и анализа скенинг електронском микроскопијом, ради процене и компарације одговора ткива на имплантиране биоматеријале, као и опсега биоресорпције имплантираног колагенског

биоматеријала, зависно од карактеристика структуре, порекла, начина добијања и типа колагенског биоматеријала, додатих физиолошких фактора биоматеријалима, као и ради процене степена регенерације коштаног ткива зависно од различито примењених ткивноинжењерских приступа.

3.4.1. Хистолошка обрада ткива

Експлантирани биоматеријал са околним ткивом је фиксиран у 10% неутралном пуферисаном формалину у трајању од најмање 48 сати.

Ткивни имплантати су подељени по центру имплантационог региона на два сегмента идентичне величине, који су посебно калушљени. Обрада ткива након фиксације формалином је спроведена дехидратацијом кроз серију етанола растуће концентрације (50%, 70%, 80%, 96%, 100%), су просветљени у ксилолу и укалушљени у парафину. Добијени парафински блокови са ткивом су сечени на исечке дебљине 3–5 микрометара на микротому (*SLEE*, Немачка и *Leica RM2125 RT*, Немачка).

У ортотопичним моделима, експлантирана кост је након фиксације у формалину најпре декалцинисана применом етилендиаминтетрасирћетне киселине (енг. *Ethylenediaminetetraacetic acid - EDTA*) (*Carl Roth GmbH*, Немачка) а затим су узорци ткива обрађени на претходно описан начин и укалушљени у парафинске блокове.

3.4.2. Хистохемијска анализа

Добијени ткивни пресеци су коришћени за следећа хистохемијска бојења: хематоксилин-еозин (*H&E*), пентахромно бојење по *Movat*-у, трихромно бојење по *Masson*-у и трихромно бојење по *Azan*-у. За свако бојење, ткивни пресеци су најпре депарафинисани а затим рехидратисани провлачењем кроз серију етанола опадајуће концентрације и финално до дестиловане воде. По завршетку бојења ткивни пресеци су дехидратисани провлачењем кроз серију етанола растуће концентрације, просветљени у ксилолу а затим прекривани *DPX*-ом и покровним стаклима.

3.4.2.1. Хематоксилин-еозин бојење

Припремљени ткивни пресеци су бојени најпре *Mayer*-овим хематоксилином (*Diapath S.p.A.*, Италија) у трајању од 10 минута, испирани а затим бојени воденим раствором еозина у трајању од 5 мин након чега је уследила дехидратација и покривање.

3.4.2.2. Пентахромно бојење по *Movat*-у

Пентахромно бојење по *Movat*-у је вршено по установљеном протоколу (*Lindner* и сар., 2020). Претходно припремљени ткивни пресеци су третирани са 1% *alcian blue* у трајању од 15 минута, па испирани чесменском водом пет минута и потапани у базном алкохолу у трајању од сат времена. Након алкохола су испирани чесменском водом 10 минута и бојени *Weigert*-овим хематоксилином у трајању од 10 минута, након чега су поново кратко испирани дестилованом водом. После тога је уследило потапање у 5% натријум-тиосулфату у трајању од једног минута и испирање дестилованом и чесменском водом. Након испирања узорци су бојени са *Brilliant Crocein acid* 10 минута, третирани 1% сирћетном киселином 30 секунди, затим са 5% фосфоволрамне киселине у трајању од 20 минута и 1% сирћетном киселином два минута. Уследила је дехидратација 99,9% етанолом у трајању од 1 минута, бојење *Safron du Gatinais* у трајању од шест минута, па опет дехидратација 99,9% етанолом у трајању од два минута и потапање у ксилол у трајању од пет минута, након чега су прекривени *DPX*-ом и покровним стаклима.

3.4.2.3. Трихромно бојење по *Masson*-у

Депарафинисани и рехидратисани ткивни пресеци су потапани у Боуинов раствор (*Sigma Aldrich*, САД) на температури од 56°C у трајању од 15 минута. Након испирања текућом водом, ткивни пресеци су бојени *Weigert*-овим хематоксилином у трајању од 10 минута, а затим испирани водом. Након тога је уследило бојење ткивних пресека раствором киселог фуксина (*Sigma Aldrich*, САД) у трајању од 10 минута и испирање дестилованом водом. Затим су ткивни пресеци потапани у раствор направљен од фосфоволфрамске киселине и фосфомолибденске киселине и бојени анилин плавим у трајању од пет минута. Након испирања дестилованом водом, ткивни пресеци су потапани у 1%-ни раствор сирћетне киселине у трајању од 3 минута, дехидратисани и покривени.

3.4.2.4. Трихромно бојење по *Azan*-у

Ткивни пресеци припремљени за бојење су најпре бојени *Nuclear Fast Red* бојом у трајању од 30 минута, испирани водом третирани алкохолним раствором анилина у трајању од три минута, затим алкохолним раствором сирћетне киселине у трајању од једног минута, воденим раствором фосфоволфрамске киселине у трајању од 10 минута, испирани дестилованом водом, након чега су третирани радним раствором Азан боје. Радни раствор

Азан боје је добијен мешањем анилин плавог, *orange G* и сирћетне киселине. По третирању радним раствором, ткивни пресеци су дехидрирани и покривани.

3.4.3. Имунохистохемијска анализа

Имунохистохемијска анализа је рађена на узорцима из студија 1, 2 и 3 како би се анализирала експресија маркера M1 и M2 макрофага и маркера крвних судова у циљу праћена степена инфламације и васкуларизованости као одговора на имплантиране колагенске биоматеријале различитог порекла и начина припеме. Ткивни пресеци су бојени имунохистохемијски након депарафинизације и рехидратације. Најпре је урађено демаскирање епитопа топлотом што је постигнуто инкубирањем ткивних пресека са цитратним пуфером и протеиназом К (pH 8) у трајању од 20 минута на 96 °C (Студије 1 и 2) или са *TRIS-EDTA* пуфером (pH 9) у трајању од 15 мин на 150 °C у претходно загрејаној микроталасној пећници (Студија 3), након чега је уследило хлађење узорака у трајању од 35 минута. Након хлађења, узорци су испирани *TBS-T* пуфером (Студије 1 и 2) или пуфером за испирање (*Wash Buffer 20×*, *Zytomed Systems*, Немачка) (Студија 3), као и водоник-пероксидом да би се постигла блокада ендogene пероксидазе. Након тога, ткивни пресеци су инкубирани блокирајућим раствором (*Vector Laboratories*, САД у оквиру **Студије 1 и 2**; *Blocking Solution*, *Zytomed Systems*, Немачка, **Студија 3**) у трајању од 10 минута. Ткивни пресеци су затим инкубирани са примарним антителима: поликлонским зечјим анти-*CD11c* (abx231412, *Abxexa Ltd.*, Велика Британија, разблажење 1:200), моноклонским зечјим анти-*CD163* (ab182422, *Abcam*, Велика Британија, разблажење 1:500), и моноклонским зечјим анти-*CD31/PECAM-1* (ab225883, *Abcam*, Велика Британија, разблажење 1:2000). Након примарног, ткивни пресеци су инкубирани са секундарним антителима (*Zytomed Systems*, Немачка) а визуелизација везивања антитела је постигнута применом стрептавидин-алкално-фосфатазног коњугата (*Zytomed Systems*, Немачка) и алкалне фосфатазе као хромогеном (*Zytomed Systems*, Немачка). Контрастирање је постигнуто употребом *Mayer*-овог хематоксилина (*Merck KGaA*, Немачка), након чега је уследила дехидратација ткивних пресека и покривање.

3.4.4. Анализа обојених ткивних пресека светлосном микроскопијом

Хистолошки препарати ткива су анализирани применом светлосне микроскопије са светлим пољем. У ту сврху је коришћено неколико светлосних микроскопа: *Axio Scope. A1* у комбинацији са дигиталном камером *Axiocam 305* (*Carl Zeiss*, Немачка), *Panthera U light*

(Motic, Кина) са *Axiocam 105 color* камером (*Carl Zeiss*, Немачка) и *Leica DMLS са CMEX-10 Pro* (*Euromex Microscopen BV*, Холандија) камером. Микрографије су направљене на различитим увећањима

3.4.5. Хистоморфометријска анализа

Хистоморфометријска анализа обојених ткивних пресека је вршена у софтверима *ZEN Core V3* (*Carl Zeiss*, Немачка), *ImageJ* (*National Institute of Health*, САД) и *NIS Elements* верзија 3.2 (*Nikon*, Јапан). За сваку врсту имплантата је анализирано минимум пет узорака по термину. Пре хистоморфометријских мерења је извршена калибрација у датом софтверу у односу на одговарајући *scale bar*, при увећању објектива од 10 пута. За сваки имплантат је дефинисан регион од интереса (енг. *region of interests - ROI*) у оквиру кога су одређивани параметри од интереса. Хистоморфометријска мерења на обојеним препаратима експлантираног ткива су изведене по методологији *Lee* и сар. 2015; *Ho* и сар. 2015; *Liu* и сар. 2016; *Flaig* и сар. 2020; *Tu* и сар. 2020; *Stojanović* и сар. 2020; *Oberdiek* и сар. 2021; *Pröhl* и сар. 2021. *Radenković* и сар. 2021 при чему су одређивани следећи параметри:

1. **Површина новоформиране кости** (укупна површина новоформиране кости / површина дефекта, изражена у процентима);
1. **Површина нересорбованог материјала** (укупна површина нересорбованог материјала / површина дефекта, изражена у процентима);
2. **Васкуларизованост имплантата** (укупна површина крвних судова / површина дефекта, изражена у процентима);
3. **Густина крвних судова** (укупан број крвних судова / површина дефекта, изражена као број крвних судова по mm^2);
4. **Број ћелија позитивних на одређени маркер**, изражен као број ћелија на mm^2 имплантационе површине.
5. **Дебљина колагенског материјала** (мерена на сваком препарату на минимум пет различитих места дуж пресека материјала, изражена у микрометрима).

3.4.6. Скенинг електронска микроскопија

Применом скенинг електронске микроскопије су анализирани узорци биоматеријала са околним ткивом, који су испитивани у комбинацијама са физиолошким факторима у оквиру Студије 5. Експлантирани узорци су за потребе ове анализе фиксирани у 2,5%-ном раствору глутаралдехида у фосфатном пуферу преко ноћи на 4 °С, након чега су испрани фосфатним пуфером и дехидратисани у растућим концентрацијама етанола (30%, 50%, 70%, 80%, 90%,

96%, 100%, 100%) и ацетона (30%, 50%, 100%). По завршетку дехидратације, експлантати су сушени применом методе сушења на критичној тачки (енг. *critical point*), напарени златом на апарату *JFC-1100E*, *JEOL*, Јапан и посматрани на скенинг електронском микроскопу *JSM 5300*, *JEOL*, Јапан.

3.4.7. Статистичка анализа добијених резултата

За статистичку анализу података добијених применом квантитативних метода анализе, као што је хистоморфометријска анализа, коришћен је тест анализе варијансе (*ANOVA*) у програму *RStudio Team (RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., САД)* и у *Excel*-у. За приказ дела резултата је коришћен софтвер *GraphPad Prism 7.0d (GraphPad Software Inc., САД)* док су графикони у појединим студијама направљени у *Excel* документу. Статистичка значајност је рачуната за *p*-вредност која је мања од 0,05 ($p < 0,05$).

A decorative banner with a floral pattern and a central text box. The banner has a light gray background with a subtle, repeating pattern of flowers and leaves. The text is centered within the banner.

4. РЕЗУЛТАТИ

3. РЕЗУЛТАТИ

4.1. СТУДИЈА 1: Компарација одговора ткива на различито припремљене колагенске биоматеријале различитог порекла у ортотопичном моделу имплантације пацову

4.1.1. Хистолошка анализа дефеката калварије и имплантата

Компаративни приказ хистолошких слика имплантационог места на калваријама пацова са колагенским биоматеријалом имплантираног са и без додатка разблажене крви дат је на Сликама 4.1-4.3 на терминима од десет и шездесет дана након имплантације.

Након десет дана од имплантације имплантати су видљиви у калваријама пацова свих експерименталних група, са јасно овиченим границама везивног ткива.

У калваријама пацова из групе КскМ+Ф (*Jellagen®-3D* колагенски скафолд пореклом из медузе+ физиолошки раствор) на имплантационом месту се запажа растресит материјал са пуно пора неправилних величина и облика, које су у међусобној комуникацији, прожете ћелијама различите морфологије. Запажа се присуство моноједарних ћелија имунског система са спорадично расутим еритроцитима (Слике 4.1а, 4.2а и 4.3а). Границе дефекта су јасно дефинисане, уочава се почетак стварања нове кости, као и депозиција колагена уз ивице старих костију, али у дефектима доминира биоматеријал који не показује знаке ресорпције (Слика 12а и 13а).

У калваријама пацова из групе КскМ+Кр (*Jellagen®-3D* колагенски скафолд пореклом из медузе + разблажена крв) на имплантационом месту се уочава колагенски биоматеријал који је јасно овичен дебљим слојем фиброзног ткива и који је у одређеној мери ресорбован и не покрива цео дефект (Слике 4.1б и 4.2б). У околном везивном ткиву око биоматеријала се уочава присуство макрофага, фибробласта и вишеједарних циновских ћелија. Упоредо са приметном ресорпцијом биоматеријала присутна је и већа депозиција новосинтетисаног колагена праћена регенерацијом коштаног ткива која је веома интензивна (Слике 4.1б, 4.2б и 4.3б).

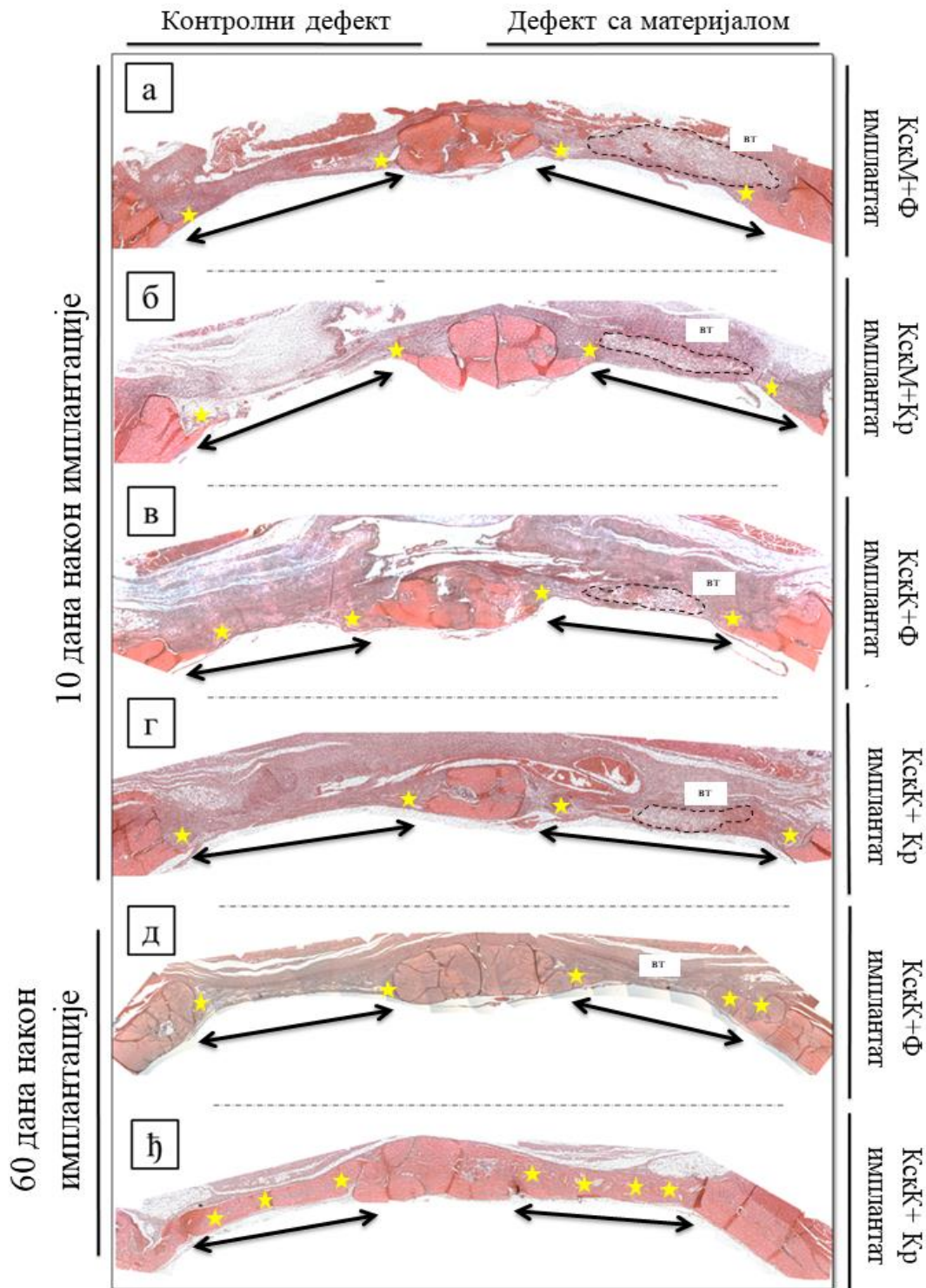
Колагенски биоматеријал имплантиран у дефекте у калваријама пацова из групе КскК+Ф (*PARASORB Sombrero®* колагенски скафолд коњског порекла + физиолошки раствор) јасно се види десет дана након имплантације, али се уз његове ивице наставља густо везивно ткиво које испуњава дефект до ивица кости (Слика 4.1в). Имплантати ове групе су богати крвним судовима, при чему је богата васкуларизованост присутна у ткиву око биоматеријала које испуњава дефект, али и на ивицама самог биоматеријала, као и у

прелазном региону регенерације кости, где се запажају центри настанка нове кости (Слике 4.1в, 4.2в и 4.3в).

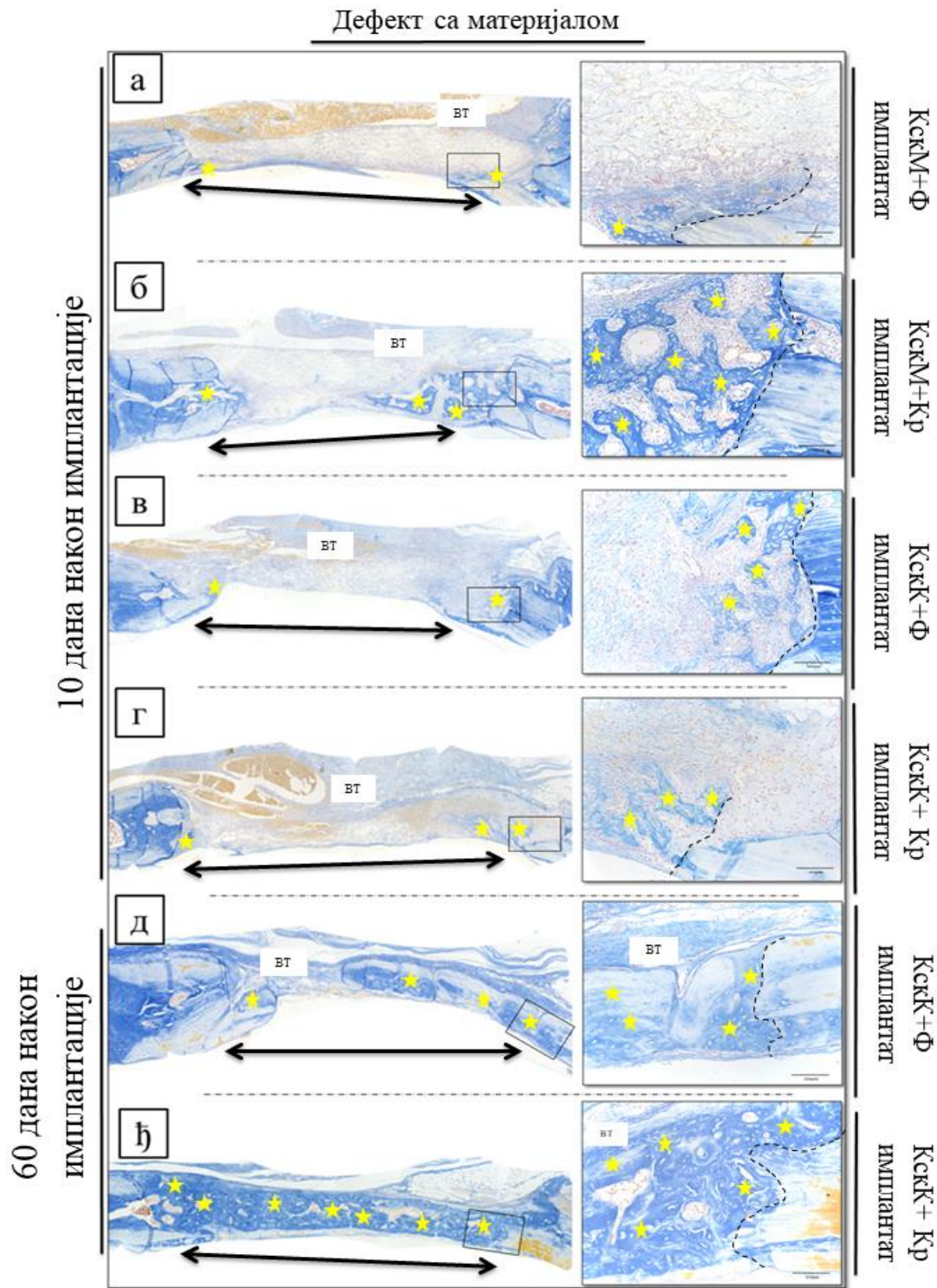
Имплантати у дефектима калварија пацова из групе КскК+Кр (*PARASORB Sombrero*® колагенски скафолд коњског порекла + разблажена крв) су јасно видљиви, порозни и прожети различитим једноједарним ћелијама, али и еритроцитима који представљају остатак нанешене крви приликом додавања у имплантат (Слике 4.1г, 4.2г и 4.3г). Запажа се присуство више расутих крвних судова мање површине на граници околног ткива са биоматеријалом. У околном ткиву одакле једноједарне ћелије инфилтрирају биоматеријал у великом броју се запажају и вишеједарне циновске ћелије (Слике 4.1г, 4.2г и 4.3г).

Након шездесет дана од имплантације је у великој мери дошло до регенерације кости у калваријалним дефектима пацова КскК+Ф групе. Део дефекта који није покривен новонасталом кости је испуњен бројним крвним судовима велике површине, а само везивно ткиво је богато колагеном (Слике 4.1д, 4.2д и 4.3д).

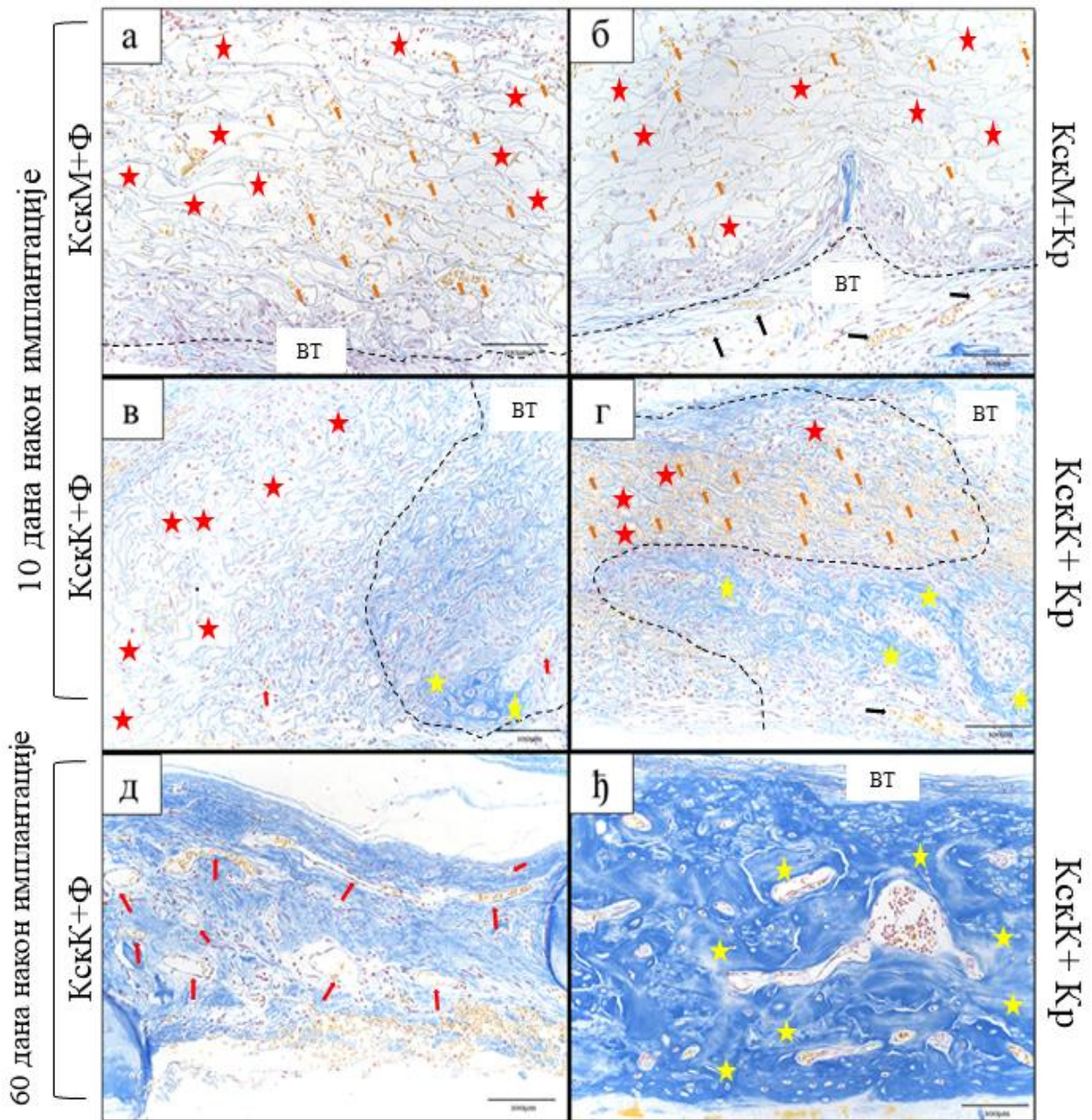
После шездесет дана од имплантације у калваријалним дефектима пацова КскК+Кр групе дошло је до формирања нове кости богате васкуларном мрежом, која покрива готово цео дефект (Слике 4.1ђ, 4.2ђ и 4.3ђ).



Слика 4.1. Хистолошка слика репрезентативних дефеката калварија. Са леве стране калварија су контролни дефекти, а са десне су имплантати различитих група десет дана након имплантације - КскМ+Ф (а), КскМ+Кр (б), КскК+Ф (в), КскК+ Кр (г) и шездесет дана након имплантације - КскК+Ф (д), КскК+ Кр (ђ). ВТ - везивно ткиво. Црне стрелице показују место дефекта, жуте звездице показују новоформирану кост. Испрекидана елипса неправилног облика показује нересорбован имплантат. Бојено *H&E* методом, *total scan*, увећање објектива 10х.

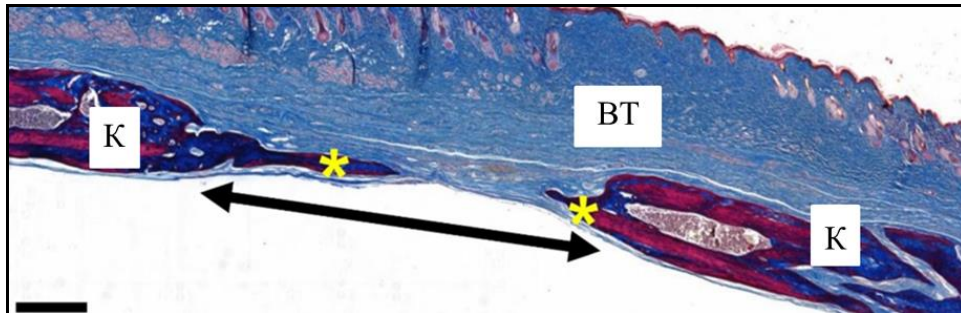


Слика 4.2. Хистолошка слика репрезентативних дефеката калварија у које је имплантиран колагенски биоматеријал са и без додатка разблажене крви десет дана након имплантације - КскМ+Φ (а), КскМ+Кр (б), КскК+Φ (в), КскК+ Кр (г) и шездест дана након имплантације - КскК+Φ (д), КскК+ Кр (ђ). ВТ - везивно ткиво. Црне стрелице показују место дефекта, жуте звездице показују новоформирану кост, Испрекидана линија прати границу између старе и новоформиране кости. Бојено *Azan* методом, *total scan*, увећање објектива 10x и увећани детаљи под увећањем објектива 20x. Скала показује 100 μ m.

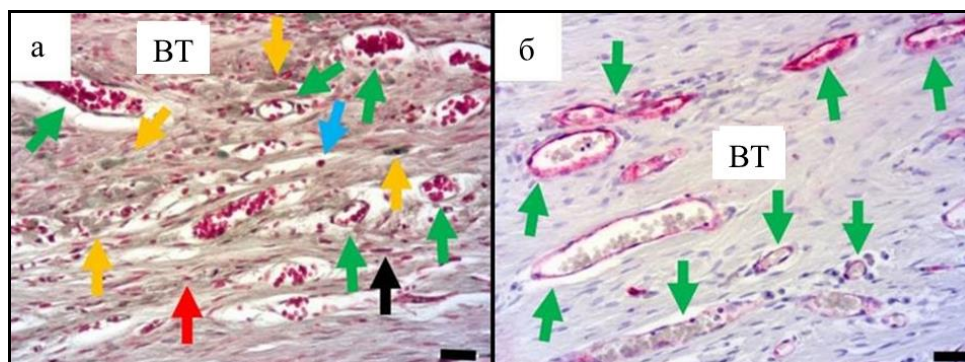


Слика 4.3. Хистолошка слика дефекта калварије са имплантираним колагенским биоматеријалом без и са додатком разблажене крви десет дана након имплантације - КсКМ+Ф (а), КсКМ+Кр (б), КсКК+Ф (в), КсКК+ Кр (г) и шездесет дана након имплантације - КсКК+Ф (д) и КсКК+ Кр (ђ). ВТ - везивно ткиво, црне стрелице показују крвне судове у везивном ткиву, црвене стрелице показују крвне судове у оквиру имплантационог региона а наранцасте стрелице еритроците. Жуте звездице показују новоформирану кост, а црвене звездице поре нересорбованог имплантата. Испрекидана линија показује границу између нересорбованог имплантата и околног везивног или костног ткива. Бојено *Azan* методом, *total scan*, увећање објектива 20x. Скала показује 100 μ m.

Хистолошка анализа имплантата КскМ+Ф групе на дефектима калварије је показала да је дошло до ресорпције биоматеријала у великом степену на термину од шездесет дана (Слика 4.4). На овом термину запажени су остаци колагенског имплантата, као и новоформирана кост. Колагенски имплантат КскМ+Ф је у великој мери замењен везивним ткивом. Запажа се присуство макрофага са повећаним цитоплазматским волуменом, лимфоцита и фибробласта (Слика 4.5а). Имунохистохемијским бојењем детектовано је и присуство крвних судова позитивних на маркер *CD31* (Слика 4.5б).



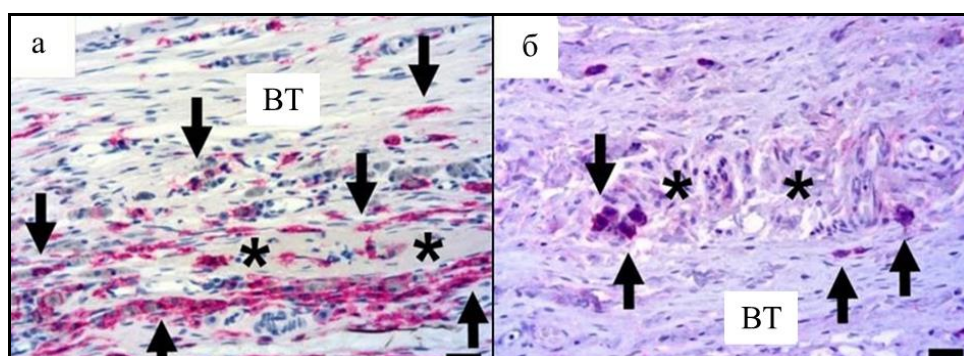
Слика 4.4. Хистолошка слика дефекта калварије у КскМ+Ф групи шездесет дана након имплантације. Црна стрелица показује место дефекта, жуте звездице показују новоформирану кост. К - локална кост, ВТ - везивно ткиво. Бојено трихромном методом по *Azan-y, total scan*, увећање објектива 10х. Скала показује 1 мм.



Слика 4.5. Хистолошка слика ткива имплантационе области калварије у КскМ+Ф групи након шездесет дана. Пентахромно бојење по *Movat-y* (а) и имуноекспресија *CD31* (б). ВТ - везивно ткиво. Наранџасте стрелице показују макрофаге са повећаним волуменом цитоплазме. Црне стрелице показују макрофаге, црвене стрелице фибробласте, плаве лимфоците, а зелене стрелице показују крвне судове. Увећање објектива 20х. Скала показује 20 μm .

4.1.2. Имунохистохемијска анализа инфламаторног одговора ткива на имплантацију КскМ+Ф типа имплантата

Хистолошка анализа имунохистохемијских препарата показала је да у ткиву имплантационе области КскМ+Ф имплантата шездесет дана након имплантације преовладава присуство *CD163* позитивних ћелија, са највећом густином на месту ресорбованог колагенског имплантата (Слика 4.6а). Мањи број *CD11c* позитивних ћелија детектован је у оквиру колагенских остатака имплантата КскМ+Ф групе (Слика 4.6б).



Слика 4.6. Имуноекспресија *CD11c* (а) и *CD163* (б) у ткиву имплантационе области имплантата КскМ+Ф шездесет дана након имплантације. ВТ - везивно ткиво. Звездице показују остатке КскМ+Ф имплантата, Црне стрелице показују проинфламаторне макрофаге. Увећање објектива 20х. Скала показује 20 μ м.

4.1.3. Хистоморфометријска анализа имплантата

4.1.3.1. Регенерација коштаног ткива

Статистички значајна разлика у одређивању вредности површине новоформиране кости уочена је компарацијом дефеката са материјалом и контролних дефеката експерименталних група КскК+Ф ($\#p \leq 0,05$) и КскМ+Ф ($\#p \leq 0,001$) шездесет дана након имплантације. У осталим експерименталним групама није нађена статистичка значајност компарирањем вредности параметара за површину новоформиране кости на оба термина, иако је просечна вредност површине новоформиране кости била виша у дефектима са имплантираним биоматеријалом у односу на контролне дефекте, посебно шездесет дана након имплантације. Супротна ситуација је запажена само у дефектима група КскМ+Ф и КскМ+Кр на периоду десет дана након имплантације, где је проценат површине новоформиране кости просечно био виши у контролним дефектима у односу на дефекте са имплантираним биоматеријалом (График 4.1).

Хистоморфометријском анализом вредности површине новоформиране кости у дефектима са имплантатима десет дана након имплантације, утврђена је статистички значајна разлика између група КскМ+Ф и КскК+Ф ($*p \leq 0,05$). Након шездесет дана од имплантације, новоформирана кост је била у статистички значајно већој мери формирана у калваријалним дефектима пацова из група КскМ+Ф, КскК+Ф и КскК+Кр у поређењу са вредностима површине новоформиране кости истих експерименталних група на термину од десет дана након имплантације. У значајно већој мери дошло је до регенерације коштаног ткива шездесет дана након имплантације у калваријалним дефектима групе КскМ+Ф у односу на групе КскМ+Ф ($**p \leq 0,01$) и КскМ+Кр ($**p \leq 0,01$) десет дана након имплантације. Такође, степен регенерације коштаног ткива групе КскМ+Ф шездесет дана након имплантације је значајно виши у компарацији са групама КскК+Ф ($*p \leq 0,05$) и КскК+Кр ($*p \leq 0,05$) десет дана након имплантације. Хистоморфометријском анализом добијене су највише вредности за регенерацију коштаног ткива у групи КскК+Кр шездесет дана након имплантације, са статистичком значајношћу у односу на КскК+Ф, КскМ+Кр и КскМ+Ф групе десет дана након имплантације. Међутим, иако је степен регенерације коштаног ткива виши у групи КскК+Кр у односу на групе КскМ+Ф и КскК+Ф шездесет дана након имплантације, та разлика ипак није статистички значајна (График 4.1).

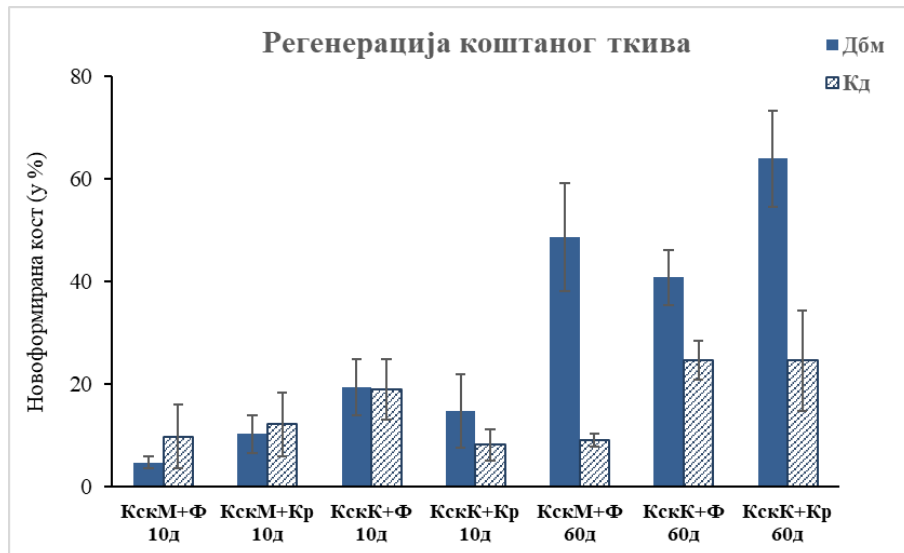


График 4.1. Хистоморфометријска анализа регенерације коштаног ткива у дефектима на калварији пацова на терминима од десет и шездесет дана након имплантације. Резултати су представљени као аритметичка средина \pm СГ. Дбм - дефект са биоматеријалом, Кд - контролни дефект.

4.1.3.2. Ресорпција биоматеријала

Колагенски биоматеријал је јасно видљив у дефектима калварија десет дана након имплантације у свим експерименталним групама, док га шездесет дана након имплантације није било могуће јасно детектовати у дефектима калварија ни у једној експерименталној групи. Само су расути фрагменти биоматеријала били видљиви у оквиру КскМ+Ф групе на шездесет дана након имплантације, међутим због нејасних граница, није их било могуће измерити. Након десет дана од имплантације, највећа површина биоматеријала је измерена у дефектима калварија КскМ+Ф групе, а најмања површина у дефектима калварија КскК+Ф групе, иако ова разлика није статистички значајна. У периоду од десет дана након имплантације није нађено да је додатак крви колагенским биоматеријалима приликом формирања имплантата направио статистички значајну разлику у ресорпцији биоматеријала (График 4.2).

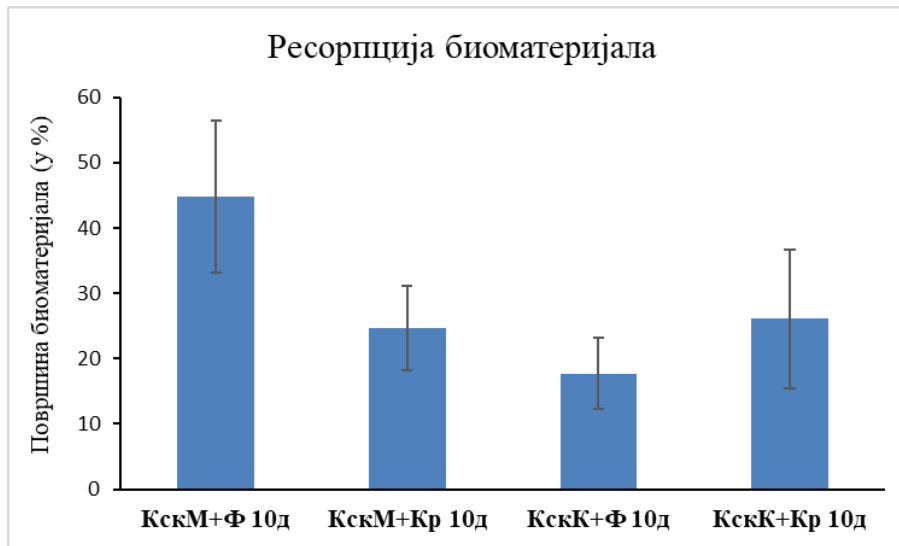


График 4.2. Хистоморфометријска анализа ресорпције биоматеријала у дефектима на калварији пацова на терминима од десет и шездесет дана након имплантације. Резултати су представљени као аритметичка средина \pm СГ. Дбм - дефект са биоматеријалом, Кд - контролни дефект.

4.1.3.3. Васкуларизованост имплантата

Статистички значајна разлика у васкуларизованости имплантата је детектована само компаративном анализом васкуларизованости дефеката са колагенским биоматеријалом и контролних дефеката експерименталне групе КскК+Φ ($\#p \leq 0,05$) на термину од шездесет дана након имплантације. Осим тога, запажен је пораст васкуларизације у калваријама контролних дефеката на термину од шездесет дана у односу на десет дана након имплантације. Васкуларизованост калваријалних дефеката са спонтаном регенерацијом је већа у односу на дефекте са имплантатима, што је мање изражено десет дана након имплантације, а више на термину од шездесет дана након имплантације. Изузетак представља група имплантата КскК+Φ на десет дана након имплантације, где је у већој мери изражена васкуларизованост дефеката са биоматеријалом у односу на дефекте са спонтаном регенерацијом, али не статистички значајно (График 4.3).

Хистоморфометријска компаративна анализа васкуларизованости дефеката са биоматеријалом различитих експерименталних група је показала да је статистички значајно већа васкуларизованост детектована у имплантатима из групе КскК+Φ у односу на КскМ+Φ ($**p \leq 0,01$), али и КскК+Φ у односу на КскМ+Кр групу ($*p \leq 0,05$) на термину имплантације од десет дана. Васкуларизованост имплантата групе КскМ+Φ на шездесет дана је значајно већа од група КскМ+Φ ($**p \leq 0,01$), КскМ+Кр ($*p \leq 0,05$) и КскК+Кр ($*p \leq 0,05$) на десет

дана након имплантације, као и од групе КскК+Кр шездесет дана након имплантације ($*p \leq 0,05$) (График 4.3).

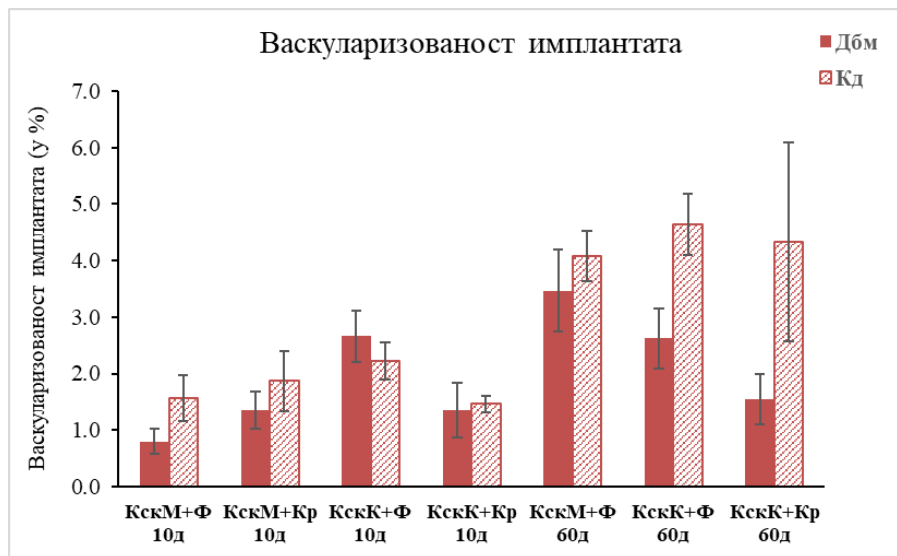


График 4.3. Хистоморфометријска анализа васкуларизованости имплантата у дефектима на калварији пацова на терминима од десет и шездесет дана након имплантације. Резултати су представљени као аритметичка средина \pm СГ. Дбм - дефект са биоматеријалом, Кд - контролни дефект

4.1.3.4. Густина крвних судова

Компарацијом густине крвних судова у дефектима са биоматеријалом и контролних дефеката истих експерименталних група, није нађена статистичка значајност, иако је просечна вредност густине крвних судова већа у контролним дефектима у односу на дефекте са биоматеријалом, при чему је та разлика најмање изражена у експерименталној групи КскМ+Кр, а највише у групи КскК+Кр (График 4.4).

У дефектима са колагенским биоматеријалом, просечна вредност густине крвних судова групе КскМ+Кр је већа у односу на КскМ+Ф, иако та разлика није статистички значајна. Такође, густина крвних судова у групи КскК+Ф је већа у односу на групу КскК+Кр на периоду од десет дана након имплантације. На термину од шездесет дана запажа се пораст густине крвних судова у групи КскК+Ф у односу на термин од десет дана. У групи КскК+Кр је дошло до смањења густине крвних судова шездесет дана након имплантације насупрот вредностима на десет дана након имплантације, иако то није статистички значајно. Статистички значајно већа вредност густине крвних судова је одређена у групи КскК+Ф у односу на КскК+Кр на периоду од шездесет дана ($*p \leq 0,05$) (График 4.4).

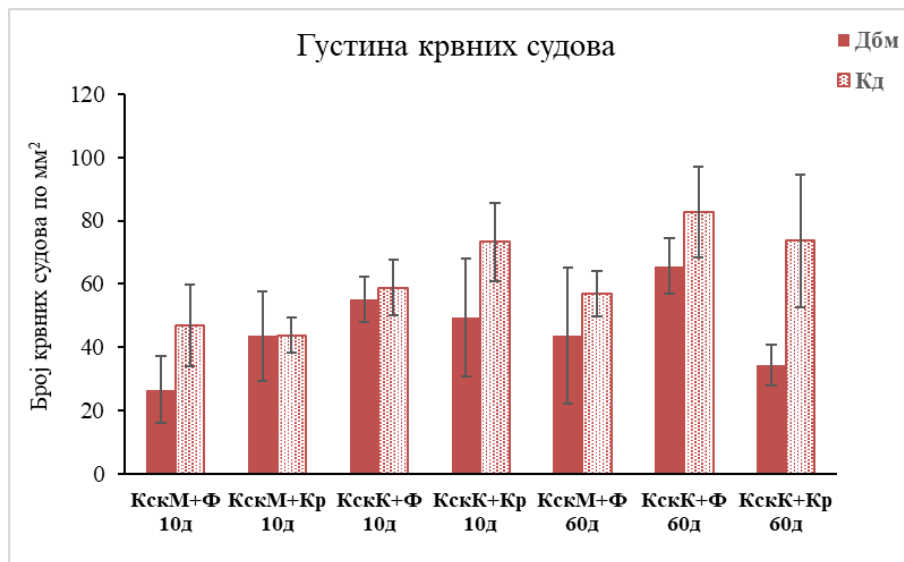


График 4.4. Хистоморфометријска анализа густине крвних судова у дефектима на калварији пацова на терминима од десет и шездесет дана након имплантације. Резултати су представљени као аритметичка средина \pm СГ. Дбм - дефект са биоматеријалом, Кд - контролни дефект.

4.1.3.5. Хистоморфометријска анализа инфламаторног одговора на КскМ+Ф тип имплантата

Хистоморфометријска анализа проинфламаторних и антиинфламаторних макрофага у оквиру имплантационе области дефекта калварије у КскМ+Ф групи имплантата је показала значајно виши број ћелија позитивних на *CD163* него ћелија позитивних на маркер *CD11c* (### $p < 0,01$), што указује на доминацију антиинфламаторних макрофага у КскМ+Ф групи, шездесет дана након имплантације (График 4.5). Присуство антиинфламаторних макрофага у КскМ+Ф групи је детектовано у већој мери у односу на исти тип макрофага присутних у контролним калваријама без материјала, с обзиром на значајно виши број *CD163* позитивних ћелија КскМ+Ф групе са материјалом у односу на дефекте без материјала (*** $p < 0,001$). У броју *CD11c*-позитивних ћелија није детектована значајна разлика између КскМ+Ф и контролне групе дефеката без материјала, што указује на компарабилан број проинфламаторних макрофага (График 4.5).

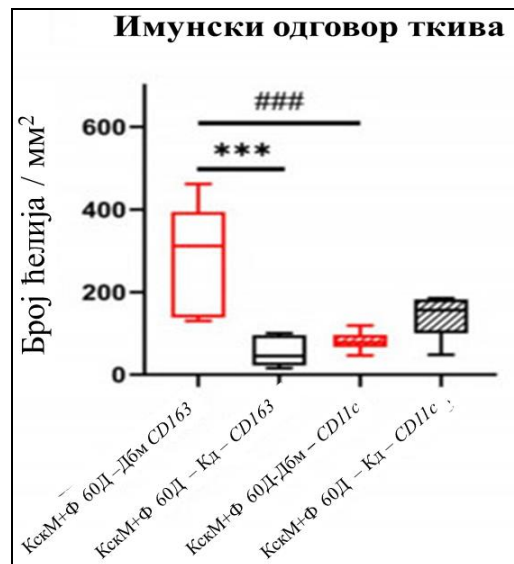


График 4.5. Хистоморфометријска анализа *CD163* и *CD11c* позитивних макрофага у имплантационој области у дефектима калварија. Дбм - дефект са биоматеријалом, Кд - контролни дефект (*интериндивидуалне разлике, # интраиндивидуалне разлике).

4.2. СТУДИЈА 2: Компарација одговора ткива на колагенске биоматеријала различитог порекла на ектопичном моделу имплантације пацову

4.2.1. Анализа макроскопског изгледа супкутанних имплантата и околног поткожног ткива пацова

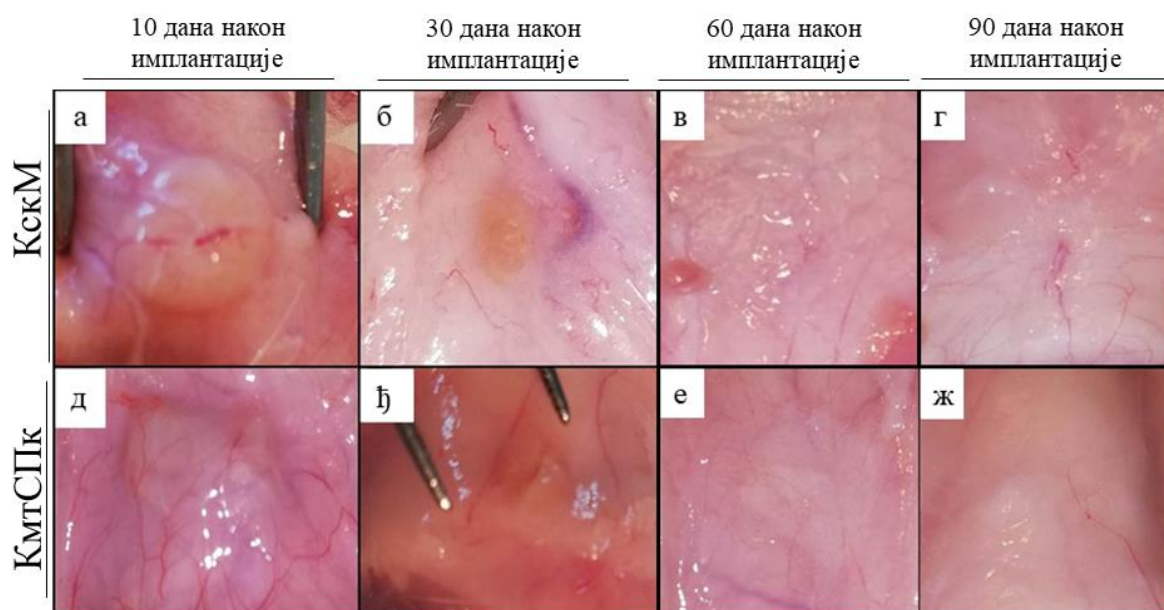
Експлантација колагенских имплантата са околним ткивом је извршена након десет, тридесет, шездесет и деведесет дана након супкутане имплантације пацову.

Током целог експерименталног периода животиње су биле у генерално добром здравственом стању, а ране без знакова инфламације. Компарацијом макроскопског изгледа имплантата на различитим терминима, није било видљивих разлика међу имплантатима различитих животиња исте експерименталне групе у моменту експлантације биоматеријала са околним ткивом, на истом термину.

Након десет дана од имплантације, имплантати групе КсцМ (*Jellagen®-3D* колагенски скафолд пореклом из медузе) су били приметно мањи у односу на величину пред имплантацију, непотпуно интегрисани у околно ткиво, компактни, са јасно видљивим границама и слабо развијеном неоваскуларном мрежом на граници са околним везивним ткивом (Слика 4.7а). Након тридесет дана од имплантације, примећена је знатна редукација величине имплантата који је био тешко уочљив, без јасних граница, са мрежом лепо

развијених крвних судова у околном везивном ткиву (Слика 4.7б). На шездесет и деведесет дана од имплантације, имплантирани биоматеријал није био макроскопски уочљив што указује на његову потпуну интеграцију са околним ткивом и биоресорпцију (Слика 4.7в, г).

Имплантати групе КмтСПк (колагенска матрица пореклом из свињског перикарда) су десет дана након имплантације макроскопски изгледали приметно мањи у односу на величину материјала пред имплантацију, компактни, са дефинисаним границама у односу на околно ткиво и богато развијеном мрежом крвних судова која прекрива имплантат према околном везивном ткиву (Слика 4.7д). На термину од тридесет дана након имплантације уочен је мањи број крвних судова у односу на претходни период, као и мања величина имплантата. Величина имплантата се смањује и на наредним терминима, све до деведесет дана након имплантације, али биоматеријал остаје макроскопски уочљив при експлантацији и на последњем посматраном термину, без јасних граница, што указује на потпуну интеграцију са околним ткивом (Слика 4.7ж, љ).

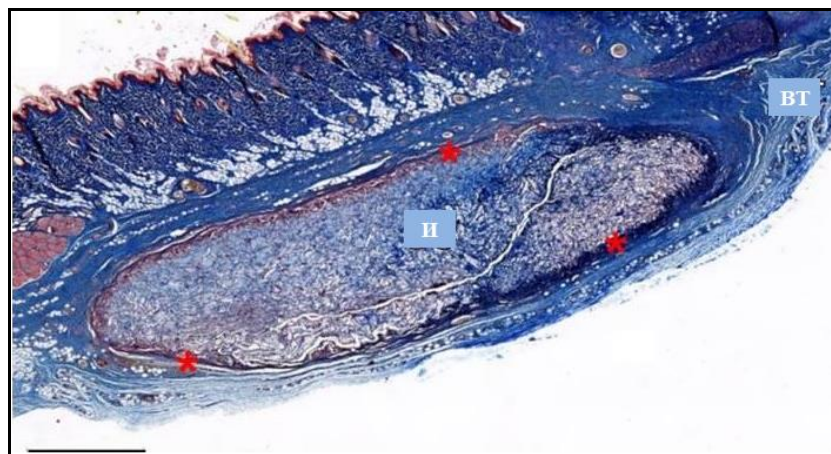


Слика 4.7. Пример макроскопског изгледа имплантата група КскМ (а, б, в, г) и КмтСПк (д, љ, е, ж) са околним ткивом, десет (а, д), тридесет (б, љ), шездесет (в, е) и деведесет дана (г, ж) након супкутане имплантације пацову.

4.2.2. Хистолошка анализа супкутаног имплантата и околног поткожног ткива пацова

4.2.2.1. Хистолошка анализа имплантата и околног поткожног ткива десет дана након имплантације

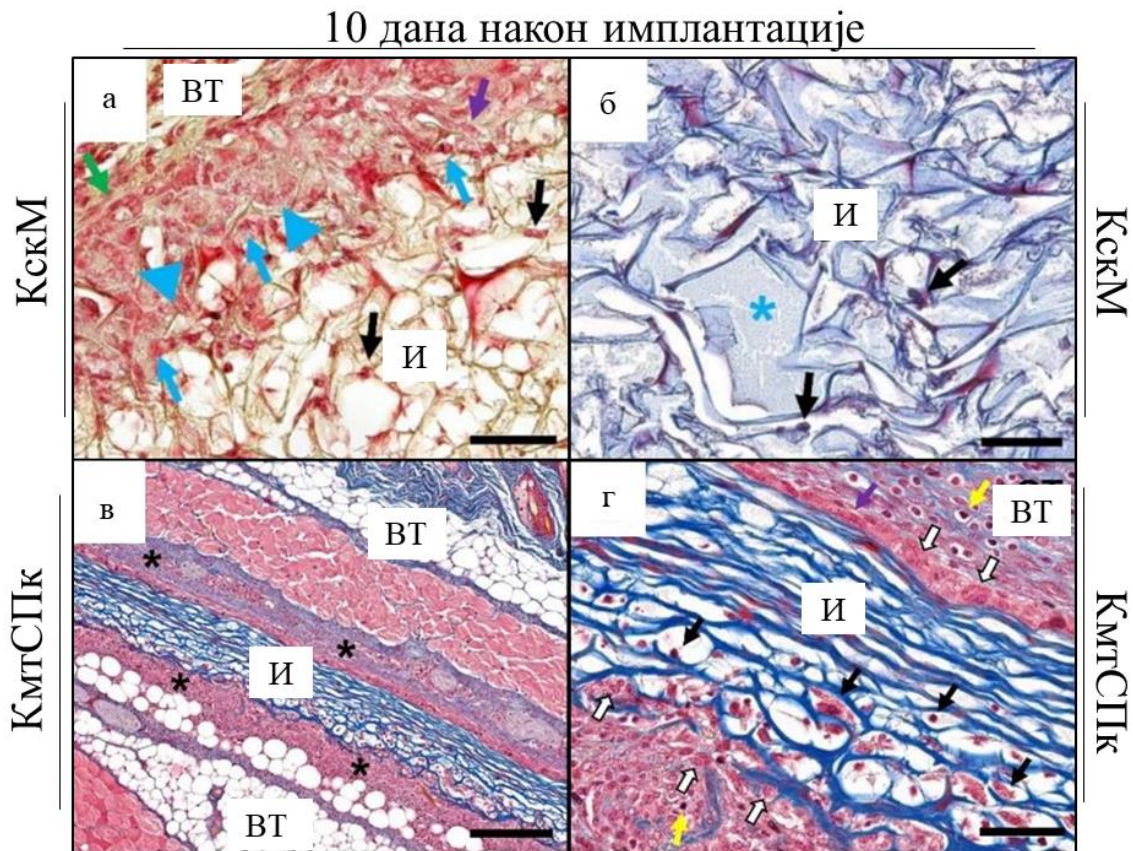
Након десет дана од имплантације имплантати групе КскМ су били јасно видљиви са танким слојем ћелија око њих (Слика 4.8). У овом термину након имплантације је запажен само мали број ћелија које су инфилтрирале унутар скафолда (Слика 4.9а, б). Иако је унутрашњост имплантата групе КскМ била углавном без ћелија, мањи број једноједарних ћелија моцонитно-макрофагног система, фибробласта, али и вишеједарних циновских ћелија, као и крвних судова је запажен у унутрашњим слојевима имплантата (Слика 4.9а, б). На овом термину, крвни судови нису детектовани унутар имплантата групе КскМ, али су видљиви у околном везивном ткиву (Слика 4.9а).



Слика 4.8. Хистолошка слика имплантата КскМ десет дана након супкутане имплантације пацову. Црвене звезде показују границе имплантационе области. И – имплантат, ВТ – везивно ткиво. Бојено *Masson* методом, *total scan*, увећање објектива 10x. Скала показује 1 мм.

Имплантати групе КмтСПк су јасно приметни десет дана након имплантације, окружени густим слојем ћелија поткожног везивног ткива (Слика 4.9в, г). У слоју ћелија око биоматеријала су уочене ћелије моноцитно-макрофагног система, са спорадично присутним фибробластима и лимфоцитима (Слика 4.9г). На овом термину није запажена инфилтрација ћелија у средишњи слој имплантата. Вишеједарне циновске ћелије нису примећене у групи КмтСПк на овом термину, док је њихово присуство било детектовано у имплантатима групе

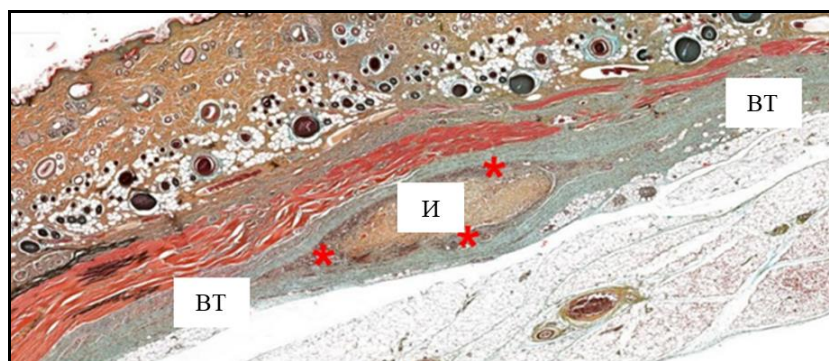
КскМ (Слика 4.9а, б). Није запажено ни присуство крвних судова у околном везивном ткиву уз биоматеријал.



Слика 4.9. Хистолошка слика имплантата група КскМ (а, б) и КмтСПк (в, г) десет дана након супкутане имплантације пацову. И – имплантат, ВТ – везивно ткиво. Плаве стрелице показују макрофаге, љубичасте стрелице фибробласте, а зелене стрелице показују мале крвне судове. Вишеједарне циновске ћелије су означене плавим троуглићима. Плаве звездице означавају остатке КскМ имплантата. Црне звездице показују слој ћелија око имплантата, а црне стрелице показују ћелије моноцитно-макрофагног система које су инфилтрирале у имплантат. Беле стрелице показују слој макрофага на површини биоматеријала, а жуте стрелице лимфоците. Бојено *Movat* методом (а), *Masson* методом (б) и *Azan* методом (в, г), увећање објектива 20 (а, б), 10x (в) и 40x (г). Скала показује 50 μm (а, б, г) и 200 μm (в).

4.2.2.2. Хистолошка анализа имплантата и околног поткожног ткива тридесет дана након имплантације

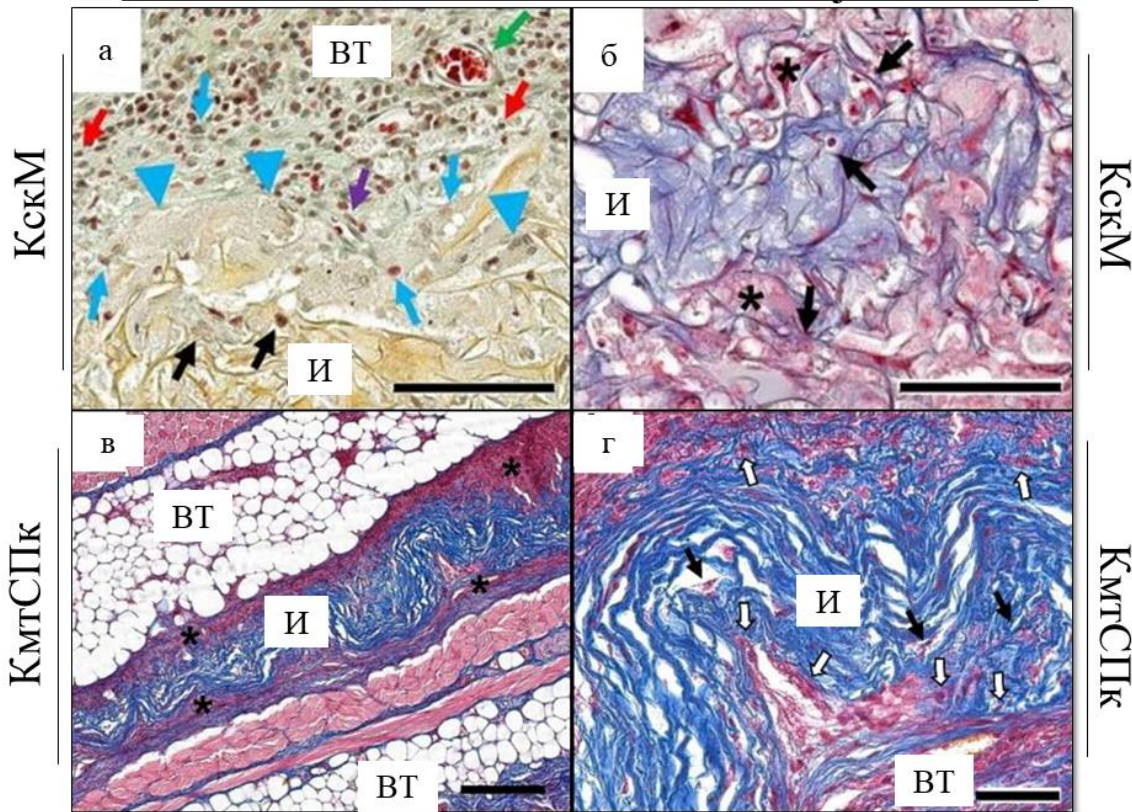
Након тридесет дана од имплантације, имплантати групе КскМ су и даље били јасно видљиви у поткожном ткиву пацова, са богатим слојем ћелија око њих (Слика 4.10). Уочено је смањење величине имплантата групе КскМ у односу на претходни период посматрања, што указује на ресорпцију биоматеријала. На површини имплантата групе КскМ је запажено присуство макрофага и вишеједарних циновских ћелија, окружених спорадично распоређеним лимфоцитима и фибробластима (Слика 4.11а, б). Ћелије нису инфилтрирале у великом броју у унутрашњост имплантата групе КскМ на овом термину, изузев ретких мононуклеарних ћелија и ћелија макрофагне ћелијске линије (Слика 4.11б).



Слика 4.10. Хистолошка слика имплантата групе КскМ тридесет дана након супкутане имплантације пацову. И – имплантат, ВТ – везивно ткиво. Црвене звездице показују ћелијски слој на површини биоматеријала. Бојење *Movat* методом, *total scan*, увећање објектива 10x. Скала показује 1 мм.

Имплантати групе КмтСПк су јасно уочени тридесет дана након супкутане имплантације пацову, окружени слојем везивног ткива који је богат ћелијама (Слика 4.11в). У овом ћелијском слоју око биоматеријала је доминирало присуство макрофага у комбинацији са фибробластима (Слика 4.11г). Макрофаги, као и фибробласти, такође су запажени у унутрашњости имплантата, при чему није запажена фрагментација биоматеријала или урастања комплекснијих ткивних компоненти (Слика 4.11г). У унутрашњости имплантата нису запажене вишеједарне циновске ћелије, као ни крвни судови.

30 дана након имплантације

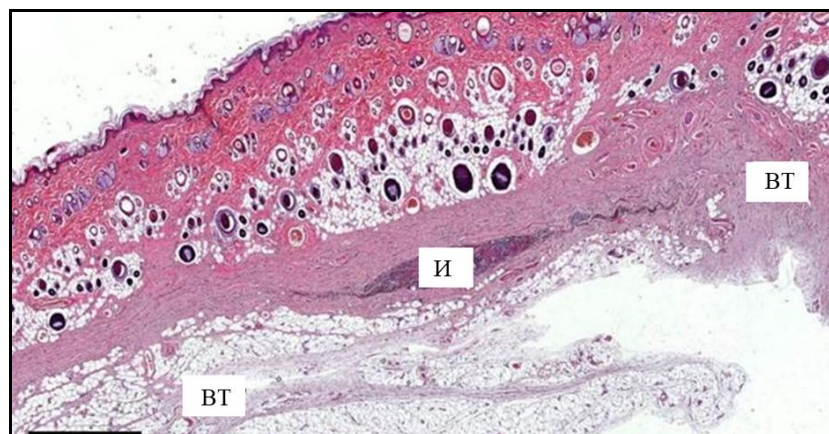


Слика 4.11. Хистолошка слика имплантата група КскМ (а, б) и КмтСПк (в, г) тридесет дана након супкутане имплантације пацову. И – имплантат, ВТ – везивно ткиво. Плаве стрелице показују макрофаге, љубичасте стрелице фибробласте, црвене стрелице показују лимфоците, а зелене стрелице показују мале крвне судове. Вишеједарне циновске ћелије су означене плавим троуглићима. Црне стрелице показују појединачне једноједарне ћелије детектоване унутар имплантационе области, а црне звездеце слој ћелија на граничним регионима имплантата. Беле стрелице показују слој макрофага на површини биоматеријала. Бојење *Movat* методом (а), *Masson* методом (б) и *Azan* методом (в, г), увећање објектива 20x (а, б), 10x (в) и 40x (г). Скала показује 100 μm (а, б), 200 μm (в) и 50 μm (г).

4.2.2.3. Хистолошка анализа имплантата и околног поткожног ткива шездесет дана након имплантације

Након шездесет дана од имплантације детектовани су само остаци имплантата групе КскМ, окружени гранулационим ткивом (Слика 4.12). Око остатака биоматеријала се могу уочити крвни судови (Слика 4.13а, б).

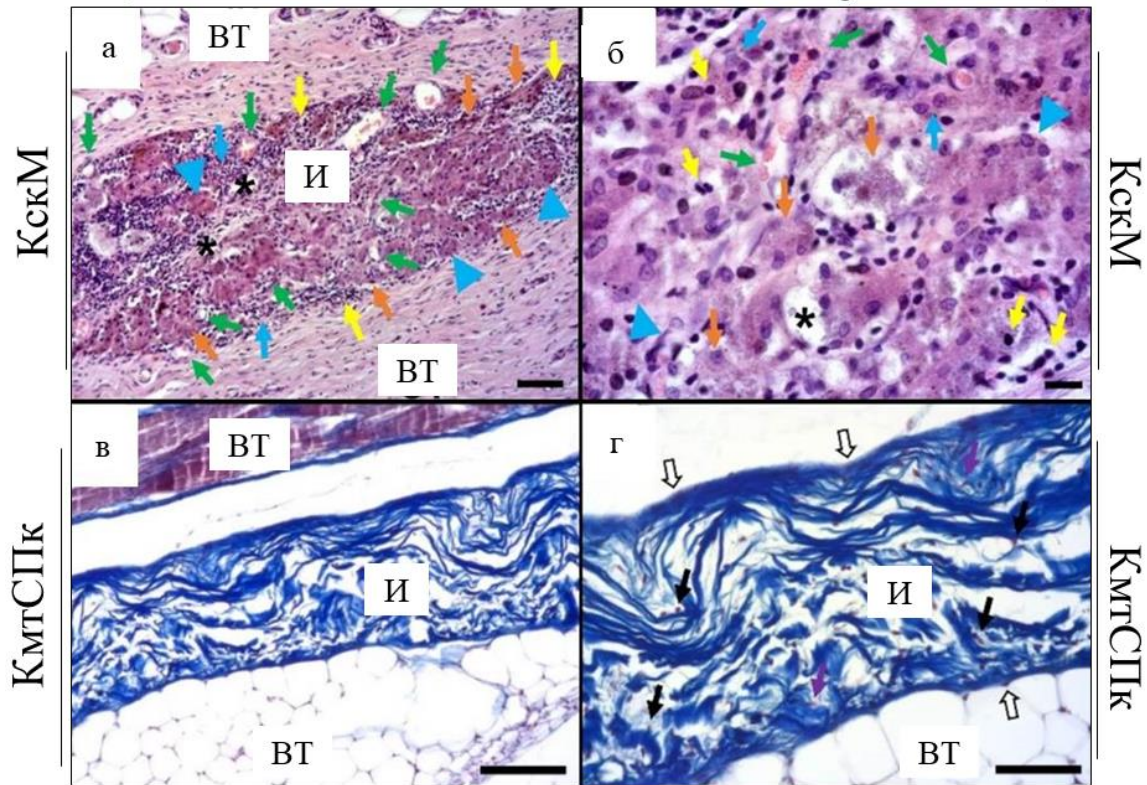
У оквиру имплантационе области се могу уочити макрофаги са повећаним цитоплазматским волуменом, што може указати на повећану фагоцитну активност, као и макрофаги уобичајне морфологије (Слика 4.13а, б). Лимфоцити и вишеједарне циновске ћелије, такође се могу уочити у оквиру имплантационе области групе КскМ.



Слика 4.12. Хистолошка слика имплантата групе КскМ шездесет дана након супкутане имплантације пацову. И – имплантат, ВТ – везивно ткиво. Бојено *H&E* методом, *total scan*, увећање објектива 10x (а). Скала показује 50 μ m (а).

Имплантати групе КмтСПк били су јасно видљиви, без знакова фрагментације и шездесет дана након супкутане имплантације пацову (Слика 4.13в, г). У околном везивном ткиву запажено је присуство макрофага и фибробласта. Мањи број фибробласта и макрофага инфилтрирао је унутар биоматеријала групе КмтСПк (Слика 4.13г).

60 дана након имплантације



Слика 4.13. Хистолошка слика имплантата група КскМ (а, б) и КмтСПк (в, г) шездесет дана након супкутане имплантације пацову. И – имплантат, ВТ – везивно ткиво. Црне звездице означавају остатке имплантата, зелене стрелице показују крвне судове. Плаве стрелице показују макрофаге са повећаним луменом цитоплазме, плави троуглићи вишеједарне циновске ћелије. Жуте стрелице показују лимфоците, а наранџасте стрелице показују макрофаге. Беле стрелице показују фибробласте на површини мембране, а љубичасте стрелице фибробласте унутар мембране. Бојено *H&E* методом (а, б) и *Azan*-у методом (в, г), увећање објектива 10x (а,в) и 40x (б,г). Скала показује 50 μ m (а,г), 10 μ m (б) и 200 μ m (в).

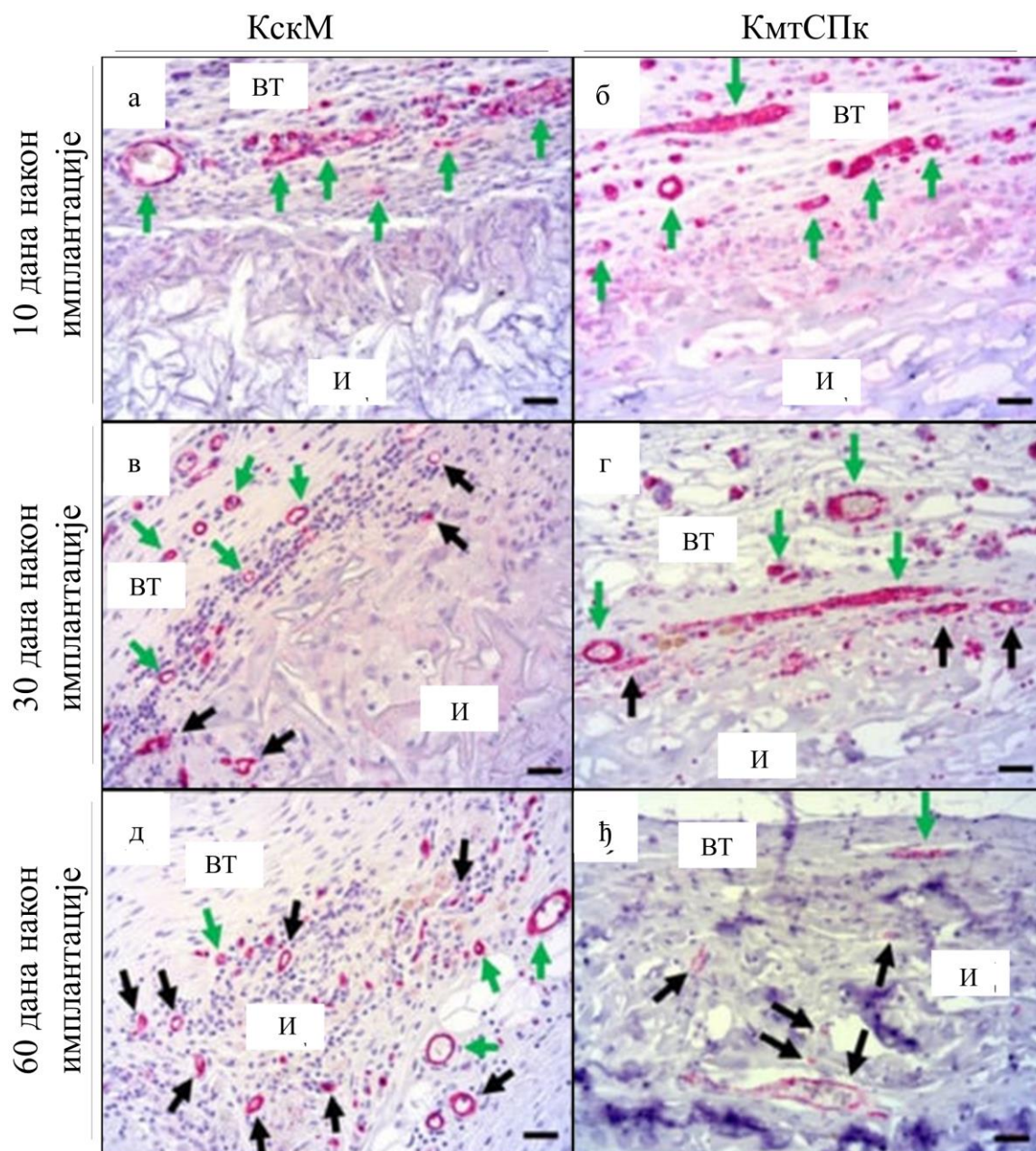
4.2.2.4. Васкуларизованост имплантата

Током експлантације имплантата групе КскМ макроскопски је примећена мрежа крвних судова око биоматеријала која није била богато развијена у терминима на десет и тридесет дана након имплантације (Слика 4.7а, б). Није примећена мрежа капилара око имплантата, као ни у околном везивном ткиву. На терминима од шездесет и деведесет дана након имплантације, било је могуће детектовати крвне судове у околном везивном ткиву, док биоматеријал није био видљив (Слика 4.7в, г).

Хистолошке анализе имплантационе области имплантата групе КскМ су показале велики број крвних судова мале и средње величине, локализованих уз везивно ткиво око имплантата, десет дана по имплантацији (Слика 4.14а). Након тридесет дана од

имплантације, већи број крвних судова је запажен на граници између биоматеријала и околног везивног ткива, са тенденцијом „урастања“ унутар биоматеријала како време протиче (Слика 4.14в). Мали крвни судови су уочени у гранулационом ткиву у великом броју шездесет дана након имплантације, док су већи крвни судови уочени у везивном ткиву око имплантата (Слика 24д). Васкуларизованост биоматеријала није анализирана на деведесет дана након имплантације због његове комплетне биоресорпције. Макроскопском анализом је уочено присуство богато развијене мреже крвних судова десет дана након имплантације у имплантатима групе КмтСПк (Слика 4.7д). На каснијим терминима се уочавало присуство мањег броја крвних судова у оквиру имплантационог региона групе КмтСПк (Слика 4.7ж, е, љ).

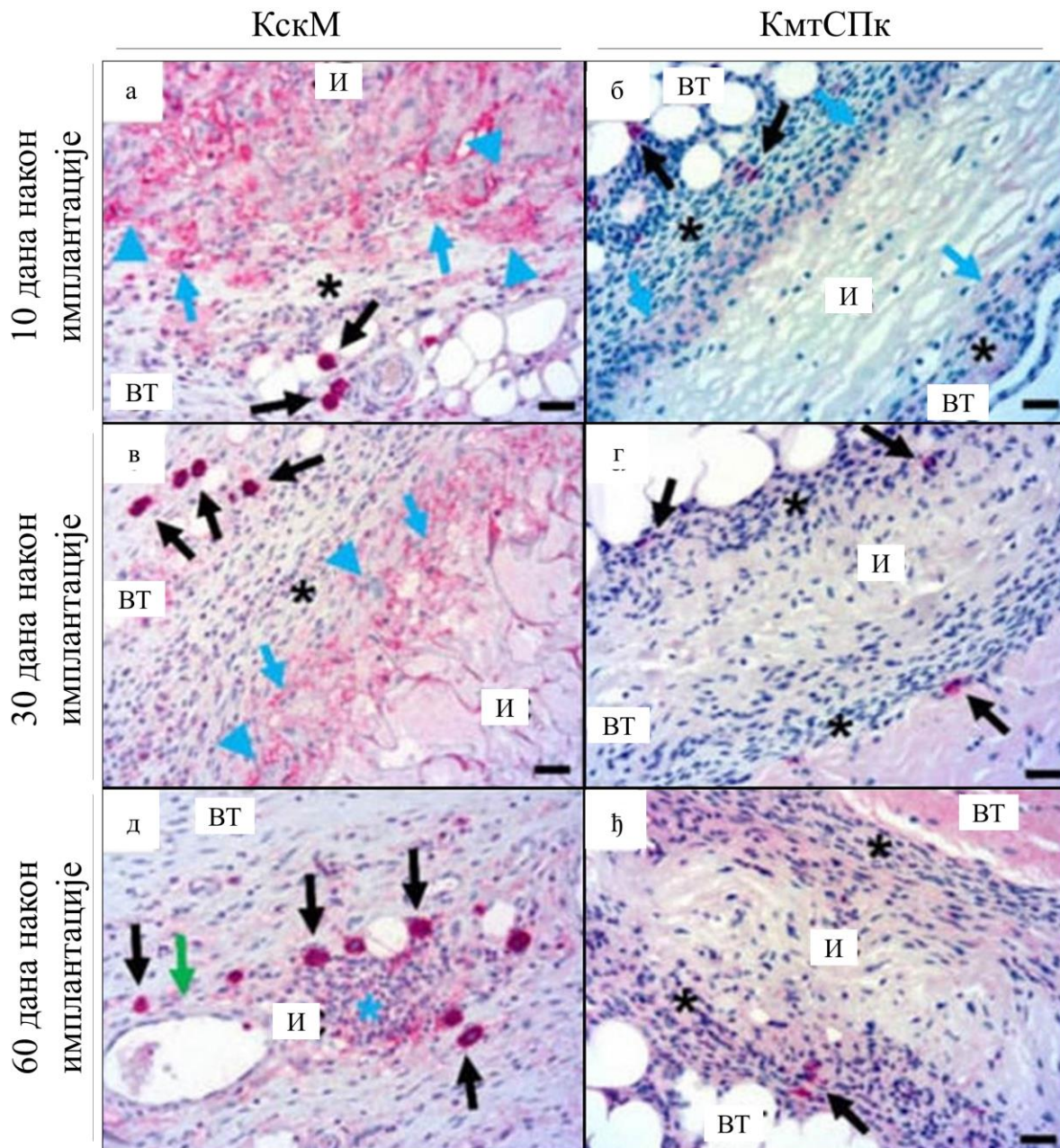
Хистолошком анализом имплантационе области групе КмтСПк, уочена је богата мрежа крвних судова сачињена од малих и крвних судова средње величине у везивном ткиву уз површину биоматеријала, десет дана након имплантације (Слика 4.14б). Након тридесет дана од имплантације, велики број крвних судова је, такође, примећен у везивном ткиву око биоматеријала, упоредо са појавом инфилтрације појединачних крвних судова унутар КмтСПк имплантата (Слика 4.14г). Након шездесет дана од имплантације, мањи број крвних судова је примећен у околном везивном ткиву у односу на десет и тридесет дана, а мањи крвни судови и крвни судови средње величине су, такође, детектовани унутар биоматеријала (Слика 4.14ђ). Није запажена корелација између пораста броја крвних судова унутар биоматеријала и повећане инфилтрације ћелија везивног ткива у имплантате групе КмтСПк током експеримента (Слика 4.14ђ).



Слика 4.14. Имуноекспресија *CD31* у ткиву имплантационе регије имплантата КскМ и КмтСПк десет (а, б), тридесет (в, г) и шездесет дана (д, ђ) након супкутане имплантације пацову. И – имплантат, ВТ – везивно ткиво. Зелене стрелице означавају крвне судове у околном везивном ткиву, а црне стрелице крвне судове унутар имплантата. Увећање објектива 20х. Скала показује 20 μ м.

4.2.3. Имунохистохемијска анализа одговора ткива на имплантацију биоматеријала типа КскМ и КмтСПк

Имунохистохемијска анализа је показала само појединачно присутно *CD11c* позитивних ћелија у околном везивном ткиву у имплантационим областима група КскМ и КмтСПк, након десет дана од супкутане имплантације пацову (Слика 4.15а, б). Након тридесет дана од имплантације, једноједарне ћелије које су инфилтрирале у периферним слојевима КскМ имплантата показале су веома слабу експресију *CD11c* (Слика 4.15в). Неколико ћелија у околном везивном ткиву КмтСПк имплантата је било *CD11c* позитивно на овом термину (Слика 4.15г). Након шездесет дана од имплантације, само мали број макрофага у КскМ групи је био *CD11c* позитиван у оквиру самог биоматеријала (Слика 4.15д). Мали број макрофага у околном везивном ткиву КмтСПк групе је приказао *CD11c* имуноекспресију (Слика 4.15ђ).

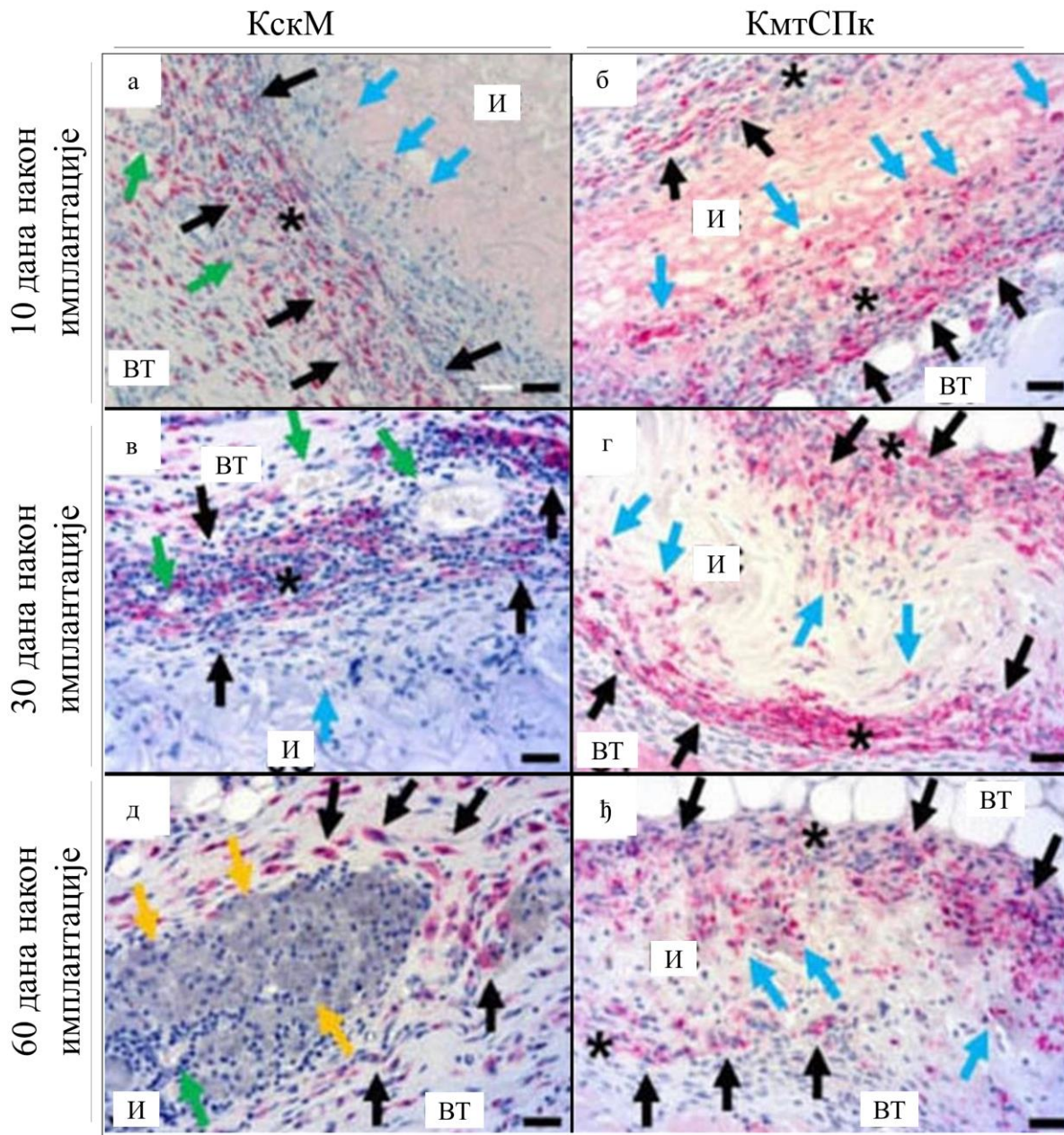


Слика 4.15. Имуноекспресија *CD11c* ткива у имплнтационој регији имплантата КскМ и КмтСПк десет (а, б), тридесет (в, г) и шездесет дана (д, ђ) након супкутане имплантације пацову. И – имплантат, ВТ - везивно ткиво. Црне звездице показују гранулационо ткиво, а црне стрелице *CD11c* позитивне макрофаге унутар везивног ткива. Плаве стрелице показују *CD11c* позитивне макрофаге унутар материјала, плави троуглићи *CD11c* позитивне ћелије, а зелене стрелице крвне судове. Увећање објектива 20х. Приказ скале 20 μ м.

Имунохистохемијском анализом детектован је висок број *CD163* позитивних антиинфламаторних макрофага у гранулационом околном ткиву КскМ имплантата, десет дана након имплантације (Слика 4.16а). На овом термину већина једноједарних и вишеједарних ћелија је била негативна на *CD163* маркер у имплантатима КскМ. У случају КмтСПк имплантата, детектован је већи број *CD163* позитивних ћелија, како унутар имплантата, тако и у околном везивном ткиву (Слика 4.16б).

Након тридесет дана од имплантације, већина ћелија у околном везивном ткиву је била *CD163* позитивна, док су инфилтриране једноједарне и вишеједарне ћелије унутар имплантата биле углавном *CD163* негативне (Слика 4.16в). Све ћелије детектоване као позитивне у имунохистохемијском бојењу у околном везивном ткиву, као и ћелије инфилтриране унутар биоматеријала КмтСПк групе, на овом термину, биле су углавном *CD163* позитивне (Слика 4.16г).

Након шездесет дана од имплантације, велики број макрофага у околном везивном ткиву КскМ имплантата је био позитиван на *CD163* антитела, док је већина ћелија унутар КскМ имплантата била *CD163* негативно (Слика 4.16д).



Слика 4.16. Имуноекспресија *CD163* ткива у имплантационој регији имплантата КскМ и КмтСПк десет (а, б), тридесет (в, г) и шездесет дана (д, њ) након супкутане имплантације пацову. И – имплантат, ВТ – везивно ткиво. Црне звездице показују гранулативно ткиво, а црне стрелице *CD163* позитивне макрофаге у оквиру везивног ткива. Плаве стрелице показују *CD163* позитивне макрофаге унутар материјала, а зелене стрелице крвне судове. Жуте стрелице показују *CD163* негативне макрофаге са повећаним волуменом цитоплазме. Увећање објектива 20х. Приказ скале 20 μm .

4.2.4. Хистоморфометријска анализа инфламаторног одговора ткива на КскМ и КмтСПк тип имплантата

Након десет дана од имплантације, хистоморфометријска анализа је показала значајно већи број макрофага оба типа ($***p < 0,001$) у имплантационом региону КмтСПк групе ($1918,0 \pm 415,8$ број ћелија/ mm^2) у односу на имплантациони регион КскМ групе ($564,8 \pm 64,01$ број ћелија/ mm^2) (График 4.6а, б).

На тридесет дана након имплантације, значајно већи број антиинфламаторних макрофага, дефинисаних као ћелије позитивне на *CD163* маркер, детектован је у оквиру имплантационог региона КмтСПк групе у односу на имплантациони регион имплантата КскМ групе ($***p < 0,001$). Није запажена значајна разлика у броју *CD11c* позитивних ћелија, односно проинфламаторних макрофага, између КмтСПк и КскМ група имплантата на овом термину. Међутим, запажено је значајно смањење броја ових ћелија у периоду од десет дана након имплантације до тридесет дана након имплантације ($##p < 0,01$), док такав тренд смањења броја ћелија током посматраног периода није уочен за *CD163* позитивне ћелије (График 2б). Ове анализе указују на сличан број оба типа макрофага у имплантационој области унутар групе имплантата КскМ и КмтСПк. Ипак, значајно већи број проинфламаторних и антиинфламаторних макрофага је запажен у имплантационој области КмтСПк групе у односу на имплантациону област КскМ групе (График 4.6б).

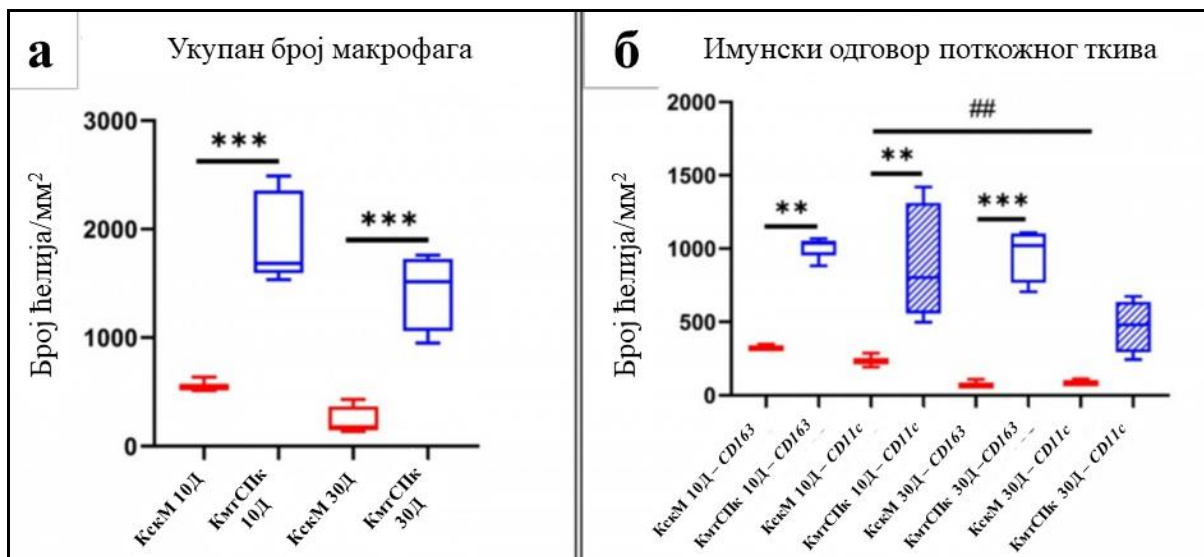


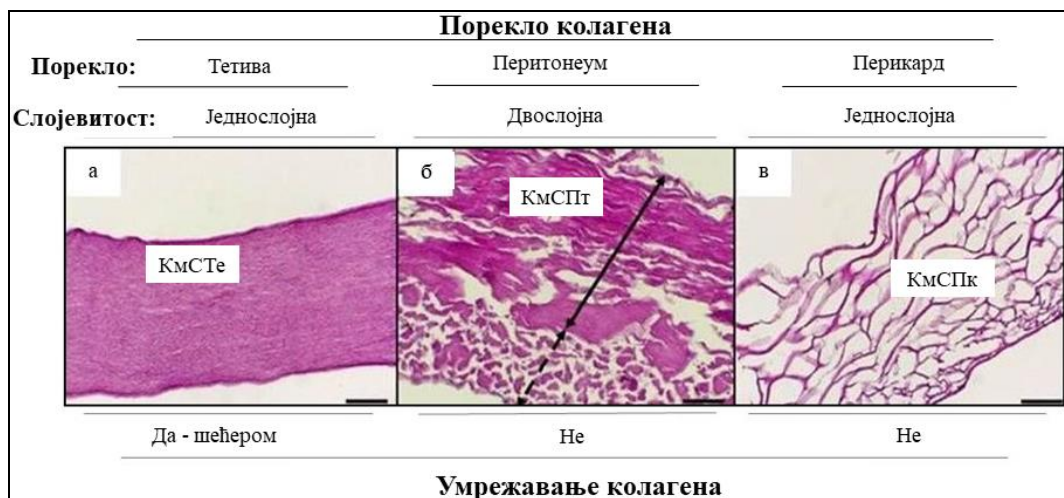
График 4.6. Хистоморфометријска анализа укупног броја макрофага (а), као и *CD163* и *CD11c* позитивних макрофага у ткиву имплантационе регије имплантата КскМ и КмтСПк (б) десет и тридесет дана након супкутане имплантације пацову (* интериндивидуалне разлике, # интраиндивидуалне разлике).

4.3. СТУДИЈА 3: Компарација одговора ткива на колагенске мембране добијене из различитих ткива на ектопичном моделу имплантације пацову

4.3.1. Хистолошка анализа имплантата, околног поткожног ткива и поткожног цепа без имплантата

4.3.1.1. Хистолошка анализа структуре колагенских мембрана пре имплантације

Хистолошком анализом колагенских мембрана *ex vivo* утврђена је основна структура колагенских мембрана. Непорозна структура је уочена анализом колагенских мембрана КмСТе групе (*Ossixplus*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из тетиве), док се код мембрана групе КмСПт (*Bio-gide*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из перитонеума) могу описати два различита слоја, један компактан, а други порозан. Колагенска мембрана групе КмСПк (*Jason*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из перикарда) има порозну структуру налик саћу.



Слика 4.17. Хистолошка слика колагенских мембрана имплантата КмСТе (а), КмСПт (б) и КмСПк (в) *ex vivo*. Црна компактна стрелица показује компактни слој колагенске мембране, док испрекидана црна стрелица показује порозни слој мембране. Бојено методом *H&E*, увећање објектива 20х. Скала показује 50 μm .

4.3.1.2. Хистолошка анализа имплантата, околног поткожног ткива и поткожног цепа без имплантата десет дана након имплантације

Након десет дана од имплантације, колагенске мембране у све три експерименталне групе имплантата биле су јасно видљиве, без знакова ресорпције. Ни у једној

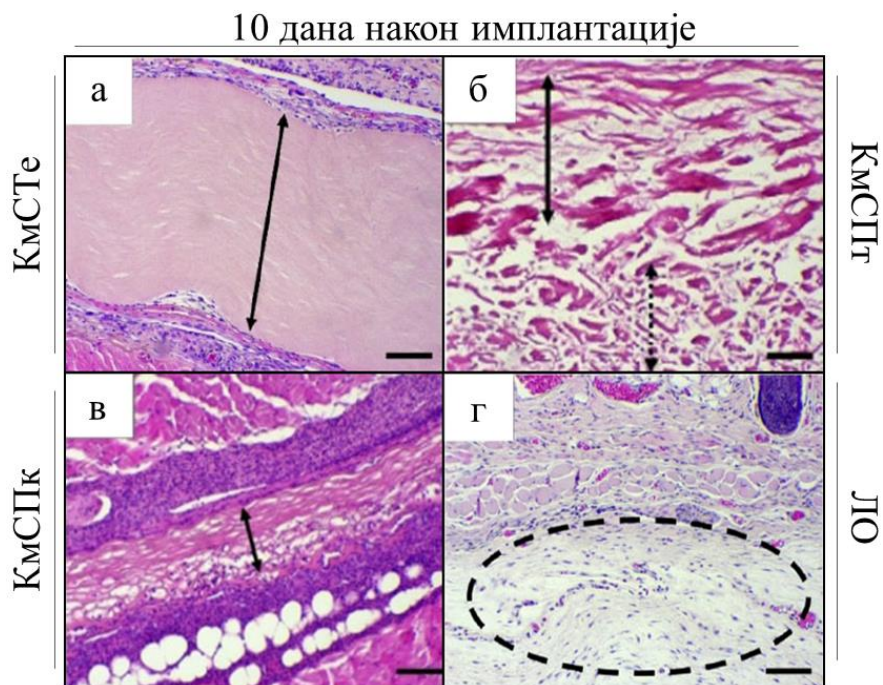
експерименталној групи нису детектовани знаци некрозе у имплантационој регији приликом екстракције имплантата.

Имплантати групе КмСТе имају компактну и непорозну структуру десет дана након супкутане имплантације пацову. Хистолошком анализом имплантационе регије уочена је блага инфламаторна реакција и минимална фиброза поткожног ткива око имплантата групе КмСТе на овом термину (Слика 4.18а).

Хистолошка анализа имплантата КмСПт групе показује да се он састоји из два различита слоја: компактног и порозног (растреситог), са израженом границом између њих, десет дана након имплантације поткожно пацову. Компактан слој имплантата групе КмСПт се састоји из густе колагенске мреже, док порозан слој имплантата групе КмСПт показује структуру сличну саћу (Слика 4.18б).

Имплантати групе КмСПк се јасно уочавају десет дана након поткожне имплантације пацову, без присутних знакова ресорпције. КмСПк имплантати су окружени слојем фибринозног ткива, а сама структура имплантата је порозна и подсећа на порозни слој у структури имплантата групе КмСПт (Слика 4.18в).

У ЛО контролној групи (лажно оперисане животиње) се запажа блага реакција поткожног ткива која се јавља као реакција на формирани поткожни џеп (Слика 4.18г).



Слика 4.18. Хистолошка слика имплантата КмСТе (а), КмСПт (б), КмСПк (в) и поткожног џепа групе ЛО (г) десет дана након супкутане имплантације пацову. Црна компактна стрелица показује компактни слој имплантата, а црна испрекидана стрелица показује порозан

слој мембране. Испрекидана елипса показује супкутани цеп. Бојено методом *H&E*, увећање објектива 10x. Скала показује 100 μm .

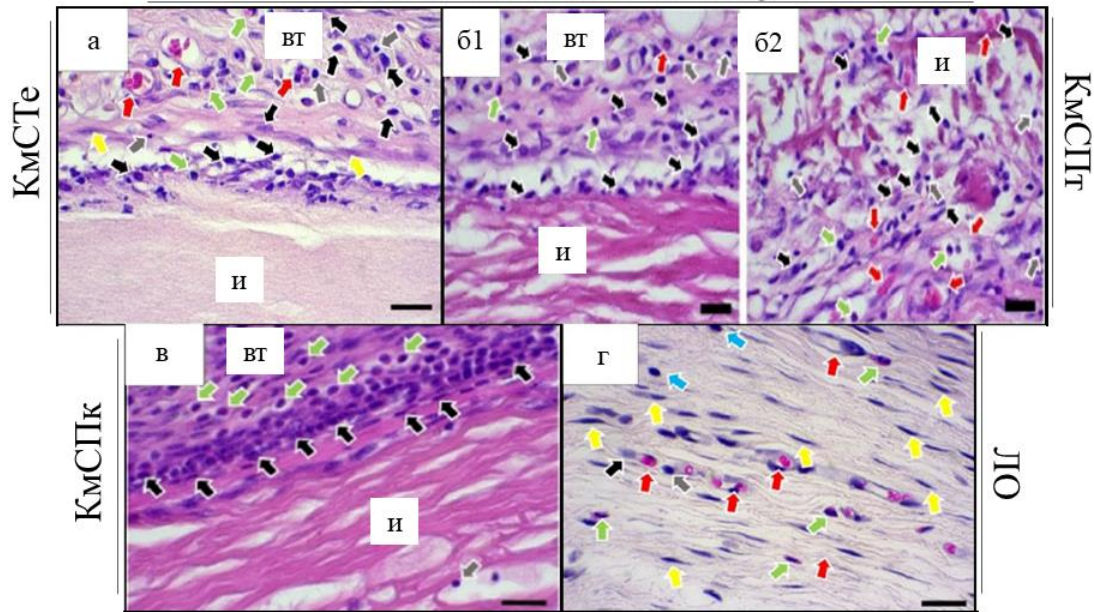
У КмСТе групи, десет дана након имплантације, запажа се реактивно околно ткиво око имплантата, богато крвним судовима и ћелијама имунског система попут макрофага, гранулоцита и лимфоцита. Запажено је и присуство фибробласта око имплантата (Слика 4.19а).

Другачији образац ћелијског одговора поткожног ткива је запажен око различитих слојева КмСПт имплантата. Блага инфламаторна реакција је запажена у ткиву које окружује компактни слој мембрана КмСПт. Ово околно реактивно ткиво је прожето крвним судовима и ћелијама имунског система: макрофагима, гранулоцитима и лимфоцитима (Слика 4.19 б1). Инфламаторна реакција са богатијом васкуларном мрежом у већој мери је развијена око порозног слоја мембрана КмСПт (Слика 4.19 б2).

Ткиво око имплантата групе КмСПк показује умерену инфламаторну реакцију која прати обод имплантата, са доминантним присуством гранулоцита, макрофага и лимфоцита (Слика 4.19в).

У имплантационој регији експерименталне групе ЛО је уочена блага инфламаторна реакција ткива у детектованом супкутаном цепу (Слика 4.19г). Примећено је присуство већег броја фибробласта, поред којих су спорадично присутни и макрофаги, лимфоцити и гранулоцити. Уочена је мрежа крвних судова, као и присуство плазмоцита.

10 дана након имплантације



Слика 4.19. Хистолошка слика имплантата КмСТе (а), КмСПт (б1, б2), КмСПк (в) и поткожног џепа групе ЛО (г) десет дана након супкутане имплантације пацову. И – имплантат, ВТ - везивно ткиво. Црне стрелице показују макрофаге, а зелене стрелице показују гранулоците. Црвене стрелице показују крвне судове, а сиве стрелице лимфоците. Жуте стрелице показују фибробласте, а плаве стрелице показују плазма ћелије. Бојено методом *H&E*, увећање објектива 40х. Скала показује 20 μ м.

4.3.1.3. Хистолошка анализа имплантата, околног поткожног ткива и поткожног џепа без имплантата тридесет дана након имплантације

Након тридесет дана по имплантацији, колагенске мембране су и даље присутне у имплантационим регијама све три експерименталне групе, без знакова ресорпције.

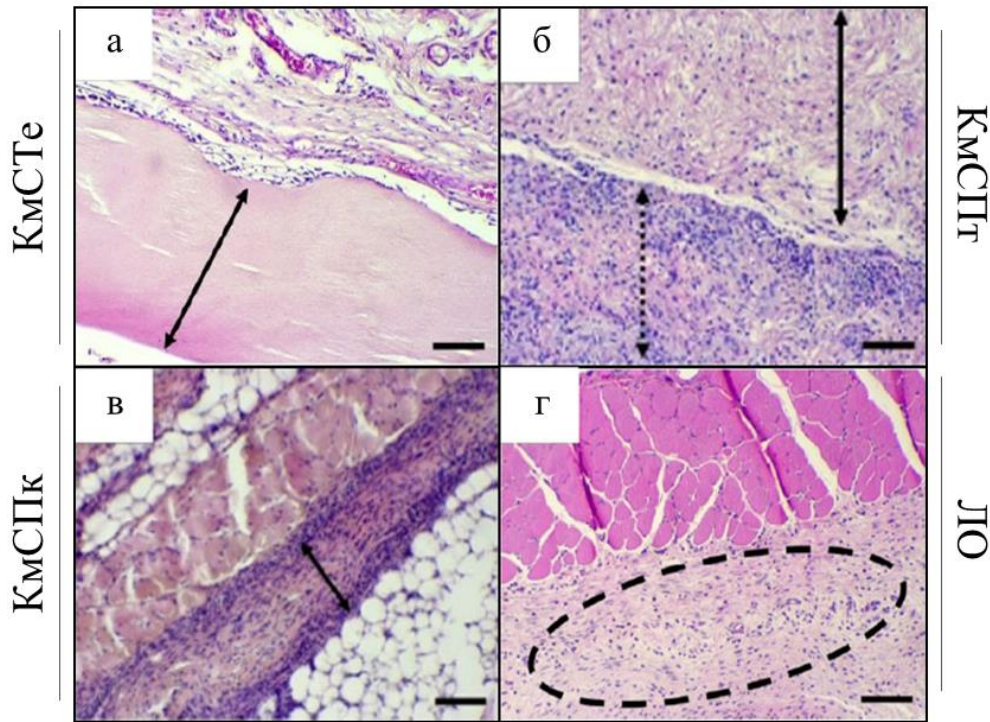
Мембране КмСТе групе делују као стабилне баријере, без знакова ресорпције, тридесет дана након имплантације (Слика 4.20а). Није запажена инфилтрација околног ткива унутар имплантата групе КмСТе.

Имплантати групе КмСПт се виде као компактне структуре, без знакова ресорпције, након тридесет дана од имплантације. У овој групи имплантата се и даље разликују два слоја различите архитектуре: компактан и порозан, чија је разлика наглашенија у односу на претходни термин и праћена другачијим обрасцем ћелијске инфилтрације (Слика 4.20б).

КмСПк имплантати су, такође, јасно видљиви тридесет дана након имплантације са присутним фиброзним ткивом око имплантата (Слика 4.20в).

На тридесет дана од имплантације се још увек запажа присуство поткожног џепа у ЛО експерименталној групи (Слика 4.20г).

30 дана након имплантације



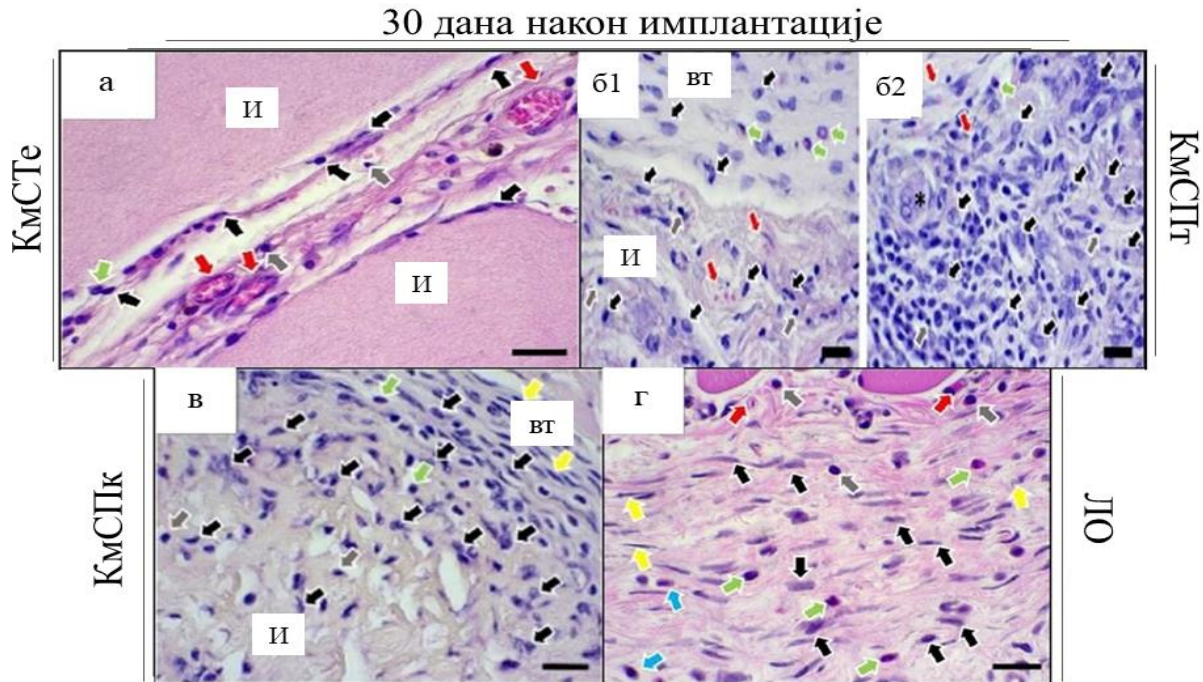
Слика 4.20. Хистолошка слика имплантата КмСТе (а), КмСПт (б), КмСПк (в) и поткожног цепа групе ЛО (г) тридесет дана након супкутане имплантације пацову. Црна компактна стрелица показује компактни слој мембране, а црна испрекидана стрелица показује порозан слој мембране. Испрекидана елипса показује поткожни цеп. Бојено методом *H&E*, увећање објектива 10x. Скала показује 100 μm .

Ткиво око КмСТе имплантата је богато крвним судовима и садржи исти тип имунских ћелија, као и на претходном термину: макрофаге, лимфоците и гранулоците. Ни на овом термину нема инфилтрације ћелија у дубље слојеве КмСТе мембрана (Слика 4.21а).

У оквиру компактног слоја имплантата КмСПт групе се уочава образац ћелијске инфилтрације који је сличан обрасцу инфилтрације ћелија из претходног термина, праћен спорадичном појавом крвних судова (Слика 4.21 б1). С друге стране, инфилтрација околног реактивног ткива у порозан слој имплантата групе КмСПт је израженија у односу на термин од десет дана. Инфилтрација моноједарних ћелија, у првом реду макрофага, гранулоцита и лимфоцита, праћена је присуством вишеједарних циновских ћелија (Слика 4.21 б2).

Везивно ткиво око КмСПк имплантата је богато макрофагима, лимфоцитима и гранулоцитима, при чему је исти ћелијски тип запажен и унутар дубљих слојева имплантата. У овој групи имплантата је запажен виши ниво инфилтрације ћелија у односу на групе КмСТе и КмСПт, при чему је околно ткиво инфилтрирало у око 2/3 површине мембране, а ћелије нису детектоване само у централним деловима имплантата (Слика 4.21ц).

У групи ЛО запажа се присуство крвних судова, макрофага, гранулоцита, лимфоцита, фибробласта и плазма ћелија (Слика 4.21д).



Слика 4.21. Хистолошка слика група имплантата КмСТе (а), КмСПт (б1, б2), КмСПк (в) и поткожног цепа групе ЛО (г) тридесет дана након супкутане имплантације пацову. И – имплантат, ВТ - околно ткиво. Црне стрелице показују макрофаге, а зелене стрелице гранулоците. Црвене стрелице показују крвне судове, а сиве стрелице лимфоците. Жуте стрелице показују фибробласте, а плаве стрелице показују плазма ћелије. Бојено методом *H&E*, увећање објектива 40x. Скала показује 20 μm.

4.3.1.4. Хистолошка анализа имплантата, околног поткожног ткива и поткожног цепа без имплантата шездесет дана након имплантације

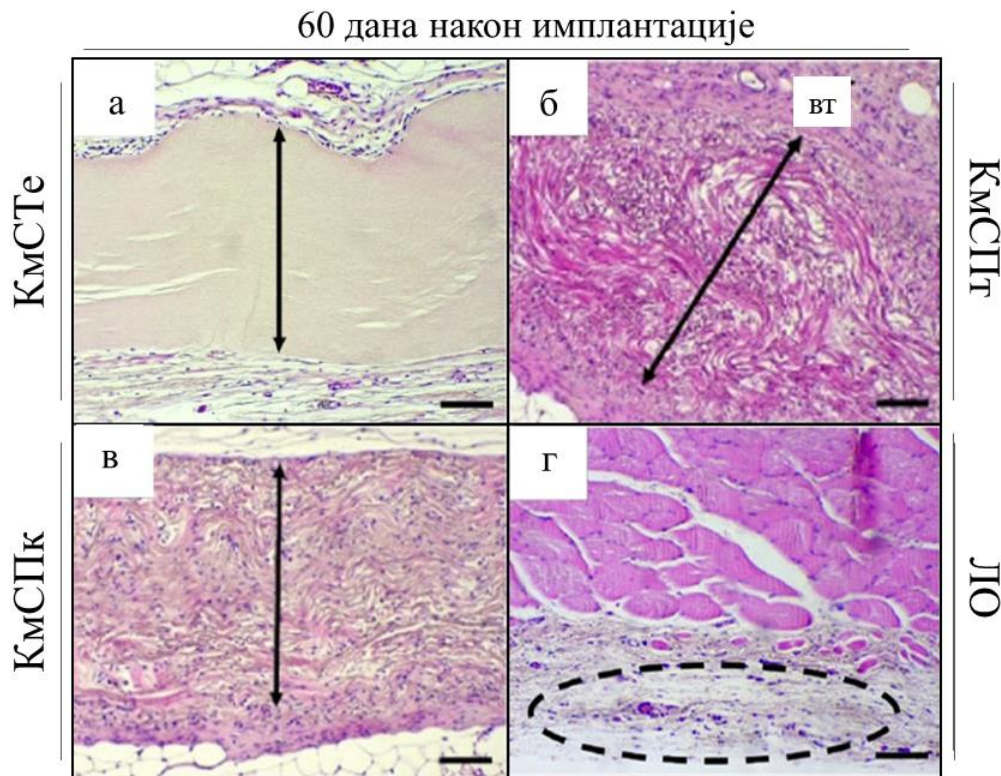
У имплантационим регијама су и даље присутне све три врсте колагенских мембрана на термину од шездесет дана након имплантације, без присутних параметара ресорпције мембрана.

КмСТе имплантати су присутни у виду стабилне структуре без знакова ресорпције, шездесет дана након супкутане имплантације пацову (Слика 4.22а).

У имплантатима групе КмСПт, ресорпција различитих слојева је одвијана различитом динамиком до термина од шездесет дана након имплантације. На овом термину је у имплантатима групе КмСПт детектовано присуство компактног слоја мембране, док порозни слој није било могуће уочити услед његове комплетне ресорпције (Слика 4.22б).

КмСПк имплантати су били јасно видљиви на овом термину уз комплетну инфилтрацију ћелија из околног ткива, које су уочљиве и у централним деловима имплантата (Слика 4.22ц).

На хистолошким препаратима ЈО експерименталне групе запажа се потпуна репарација региона у коме је прављен поткожни џеп, праћена благом инфламаторном реакцијом везивног ткива (Слика 4.22д).



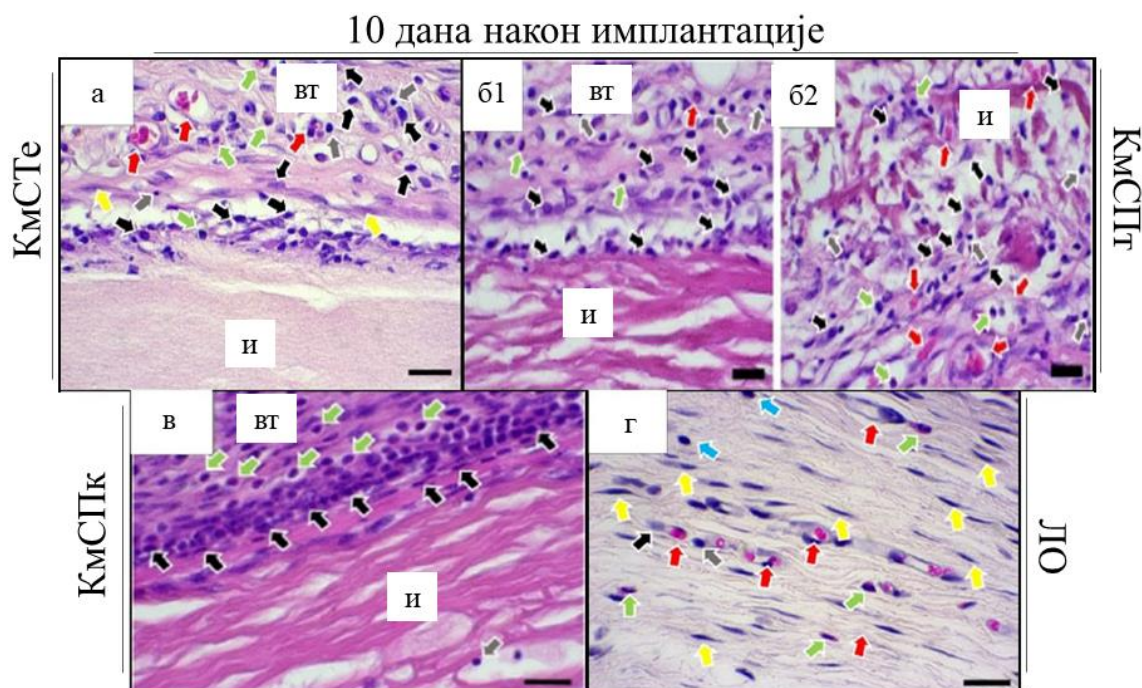
Слика 4.22. Хистолошка слика имплантата КмСТе (а), КмСПт (б), КмСПк (в) и поткожног џепа групе ЈО (г) шездесет дана након супкутане имплантације пацову. ВТ - околно ткиво. Црна компактна стрелица показује компактни слој мембране. Испрекидана елипса показује поткожни џеп. Бојено методом *H&E*, увећање објектива 40х. Скала показује 20 μ m.

Око имплантата из групе КмСТе се уочава присуство крвних судова и фиброзног ткива са инфламаторном реакцијом слабијег интензитета у односу на претходне термине. На овом термину од шездесет дана након имплантације се примећује и пораст у броју гранулоцита који окружују имплантат групе КмСТе (Слика 4.23а).

На шездесет дана по имплантацији, компактни слој имплантата групе КмСПт је био јасно видљив и окружен фиброзним ткивом, док порозни слој није било могуће детектовати. Крвни судови су уочени у компактном слоју мембране КмСПт групе и међу остацима растреситог слоја КмСПт имплантата, уз присуство фибробласта и макрофага (Слика 33 б1).

Запажено је присуство гранулоцита у везивном ткиву на месту ресорпције растреситог слоја имплантата КмСПт групе (Слика 4.23 б2), док њихово присуство није детектовано на месту компактног слоја имплантата групе КмСПт (Слика 4.23 б1).

На термину од шездесет дана након имплантације се види потпуна инфилтрација ћелија околног ткива унутар имплантата групе КмСПк. Од ћелија доминирају макрофаги и гранулоцити, а срећу се у великом броју и лимфоцити, као и фибробласти (Слика 4.23в).



Слика 4.23. Хистолошка слика имплантата КмСТе (а), КмСПт (б1, б2), КмСПк (в) и поткожног цепа групе ЛО (г) шездесет дана након супкутане имплантације пацову. И – имплантат, ВТ - околно ткиво. Црне стрелице показују макрофаге, а жуте стрелице показују фибробласте. Зелене стрелице показују гранулоците, а црвене стрелице крвне судове. Сиве стрелице показују лимфоците. Бојено методом *H&E*, увећање објектива 40x. Скала показује 20 μ m.

4.3.1.5. Имунохистохемијска анализа инфламаторног одговора ткива на имплантацију КмСТе, КмСПт, КмСПк имплантата и поткожног цепа без имплантата

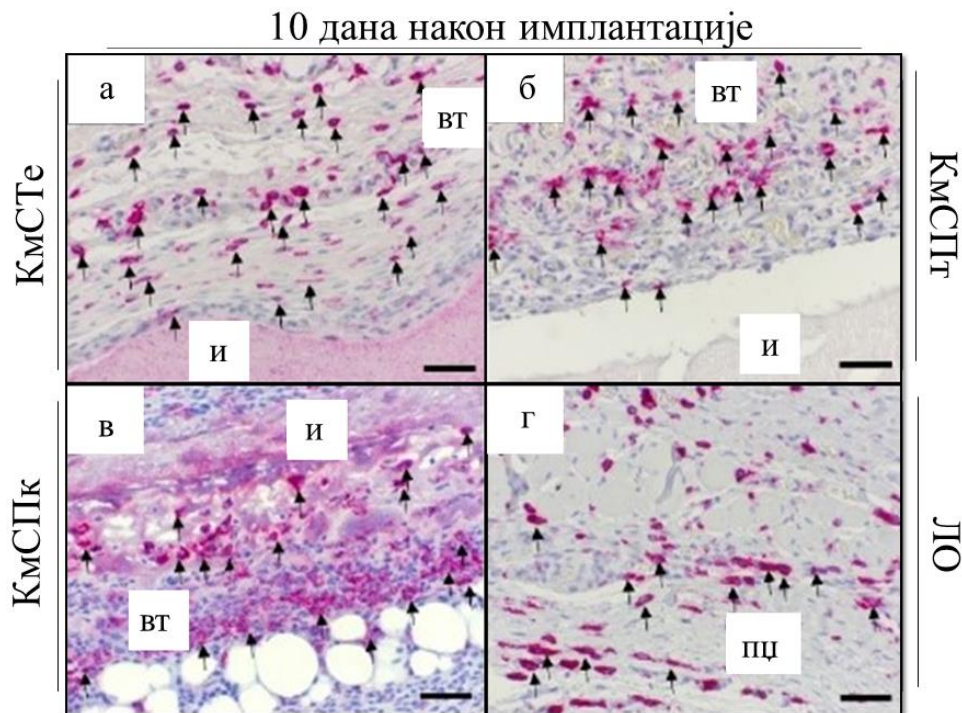
У ткиву имплантационе регије око имплантата групе КмСТе је имунохистохемијском анализом детектован висок број *CD163* позитивних ћелија, које су окарактерисане као антиинфламаторни макрофаги, десет дана након супкутане имплантације пацову. *CD163* позитивни макрофаги нису детектовани само на површини колагенских мембрана групе

КмСТе, већ и на одређеној удаљености од саме ивице мембране, што указује на шири дијапазон активације одговора околног ткива на имплантате групе КмСТе (Слика 4.24а).

CD163 позитивне ћелије су уочене и у околном ткиву групе имплантата КмСПт, дистрибуиране углавном уз саму ивицу колагенске мембране (Слика 4.24б). У удаљеним деловима имплантационе регије имплантата групе КмСПт није детектовано присуство макрофага позитивних на *CD163* маркер.

Имунохистохемијском анализом је откривен висок ниво имуноекспресије *CD163* у ткиву имплантационе регије мембрана група КмСПк. *CD163* позитивне ћелије су густо распоређене у фиброзном ткиву уз саму површину КмСПк имплантата (Слика 4.24в).

CD163 позитивне ћелије су детектоване и у поткожном џепу групе лажно оперисаних животиња ЛО (Слика 4.24г).



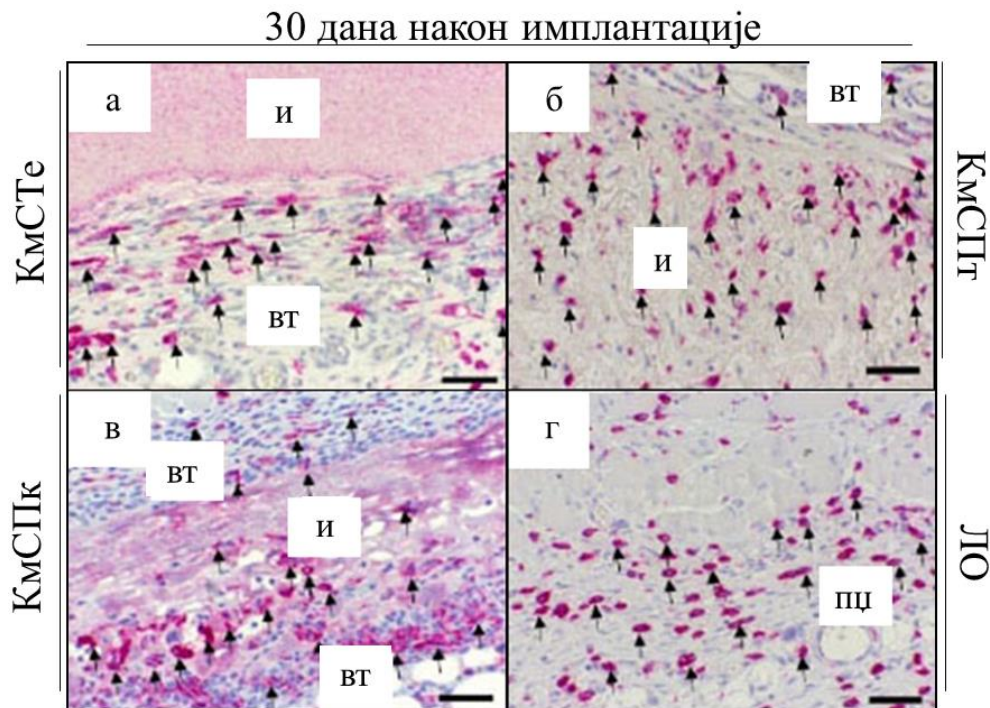
Слика 4.24. Имуноекспресија *CD163* у ткиву имплантационе регије имплантата КмСТе (а), КмСПт (б), КмСПк (в) и у поткожном џепу групе ЛО (г), десет дана након супкутане имплантације пацову. И - имплантат, ВТ - везивно ткиво, ПЦ - поткожни џеп. Црне стрелице показују *CD163* - позитивне ћелије. Увећање објектива 20х. Приказ скале 50 μ м.

На граници имплантата групе КмСТе и периимплантираног ткива детектован је јасан слој макрофага позитивних на маркер *CD163* тридесет дана након имплантације. Није запажена инфилтрација *CD163* позитивних макрофага у имплантате групе КмСТе (Слика 4.25а).

Након тридесет дана од имплантације у ткиву имплантационе регије имплантата КмСПт запажен је пораст броја *CD163* позитивних ћелија у односу на претходни термин, као и њихова инфилтрација ка унутрашњости имплантата групе КмСПт (Слика 4.25б).

CD163 позитивне ћелије су инфилтрирале у унутрашњост имплантата групе КмСПк тридесет дана након имплантације (Слика 4.25в), али у мањој мери у односу на имплантате групе КмСПт (Слика 4.25б).

На тридесет дана након имплантације, било је и даље могуће детектовати *CD163* позитивне ћелије у поткожном џепу контролне групе ЛО (Слика 4.25г).



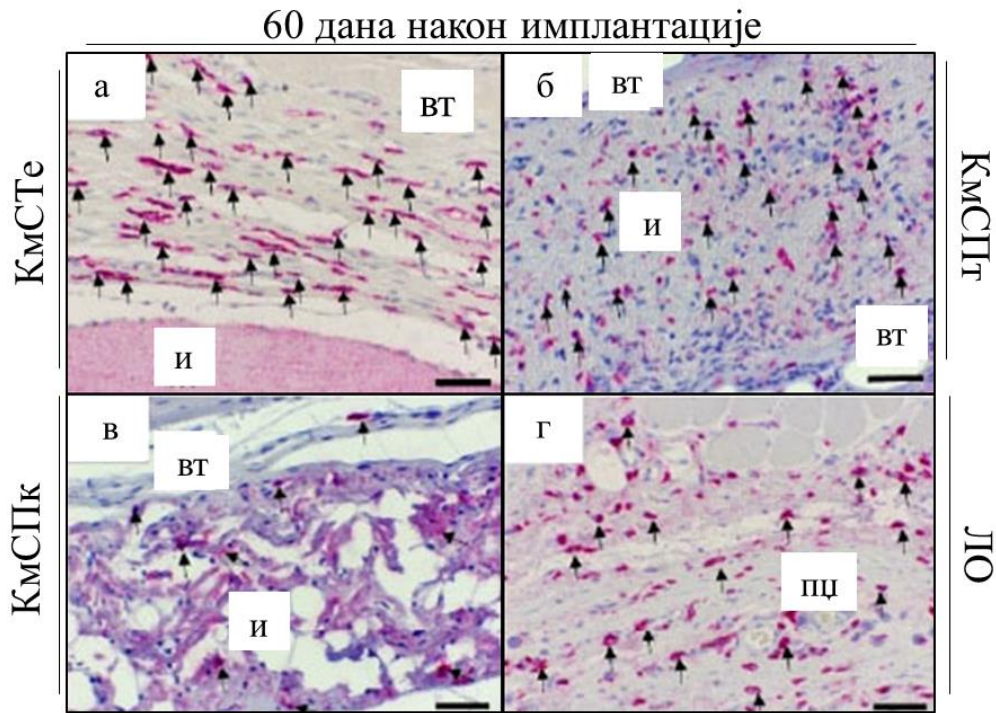
Слика 4.25. Имуноекспресија *CD163* у ткиву имплантационе регије имплантата КмСТе (а), КмСПт (б), КмСПк (в) и у поткожном џепу групе ЛО (г) тридесет дана након супкутане имплантације пацову. И – имплантат, ВТ - везивно ткиво, ПЦ - поткожни џеп. Црне стрелице показују *CD163* - позитивне ћелије. Увећање објектива 20х. Приказ скале 50 μ м.

На последњем посматраном термину од шездесет дана након имплантације детектована је инфилтрација *CD163* позитивних ћелија унутар мембрана групе КмСТе (Слика 4.26а).

У имплантатима КмСПт је запажен пораст броја *CD163* позитивних ћелија, као и њихва миграција ка средини имплантата шездесет дана након имплантације (Слика 4.26б).

На овом термину, *CD163* позитивне ћелије показују инфилтрирају и унутар имплантата групе КмСПк, али у мањој мери у односу на имплантате групе КмСПт (Слика 4.26в).

Присутност *CD163* позитивних ћелија се може детектовати у поткожном џепу контролне групе ЛО и на овом термину од шездесет дана након имплантације (Слика 4.26г).



Слика 4.26. Имуноекспресија *CD163* у ткиву имплантационе регије имплантата КмСТе (а), КмСПт (б), КмСПк (в) и у поткожном џепу групе ЛО (г) шездесет дана након супкутане имплантације пацову. И-имплантат, ВТ - везивно ткиво, ПЦ - поткожни џеп. Црне стрелице показују *CD163*-позитивне ћелије. Увећање објектива 20х. Приказ скале 50 μ м.

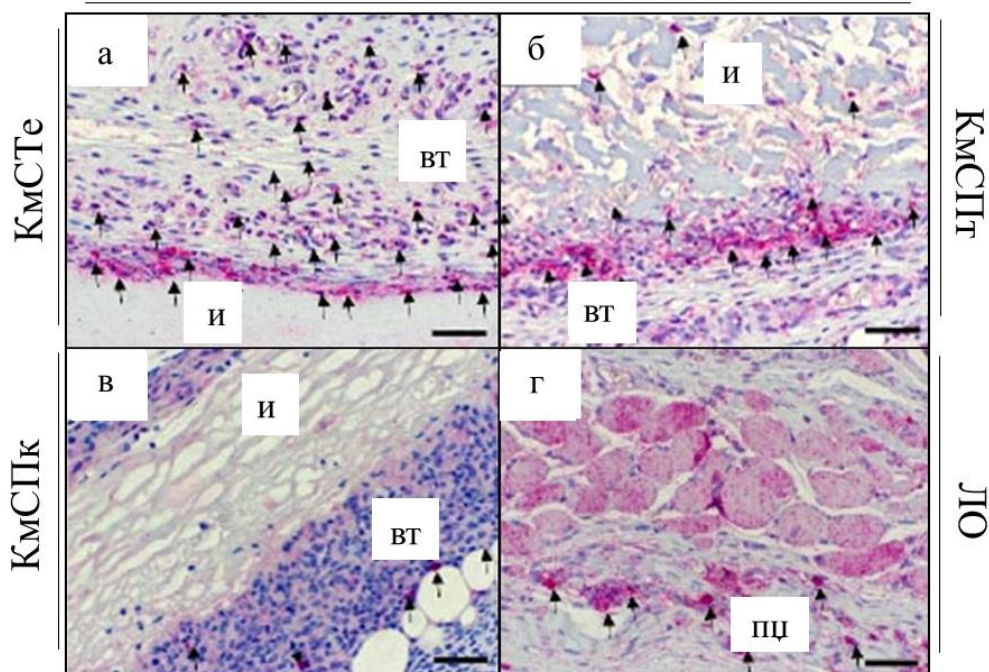
Имунохистохемијском анализом ткива имплантационе регије имплантата групе КмСТе запажено је присуство великог броја *CD11c* позитивних макрофага локализованих углавном на површини имплантата, у уском појасу инфламаторног ткива које окружује имплантате групе КмСТе, десет дана од имплантације (Слика 4.27а).

У ткиву имплантационе регије имплантата КмСПт, макрофаги позитивни на *CD11c* маркер су детектовани у највећем броју на површини имплантата КмСПт групе, али и у ширем појасу околног везивног ткива, у односу на имплантате КмСТе групе. Већи број ћелија на граници порозног слоја мембрана групе КмСПт је показало имуноекспресију *CD11c* (Слика 4.27б).

На површини имплантата групе КмСПк, није детектовано много макрофага позитивних на имуноекспресију *CD11c* маркера (Слика 4.27в).

CD11c позитивне ћелије нису детектоване у великом броју у ткиву поткожног џепа контролне групе ЛО (Слика 4.27г).

10 дана након имплантације



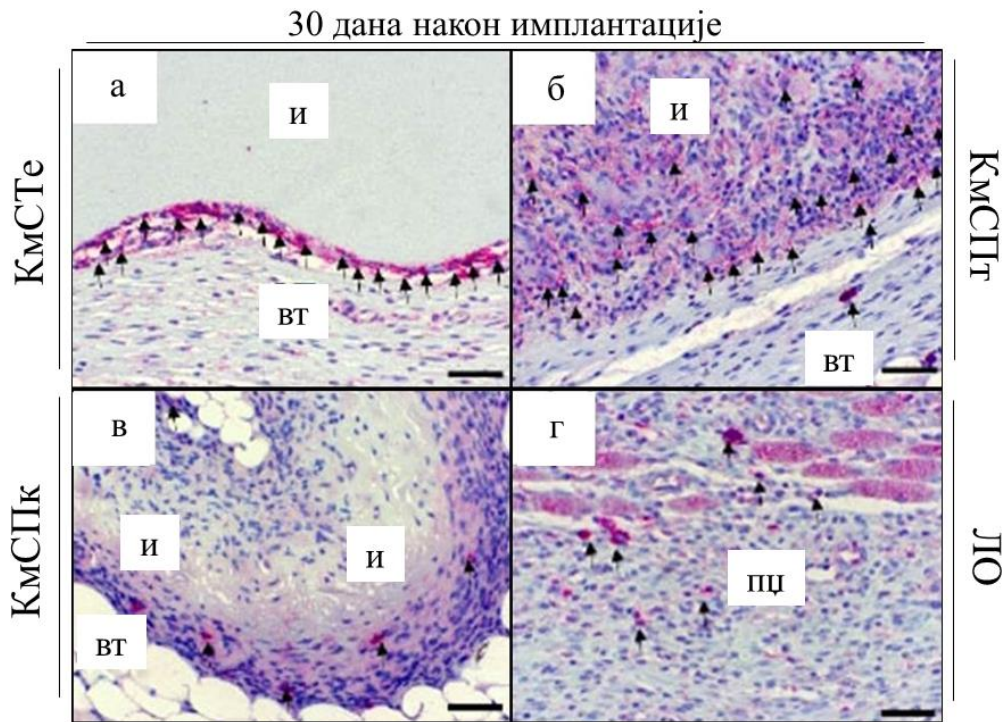
Слика 4.27. Имуноекспресија *CD11c* у ткиву имплантационе регије имплантата КмСТе (а), КмСПт (б), КмСПк (в) и у поткожном џепу групе ЛО (г) десет дана након супкутане имплантације пацову. И – имплантат, ВТ - везивно ткиво, ПЦ - поткожни џеп. Црне стрелице показују *CD11c* - позитивне ћелије. Увећање објектива 20х. Приказ скале 50 μm .

Након тридесет дана од имплантације имунохистохемијском анализом је детектовано присуство *CD11c* позитивних макрофага само на површини имплантата групе КмСТе, док су моноједарне ћелије у периферним слојевима имплантата групе КмСТе негативне на имуноекспресију *CD11c* (Слика 4.28а).

Анализом проинфламаторног одговора у ткиву имплантационе регије имплантата КмСПт групе уочена је локализација већег броја *CD11c* позитивних макрофага на граници порозног слоја имплантата и околног везивног ткива, док је мањи број ових ћелија детектован на граници компактног слоја и околног везивног ткива (Слика 4.28б).

У периферним слојевима мембране групе КмСПк је запажена инфилтрација мањег броја спорадично распоређених макрофага позитивних на *CD11c* маркер (Слика 4.28в).

У поткожном џепу је уочено присуство *CD11c* позитивних ћелија и на термину од тридесет дана након имплантације (Слика 4.28г).



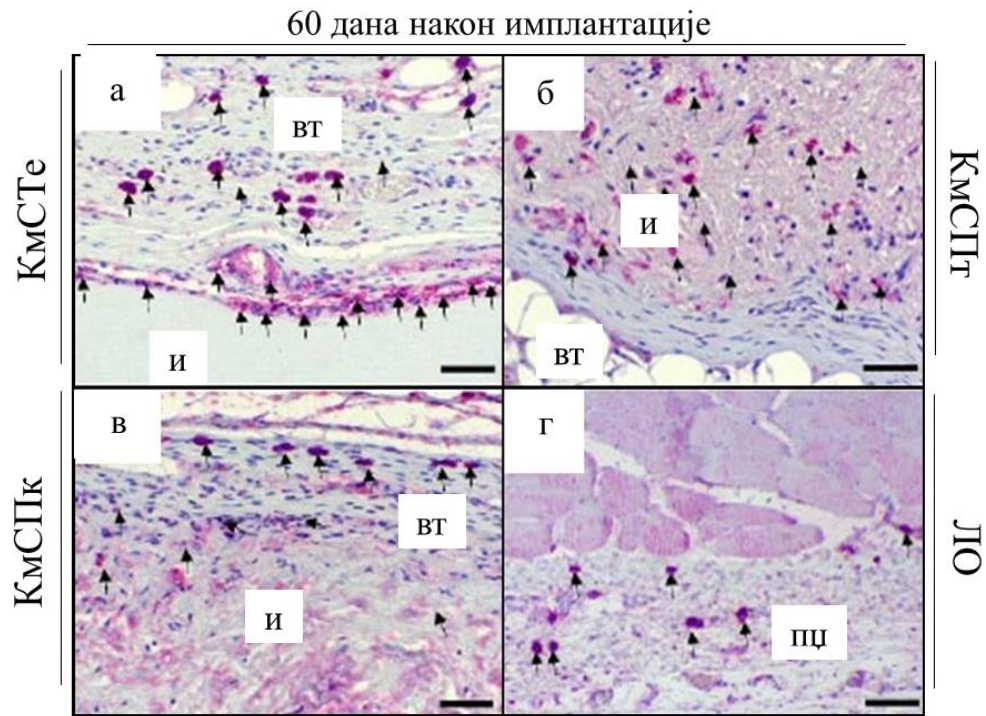
Слика 4.28. Имуноекспресија *CD11c* у ткиву имплантационе регије имплантата КмСТе (а), КмСПт (б), КмСПк (в) и у поткожном џепу групе ЛО (г) тридесет дана након имплантације. И – имплантат, ВТ - везивно ткиво, ПЦ - поткожни џеп. Црне стрелице показују *CD11c* - позитивне ћелије. Увећање објектива 20х. Приказ скале 50 μ м.

На површини мембране групе КмСТе уочено је присуство макрофага позитивних на имуноекспресију *CD11c* маркера шездесет дана након имплантације, у идентичној мери као и на претходном термину од тридесет дана након имплантације (Слика 4.29а). У унутрашњости имплантата КмСТе групе нису запажене *CD11c* позитивне ћелије.

У ткиву имплантационе регије имплантата групе КмСПт је запажена већа имуноекспресија *CD11c* у односу на претходне посматране термине. Проинфламаторни макрофаги су углавном локализовани у регији ресорпције порозног слоја имплантата, као и унутар компактног слоја имплантата (Слика 4.29б).

Имунохистохемијском анализом ткива имплантационе регије имплантата групе КмСПк је запажен пораст имуноекспресије *CD11c* у односу на претходна два термина. Макрофаги који су инфилтрирали до централног дела мембрана КмСПк групе показују позитивну *CD11c* имуноекспресију (Слика 4.29в).

У поткожном џепу групе ЛО је присутна имуноекспресија *CD11c* маркера у идентичној мери као на претходна два термина (Слика 4.29г).



Слика 4.29. Имуноекспресија *CD11c* у ткиву имплантационе регије имплантата КмСТе (а), КмСПт (б), КмСПк (в) и у поткожном џепу групе ЛО (г) шездесет дана након супкутане имплантације пацову. И- имплантат, ВТ - везивно ткиво, ПЦ - поткожни џеп. Црне стрелице показују *CD11c* - позитивне ћелије. Увећање објектива 20х. Приказ скале 50 μ м.

4.3.2. Хистоморфометријска анализа инфламаторног одговора ткива на имплантиране колагенске мембране КмСТе, КмСПт и КмСПк и ткива у поткожном џепу без имплантиране колагенске мембране

Хистоморфометријском анализом нађене су интериндивидуалне разлике у бројевима проинфламаторних и антиинфламаторних макрофага између група имплантата – КмСТе, КмСПт и КмСПк (График 4.7). На Графику 4.7. су приказане и интраиндивидуалне разлике између проинфламаторних и антиинфламаторних макрофага детектованих у ткиву имплантационе регије истих група имплантата, али на различитим терминима (График 4.4).

Број антиинфламаторних макрофага подтипа М2 је био значајно већи у ткиву имплантационе регије свих експерименталних група у односу на проинфламаторне макрофаге подтипа М1 на термину од десет дана након имплантације (График 4.7).

Након десет дана од имплантације, хистоморфометријском анализом је нађен уједначен број макрофага проинфламаторног типа у оквиру посматраних ткива имплантационе регије имплантата – КмСТе, КмСПт и КмСПк (График 4.7). Приближно једнак број антиинфламаторних макрофага је детектован имунохистохемијском анализом ткива

имплантационе регије имплантата КмСПк и ЛО, који је био статистички значајно виши у односу на број антиинфламаторних макрофага у ткиву имплантационе регије КмСПт групе (** $p \leq 0,01$) (График 4.7). Статистичка разлика није нађена компарацијом броја антиинфламаторних макрофага у ткиву имплантационе регије КмСТе групе у односу на број макрофага у ткиву имплантационе регије других група имплантата (График 4.7).

Након тридесет дана од имплантације, није пронађена статистички значајна разлика између проинфламаторних макрофага поређењем добијених вредности за број макрофага позитивних на маркер *CD11c* у ткиву имплантационих регија група КмСТе, КмСПт и КмСПк (График 4.7). На овом термину, број антиинфламаторних макрофага је приближно уједначен између вредности добијених анализом ткива имплантационе регије КмСПт групе и поткожног цепа ЛО групе, при чему је добијена вредност у ткиву имплантационе регије КмСПт имплантата била статистички значајно виша у поређењу са бројем антиинфламаторних макрофага у ткиву имплантационе регије имплантата КмСПк (**** $p \leq 0,0001$). Број антиинфламаторних макрофага у поткожном цепа ЛО групе је био статистички значајно виши у поређењу са вредностима које су добијене анализом ткива имплантационе регије КмСТе имплантата (** $p \leq 0,01$), при чему су обе вредности статистички значајно више у односу на добијени број у ткиву имплантационе регије КмСПк групе (** $p \leq 0,01$) (График 4.7). Број антиинфламаторних макрофага је виши у ткиву имплантационих регија имплантата КмСТе, КмСПт и КмСПк у односу на број проинфламаторних макрофага (График 4.7).

Након шездесет дана од имплантације, није детектована значајна разлика у броју проинфламаторних М1 макрофага у имплантационој регији различитих студијских група (График 4.4). Број антиинфламаторних М2 макрофага у ткиву имплантационе регије ЛО групе је био значајно виши (** $p \leq 0,01$ и **** $p \leq 0,0001$) у односу на вредности за ткиво имплантационих регија све три испитиване групе са имплантатима на овом термину (График 4.7). Број антиинфламаторних макрофага М2 у ткиву имплантационе регије имплантата КмСТе је био значајно виши (* $p \leq 0,05$ и ** $p \leq 0,01$) у односу на вредности добијене за ткиво имплантационих регија КмСПт и КмСПк имплантата (График 4.7). На овом термину, број М2 макрофага је био значајно виши у свим групама у поређењу са М1 макрофагима, са изузетком вредности добијених за ткиво имплантационе регије КмСПк имплантата, где није пронађена велика разлика у броју између два подтипа макрофага на овом термину (График 4.7).

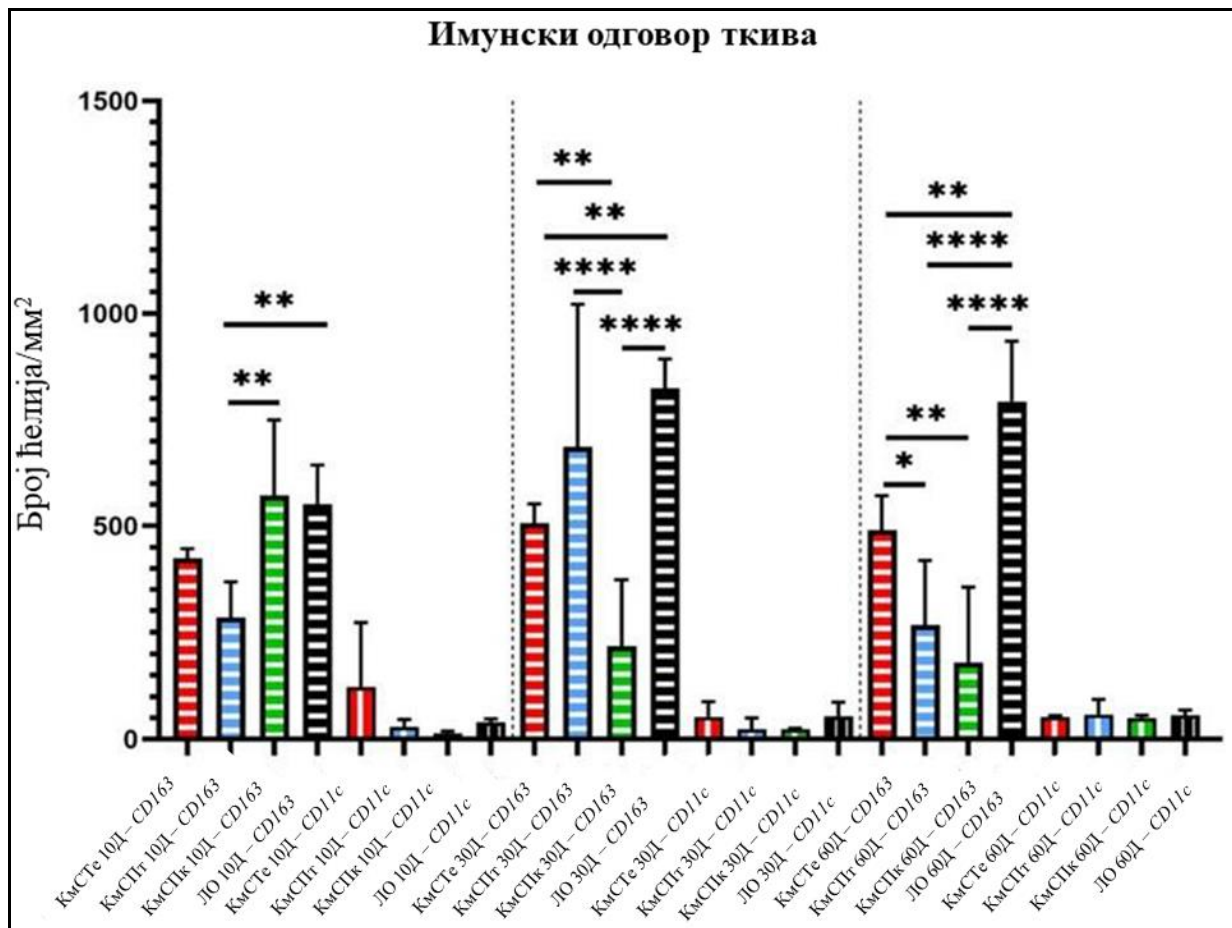


График 4.7. Хистоморфометријска анализа *CD163* позитивних макрофага (хоризонтални стубићи) и *CD11c* позитивних макрофага (вертикални стубићи) у ткиву имплантационе регије имплантата КмСТе (црвени стубић), КмСПт (плави стубић), КмСПк (зелени стубић) и у поткожном ткиву групе ЛО (црни стубић) десет, тридесет и шездесет дана након супкутане имплантације пацову (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$).

4.3.3. Хистоморфометријска анализа дебљине КмСТе, КмСПк и КмСПт типа имплантата

Хистоморфометријском анализом дебљине колагенских мембрана *ex vivo* је одређена иницијална дебљина за колагенске мембране КмСТе, КмСПт и КмСПк. Дебљина мембрана КмСПт измерена у *ex vivo* условима била је статистички значајно већа у односу на дебљину мембрана КмСТе и КмСПк (* $p \leq 0,05$) (График 4.8).

Након десет дана од имплтације, дебљина колагенске мембране КмСТе је износила 241% од иницијално измерене вредности дебљине мембране *ex vivo* (График 4.8а, б). Хистоморфометријском анализом дебљине мембрана КмСПт групе је, такође, запажен пораст дебљине у односу на иницијално измерену вредност, и она је износила 254% од првобитне вредности добијене *ex vivo* (График 4.8а, б). Код КмСПк мембрана је измерена

иста дебљина десет дана након имплантације у односу на почетну вредност *ex vivo* (График 4.8а, б).

Након тридесет дана од имплантације, дебљина КмСТе колагенских мембрана је износила 200% од првобитно измерене вредности, дебљина КмСПт колагенских мембрана 166% од иницијално измерене вредности, док је дебљина КмСПк мембране остала слична добијеним вредностима мерења *ex vivo* (График 4.8а, б).

На последњем посматраном термину, шездесет дана од имплантације, дебљина КмСТе колагенске мембране је износила 209% од првобитне вредности, КмСПт колагенске мембране 97% од иницијално измерене вредности, а дебљина мембране КмСПк 152% у односу на првобитно мерење у *ex vivo* условима (График 4.8а, б).

Статистичком анализом хистоморфометријских резултата дебљине колагенских мембрана су нађене статистички значајно више вредности за дебљину мембрана КмСТе на десет дана након имплантације у односу на дебљину мембрана исте групе на терминима од тридесет дана ($***p \leq 0,001$) и шездесет дана након имплантације ($*p \leq 0,05$) (График 4.8б).

Статистички значајно већа дебљина мембрана КмСПт је измерена на термину од десет дана након имплантације у односу на дебљину мембрана истог типа измерену на тридесет дана од имплантације ($*p \leq 0,05$), као и у односу на вредности дебљине истих колагенских мембрана шездесет дана од имплантације ($****p \leq 0,0001$) (График 4.8б).

Дебљина колагенских мембрана КмСПк је статистички значајно виша на термину од десет дана након имплантације у односу на вредности за дебљину исте врсте мембрана добијене шездесет дана након имплантације ($**p \leq 0,01$). Колагенске мембране КмСПк су имале статистички значајно већу дебљину и на термину од тридесет дана након имплантације у односу на измерене вредности за дебљину истих мембрана на термину од шездесет дана након имплантације ($*p \leq 0,05$) (График 4.8б).

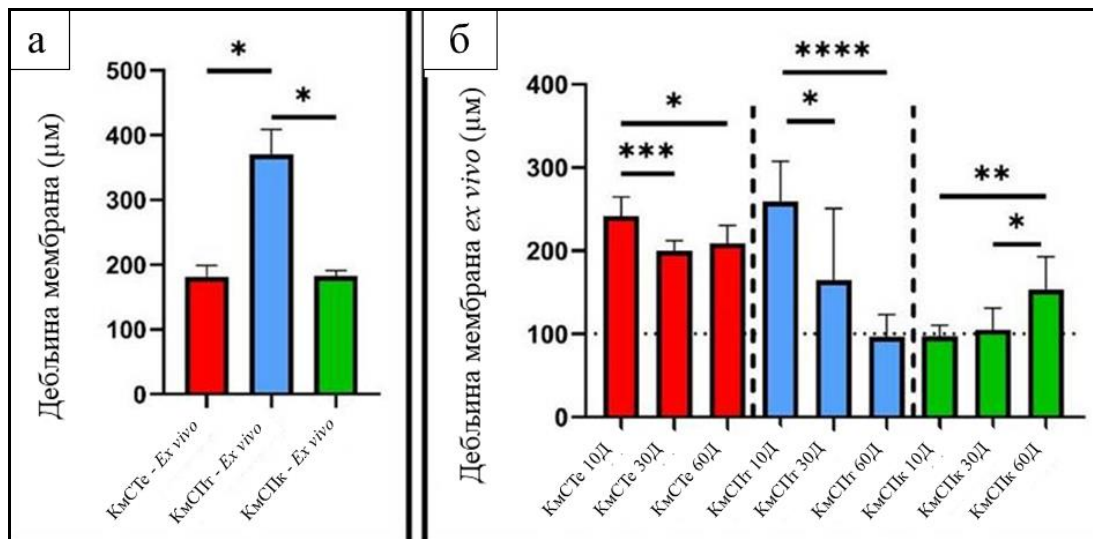
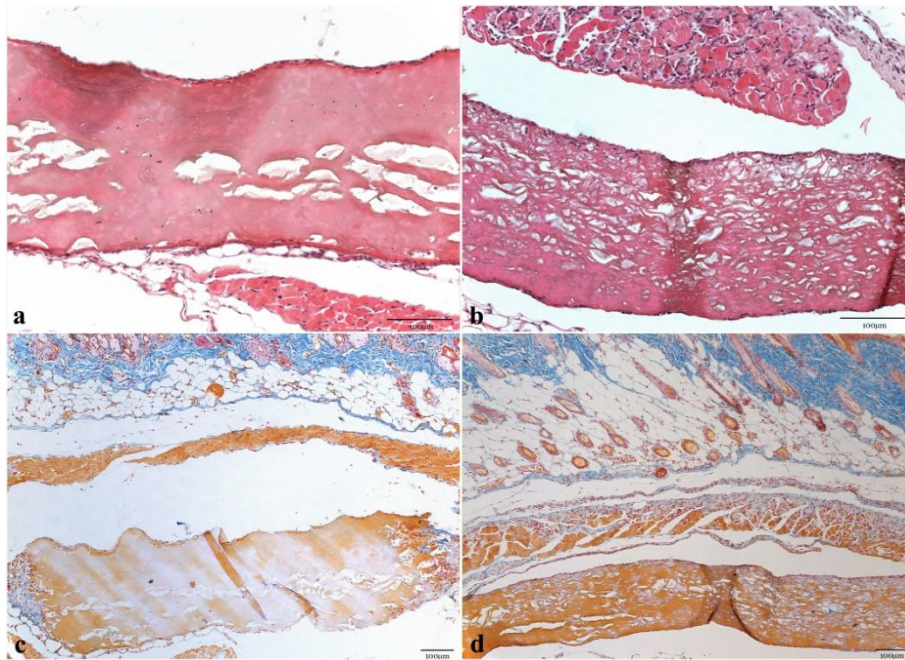


График 4.8. Хистоморфометријска анализа дебљине колагенских мембрана КмСТе, КмСПт и КмСПк *ex vivo* (а) и *in vivo* (б) десет, тридесет и шездесет дана након супкутане имплантације пацову.

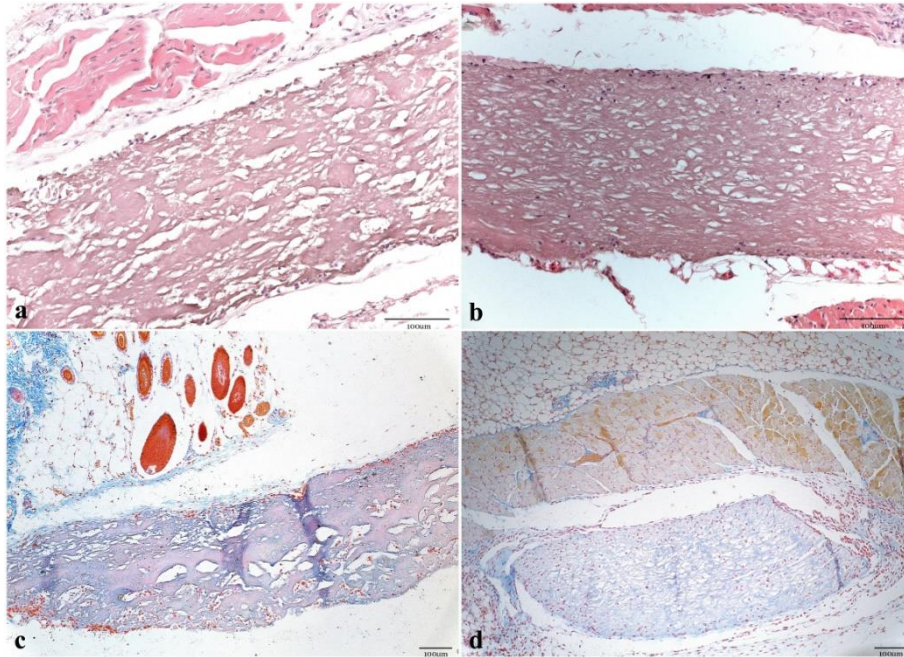
4.4. СТУДИЈА 4: Компарација одговора ткива на колагенске мембране различитог порекла на ектопичном моделу имплантације мишу

На сликама 4.30. до 4.33. су приказане хистолошке слике експлантираних КмС (4BONE RCM колагенска мембрана свињског порекла) и КмК (PARASORB RESODONT® колагенска мембрана коњског порекла) мембрана са околним ткивом. Три дана након имплантације, у групи КмС, уочава се компактна структура мембране са насумично распоређеним порама неједнаке величине. На површини материјала нађене су моноклеарне ћелије спљоштене морфологије, као и једноједарне ћелије налик макрофагима и различите инфламаторне ћелије (Слика 4.30а и в). На периферији мембране примећени су и вишеједарни фагоцити. Понегде се могу уочити једноједарне ћелије које су инфилтриране у КмС мембрану. У КмК групи након три дана се уочавају бројне поре кроз целу структуру мембране, равномерно распоређене, са танким слојем моноклеарних ћелија, углавном спљоштене морфологије, на површини мембране. Уочавају се и ћелије које су почеле да се инфилтрирају у поре мембране. На појединим местима се могу приметити и ретке инфламаторне ћелије.

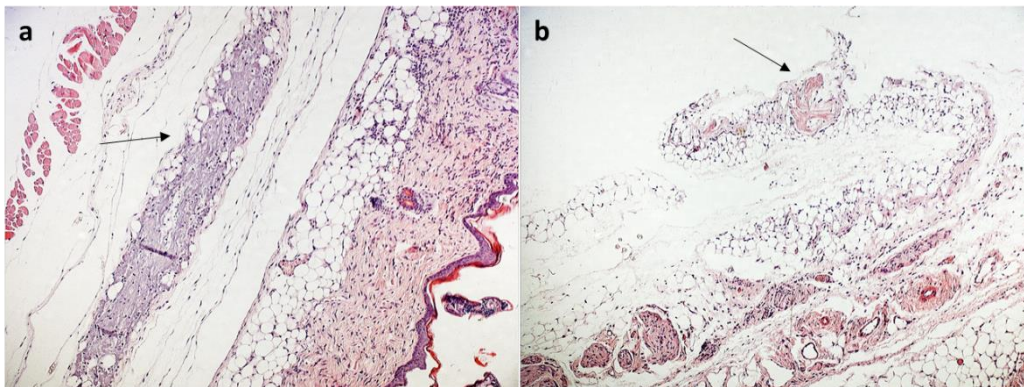


Слика 4.30. Микрографије ткивног пресека КМС (а, ц) и КМК (б, д) импланата три дана након имплантације, обојеног Н&Е методом бојења (а, б), увећање објектива 20х, 100 µm *scale bar*, и трихромним бојењем по Азану (в, г), увећање објектива 10х, 100 µm *scale bar*.

Десет дана након имплантације, КМС колагенска мембрана је и даље изгледала као стабилна баријера, али је била мање компактна него раније, са више пора него након три дана. Једноједарне ћелије налик макрофагима су примећене на мембрани и унутар мембране. Уочава се слој ћелија сличних фибробластима и инфламаторних ћелија на површини мембране, као и ћелије инфилтриране у велике поре кроз целу мембрану (Слика 4.30а и ц). Процес инфилтрације је примећен и у КМК групи, при чему су ћелије углавном одржаване у периферним деловима мембране са видљивим зонама миграције ка унутрашњости мембране и спорадично инфилтрираним ћелијама у центар мембране (Слика 4.30б и д). На појединим местима на периферији мембране уочене су инфламаторне ћелије леукоцитног типа. КМК мембрана је потпуно обојена у плаво методом бојења Азан (плава боја се односи на обојени колаген) и структура мембране веома подсећа на структуру нативних колагених влакана (Слика 4.30д).



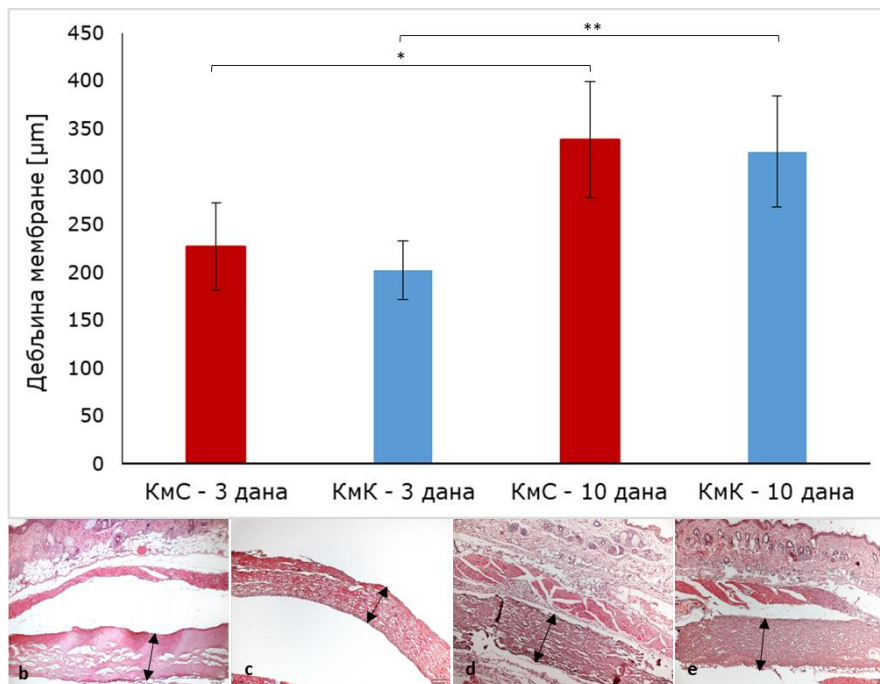
Слика 4.31. Микрографије ткивног пресека КМС (а, ц) и КМК (б, д) импланата 10 дана након имплантације, обојеног Н&Е методом бојења (а, б), увећање објектива 20х, 100 μm *scale bar*, и трихромним бојењем по Азану (в, г), увећање објектива 10х, 100 μm *scale bar*.



Слика 4.32. Микрографије ткивног пресека КМС (а) и КМК (б) импланата 30 дана након имлантације, обојеног Н&Е методом бојења, увећање објектива 10х, 100 μm *scale bar*, стрелице показују остатке колагенских мембрана.

Тридесет дана након имплантације, првобитна структура мембране је нарушена. У обе групе су примећени само остаци колагенских мембрана, са већим деловима КМС мембране у односу на КМК мембрану (Слика 4.32). Ово указује на то да је дошло до процеса деградације који је био израженији у случају КМК мембране. Већа стабилност, чак и у овом тренутку, примећена је у случају КМС колагенске мембране у поређењу са КМК мембраном. Остаци обе мембране су насељени ћелијама. Примећује се да је временом дошло до ресорпције обе мембране, која је била израженија у случају КМК мембране.

У обе експерименталне групе је примећено статистички значајно повећање дебљине мембране након 10 дана у односу на три дана (Слика 4.33), али није било статистички значајних разлика између КМС и КМК мембране у испитиваним временским периодима. Повећање дебљине колагенске мембране од трећег до десетог дана може се објаснити бубрењем мембране и инфилтрацијом ћелија околног поткожног ткива у мембрану. Мерење дебљине мембране 30. дана није вршено због ресорпције мембрана и присуства само остатака мембрана.



Слика 4.33. Резултати хистоморфометријске анализе дебљине мембрана (а); резултати су представљени као средња вредност по групи \pm стандардна девијација. Црне стрелице на микрографијама (б-е) указују на дебљину мембрана која је мерена, Н&Е бојење, увећање објектива 10х, *scale bar* 100 µm; (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$

4.5. СТУДИЈА 5: Компарација одговора ткива на колагенске мембране са додатком различитих физиолошких фактора на ектопичном моделу имплантације мишу

4.5.1. Анализа макроскопског изгледа супкутаних имплантата и околног поткожног ткива миша

Након три дана од имплантације сви имплантати су били макроскопски јасно уочљиви, без приметне промене у величини у односу на величину пре имплантације. На слици Слика 4.34 је приказан пример макроскопског изгледа имплантата. Имплантати групе КмСПк+Ф (*Jason*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из перикарда + физиолошки раствор), КмСПк+Се (*Jason*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из перикарда + серум), КмСПк+Пл (*Jason*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из перикарда + плазма), КмСКж+Ф (*Collprotect*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из коже + физиолошки раствор), КмСКж+Се (*Collprotect*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из коже + серум), КмСКж+Пл (*Collprotect*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из коже + плазма) су били сличног изгледа, беличасте боје, без присуства крвних судова на месту самог имплантата, са јасно овиченим ивицама у односу на околно везивно ткиво. На имплантатима групе КмСПк+Кр (*Jason*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из перикарда + разблажена крв) се уочава присуство формираног крвног угрушка (Слика 4.34б). Имплантати КмСКж+Кр (*Collprotect*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из коже + разблажена крв) имају бело-ружичасту боју која указује на остатке крвних елемената из крви која је додата на колагенску мембрану приликом формирања имплантата (Слика 4.34г).



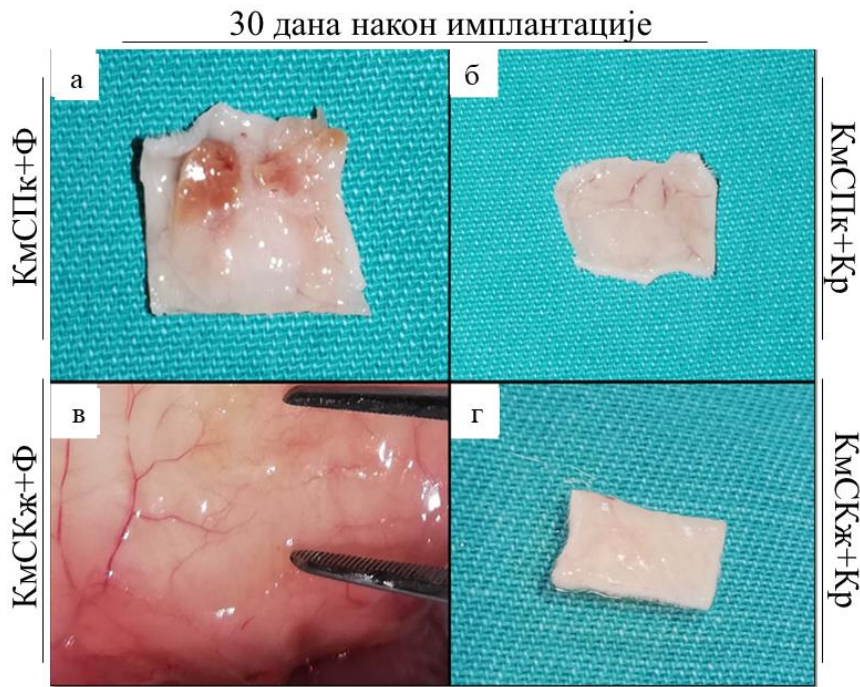
Слика 4.34. Пример макроскопског изгледа имплантата група КмСПк+Ф (а), КмСПк+Кр (б), КмСКж+Ф (в) и КмСКж+Кр (г) три дана након супкутане имплантације мишу.

Након десет дана од имплантације нису сви имплантати били макроскопски јасно видљиви. Није запажена редукција величине имплантата у односу на величину имплантата три дана након имплантације у групама КмСПк+Ф (Слика 4.35а), КмСПк+Се, КмСПк+Пл, КмСКж+Се, КмСКж+Пл, КмСКж+Ф (Слика 4.35в) и КмСКж+Кр (Слика 4.35г). Ови имплантати су слично изгледали током екстракције, попут беличасто правугаоних структура. На имплантатима групе КмСПк+Ф је уочено присуство мреже крвних судова која креће од околног ткива према центру имплантата. На имплантатима групе КмСПк+Кр се уочава присуство остатака крвног угрушка који је местимично ресорбован (Слика 4.35б). Имплантати група КмСКж+Се и КмСКж+Пл показују редукцију величине у односу на претходно посматрани термин, што може бити предикција започетог процеса ресорпције ових имплантата.



Слика 4.35. Пример макроскопског изгледа имплантата група КмСПк+Ф (а), КмСПк+Кр (б), КмСКж+Ф (в) и КмСКж+Кр (г) десет дана након супкутане имплантације мишу.

Након тридесет дана од супкутане имплантације мишу, имплантати група КмСПк+Ф (Слика 4.36а), КмСПк+Се, КмСПк+Пл и КмСПк+Кр (Слика 4.36б) били су јасно видљиви, уз приметну редукцију величине што указује на делимичну ресорпцију имплантата. Имплантати група КмСКж+Ф (Слика 4.36в) и КмСКж+Кр (Слика 4.36г) су били једва видљиви макроскопском анализом, што може бити предикција већег степена ресорпције ових група имплантата у односу на претходно споменуте имплантате КмСПк+Ф, КмСПк+Се, КмСПк+Пл и КмСПк+Кр. Имплантати група КмСКж+Се и КмСКж+Пл нису били макроскопски видљиви, па је за обраду ткива узоркован регион од интереса који је обухватао место поткожног цепа у који је имплантиран биоматеријал.



Слика 4.36. Пример макроскопског изгледа имплантата КмСПк+Ф (а), КмСПк+Кр (б), КмСКж+Ф (в) и КмСКж+Кр (г) тридесет дана након супкутане имплантације мишу.

4.5.2. Хистолошка анализа супкутаних имплантата и околног поткожног ткива миша

4.5.2.1. Хистолошка анализа имплантата и околног поткожног ткива три дана након имплантације

Након три дана од имплантације, колагенски имплантати у свим експерименталним групама су јасно видљиви, компактни, без знакова ресорпције на овом термину.

Имплантати групе КмСПк+Ф делују компактно, са порозном структуром попут саћа. На површини имплантата се налази танак слој једноједарних ћелија које су спорадично распоређене и не покривају у целу површину имплантата (Слике 4.37а и 4.38а). Околно поткожно ткиво не показује инфламаторну реакцију, а око имплантата је примећено присуство малих крвних судова (Слика 44а).

На површини имплантата групе КмСКж+Ф се уочава дебљи слој фиброзног ткива са бројним једноједарним ћелијама које су адхерирале на површину имплантата у више слојева, што указује на почетак урастања имплантата у околно ткиво. Нису присутни знаци ресорпције материјала (Слика 4.37б и 4.38б).

Хистолошка анализа имплантата КмСПк+Се групе показује присуство имплантата који изгледа компактније у односу на имплантате КмСПк+Ф, са густо распоређеним порама које

су слабије изражене. Једноједарне ћелије су спорадично присутне на површини имплантата, у већем броју на страни имплантата окренутој ка поткожном ткиву него према кожи (Слика 4.37в и 4.38в).

Имплантати групе КмСКж+Се се јасно уочавају три дана након имплантације, са знаковима почетка ресорпције. Окружени су веома танким слојем фиброзног ткива са местимично присутним фибробластима и једноједарним ћелијама које су продрле у периферне слојеве имплантата, док у централном делу имплантата ћелије нису детектоване (Слика 4.37г и 4.38г).

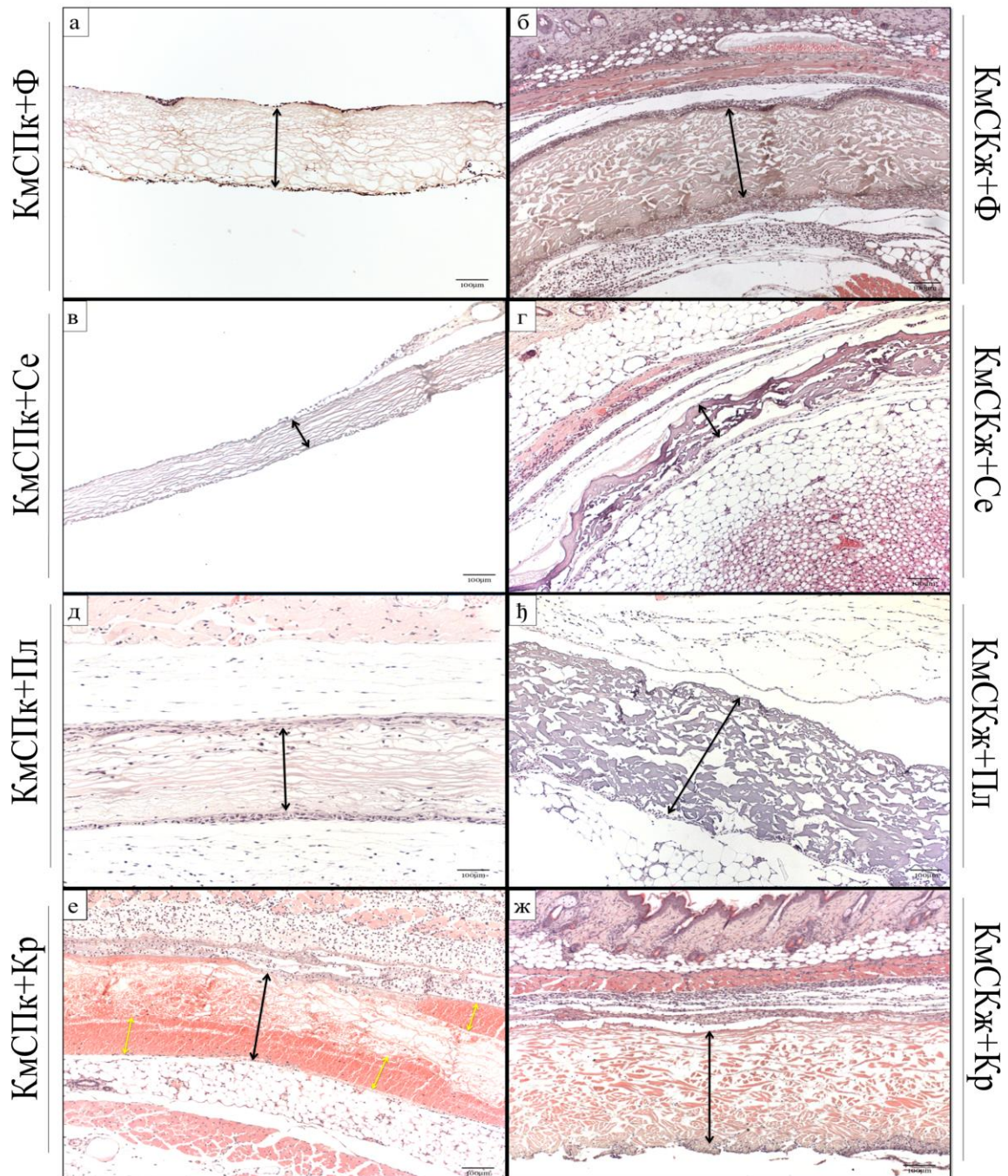
Површина имплантата групе КмСПк+Пл је прекривена бројним једноједарним ћелијама које налажу на имплантат са обе стране у више слојева, са тенденцијом инфилтрације у дубље слојеве порозног материјала. И поред изражене адхеренције ћелија, нема знакова ресорпције имплантата на овом термину (Слика 4.37д и 4.38д).

Имплантати групе КмСКж+Пл не показују знакове ресорпције и готово да се не уочавају ћелије на површини материјала на овом термину. Танак слој фиброзног ткива са макрофагима и фибробластима окружује имплантате, али није чврсто срастао за површину имплантата (Слика 4.37ђ и 4.38ђ).

У имплантатима КмСПк+Кр уочава се присуство расутих еритроцита, као и зоне јасно формираног коагулума који није ресорбован и који је настао као последица додатка крви приликом припреме имплантата. Хистолошка анализа имплантата КмСПк+Кр показује присуство и једноједарних ћелија имунског система, ређе фибробласта на површини и у периферном слоју имплантата (Слике 4.37е и 4.38е). У околном везивном ткиву око имплантата се запажа велики број једноједарних ћелија имунског система, што указује на присутност благе инфламаторне реакције (Слика 4.37е).

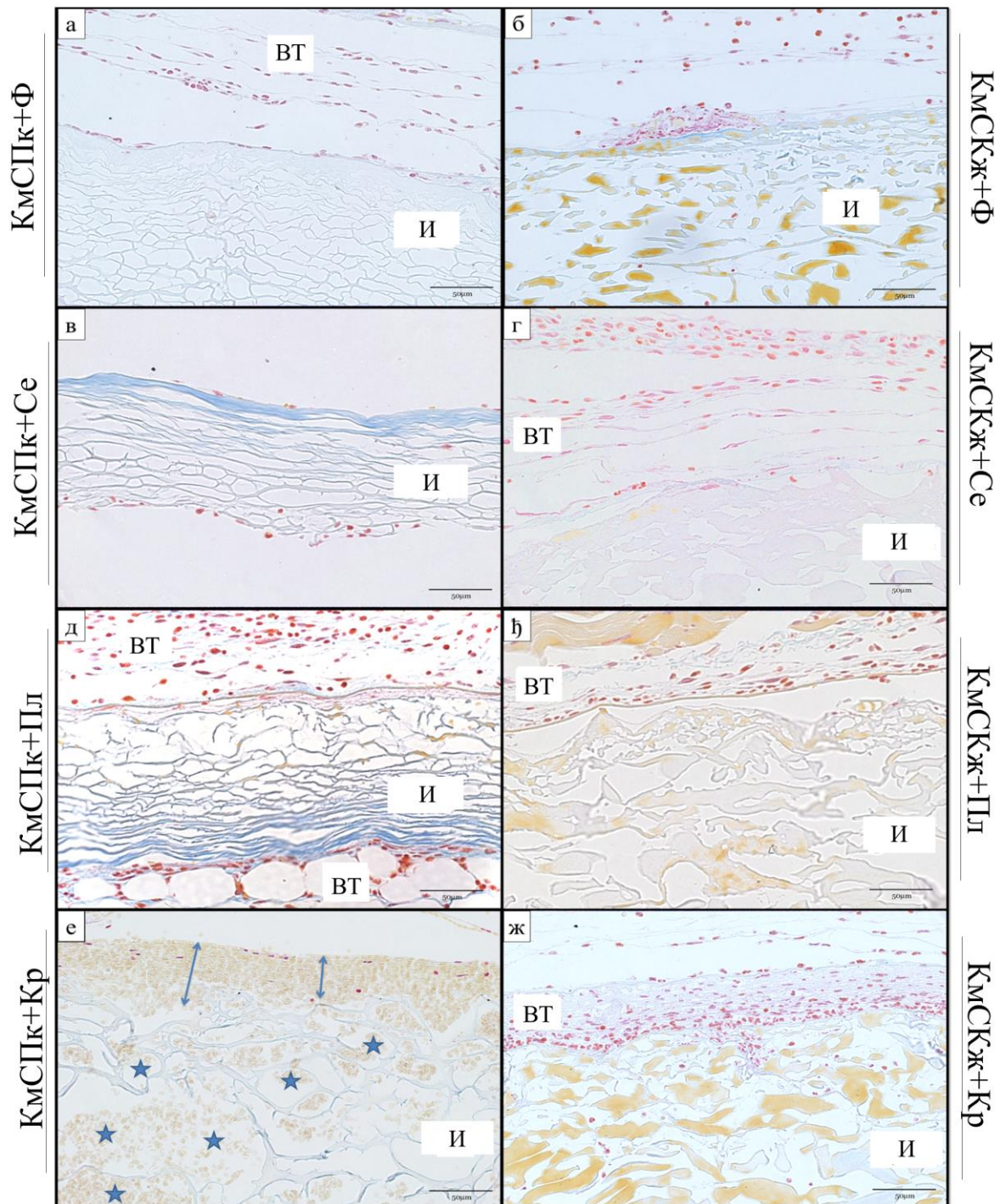
Имплантати КмСКж+Кр су окружени слојем фиброзног ткива који је дебљи на страни према поткожном ткиву. У унутрашњости имплантата није запажена инфилтрација ћелија, док на површини имплантата доминирају једноједарне ћелије имунског система и фибробласти (Слика 4.37ж и 4.38ж).

3 дана након имплантације



Слика 4.37. Хистолошке слике имплантата КмСПк+Ф (а), КмСКж+Ф (б), КмСПк+Се (в), КмСКж+Се (г), КмСПк+Пл (д), КмСКж+Пл (ж), КмСПк+Кр (е), и КмСКж+Кр (ж) три дана након супкутане имплантације мишу. Црне стрелице показују дебљину колагенског имплантата, жуте стрелице показују дебљину формираног коагулума. Бојено *H&E* методом, увећање објектива 10x. Скала показује 100 μm .

3 дана након имплантације



Слика 4.38. Хистолошке слике имплантата КмСПк+Ф (а), КмСКж+Ф (б), КмСПк+Се (в), КмСКж+Се (г), КмСПк+Пл (д), КмСКж+Пл (ђ), КмСПк+Кр (е), и КмСКж+Кр (ж) три дана након супкутане имплантације мишу. И – имплантат, ВТ – везивно ткиво. Плаве стрелице показују дебљину формираног коагулума, а плаве звездице расуте еритроците у имплантату. Бојено *Azan*-у методом, увећање објектива 40х. Скала показује 50 μm .

4.5.2.2. Хистолошка анализа имплантата и околног поткожног ткива десет дана након имплантације

Након десет дана од имплантације, макроскопски су јасно видљиви имплантати група КмСПк+Ф, КмСПк+Кр, КмСПк+Се, ЈПП, КмСКж+Ф, и КмСКж+Кр са неприметном променом величине у односу на имплантацију и претходни термин посматрања. Макроскопски нису биле јасно уочљиве границе имплантата КмСКж+Пл, а још мање границе имплантата КмСКж+Се, што указује на присутну ресорпцију ових група имплантата.

Хистолошка анализа је показала да су имплантати групе КмСПк+Ф лепо урасли у околно ткиво и на њиховој површини се уочава присуство тањег слоја фиброзног ткива према кожи, а дебљег слоја фиброзног ткива према поткожном ткиву. Запажа се инфилтрација једноједарних ћелија у унутрашњост мембране, али без великог броја ћелија присутних у централним слојевима. На површини имплантата доминира разноврсна популација једноједарних ћелија, али се могу уочити и вишеједарне ћелије (Слике 4.39а и 4.40а).

На имплантатима групе КмСКж+Ф десет дана након имплантације се уочава дебљи слој фиброзног ткива са обе стране имплантата (Слика 4.39б), богат једноједарним ћелијама и фибробластима са изразитом продукционом активношћу што се огледа у присутним депозитима новосинтетисаног колагена (Слика 4.40б).

Имплантати групе КмСПк+Се показују знакове делимичне ресорпције, уз изражену инфилтрацију једноједарних ћелија ка унутрашњости имплантата, праћену формирањем слоја фиброзног ткива на површини имплантата (Слика 4.39в).

У групи имплантата КмСКж+Се је изражена ресорпција десет дана након имплантације. Границе имплантата нису јасно видљиве и постепено се губе у фиброжном ткиву које окружује имплантат (Слика 4.39г). Фиброзно везивно ткиво око имплантата је богато крвним судовима, при чему је њихово формирање уочено и у остацима самих имплантата (Слика 4.40г). Између детектованих фрагмената имплантата КмСКж+Се се уочава велики број једноједарних ћелија и фибробласта, али и мањи број вишеједарних циновских ћелија (Слика 4.39г).

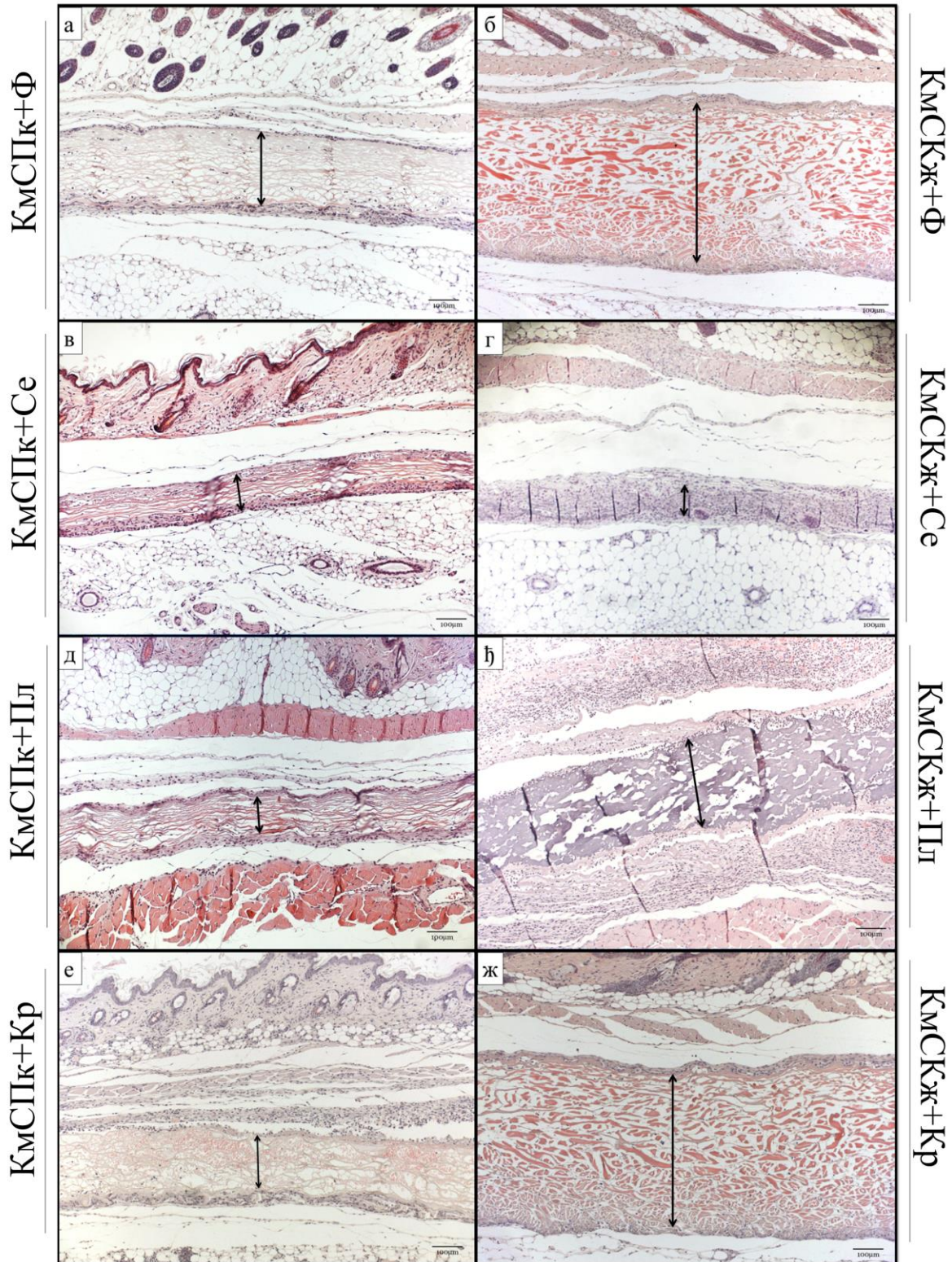
Присуство крвних судова се, такође, уочава у везивном ткиву које окружује имплантате КмСПк+Пл десет дана након имплантације (Слика 4.40д), чија инвазија у унутрашњост имплантата је праћена инфилтрацијом великог бројем једноједарних ћелија, које у већој мери инфилтрирају имплантат на страни имплантата окренутој ка поткожном масном ткиву (Слике 4.39д и 4.40д).

У имплантатима КмСКж+Пл се уочава блага инфламаторна реакција околног ткива која је праћена великим бројем густо распоређених ћелија имунског система, са слабо присутном васкуларизацијом. Иако је присутан слој фиброзног ткива уз површину имплантата, он се не разликује јасно одвојеном границом од поткожног везивног ткива око имплантата, јер у посматраним имплантационим регијама преовладава слична инфламаторна реакција благог интензитета (Слике 4.39ђ и 4.40ђ) .

У имплантатима КмСПк+Кр се и даље уочава присуство расутих еритроцита, али зоне јасно формираног коагулума више нису присутне (Слике 4.39е и 4.40е). Неједнако развијено фиброзно ткиво окружује имплантат. На неким регијама површине имплантата се запажа присуство са продором једноједарних ћелија имунског система, и ређе фибробласта. Инфилтрација ћелија није запажена у унутрашњости имплантата (Слике 4.39е и 4.40е).

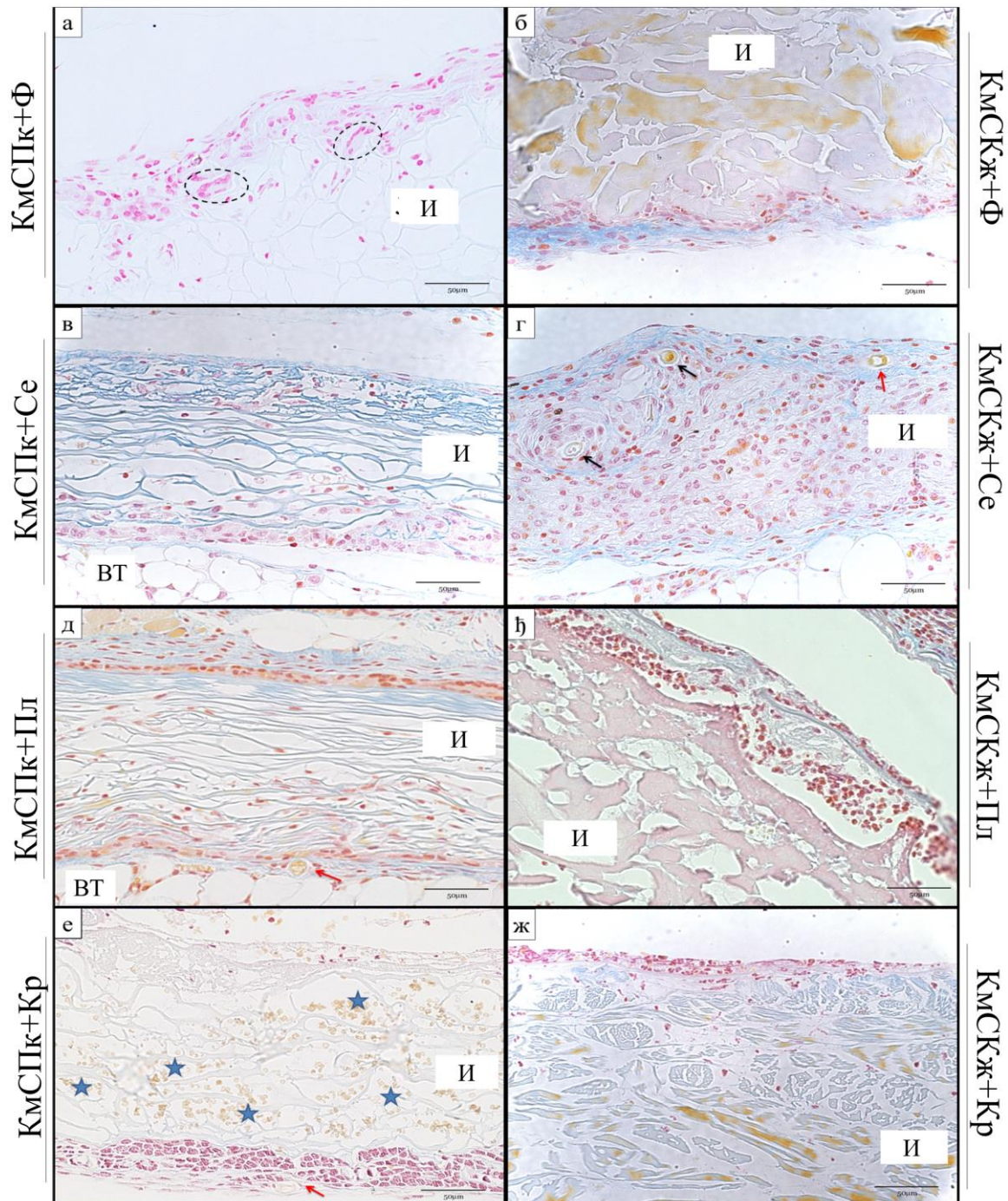
Имплантати КмСКж+Кр су окружени фиброзним ткивом које је неједнако развијено дуж површине имплантата и дебље је са стране према поткожном ткиву. Инфилтрација ћелија у дубље слојеве имплантата није запажена, док на његовој површини доминира присуство једноједарних ћелија имунског система и фибробласта (Слике 4.39ж и 4.40ж).

10 дана након имплантације



Слика 4.39. Хистолошке слике имплантата КмСПк+Ф (а), КмСКж+Ф (б), КмСПк+Се (в), КмСКж+Се (г), КмСПк+Пл (д), КмСКж+Пл (ђ), КмСПк+Кр (е), и КмСКж+Кр (ж) десет дана након супкутане имплантације мишу. Црне стрелице показују дебљину имплантата. Бојено *H&E* методом, увећање објектива 10х. Скала показује 100 μm .

10 дана након имплантације



Слика 4.40. Хистолошке слике имплантата КмСПк+Ф (а), КмСКж+Ф (б), КмСПк+Се (в), КмСКж+Се (г), КмСПк+Пл (д), КмСКж+Пл (ђ), КмСПк+Кр (е), и КмСКж+Кр (ж) десет дана након супкутане имплантације мишу. И – имплантат, ВТ – везивно ткиво. Испрекидана елипса показује присуство вишеједарних циновских хелија, црвене стрелице крвне судове у фиброзном ткиву, а црне стрелице крвне судове у имплантату. Плаве звездице показују расуте еритроците кроз имплантат. Бојено *Azan*-у методом, увећање објектива 40х. Скала показује 50 μm .

4.5.2.3. Хистолошка анализа имплантата и околног поткожног ткива тридесет дана након имплантације

Након тридесет дана од имплантације, једна група имплантата се јасно уочава без знакова ресорпције, а то су: КмСПк+Ф, КмСПк+Се, КмСПк+Пл и КмСПк+Кр, док се имплантати: КмСКж+Ф, КмСКж+Се, КмСКж+Пл и КмСКж+Кр не виде са јасним границама и очуваном структуром у хистолошким препаратима, што указује на узнапредовалу ресорпцију ових имплантата, која је убедљиво најизраженија у имплантатима КмСКж+Се и КмСКж+Пл.

Имплантати КмСПк+Ф се уочавају са јасно дефинисаним границама, компактни, са присуством дебелог слоја везивног ткива које покрива целу површину имплантата. Једноједарне ћелије инфилтрирају имплантат са обе стране до централне регије, иако их није много детектовано у овом делу. Крвни судови су присутни на површини имплантата, на граници са околним везивним ткивом (Слика 4.41а и 4.42а).

Узнапредовала ресорпција имплантата КмСКж+Ф је запажена на овом термину од тридесет дана након имплантације. Имплантат који је прожет инфилтрираним једноједарним ћелијама замењује фиброзно ткиво које окружује фрагменте имплантата и у коме доминирају депозити новосинтетисаног колагена уз густо расуте активне фибробласте (Слика 4.42б).

Имплантати КмСПк+Се су чврсто интегрисали у околно везивно ткиво и на њиховој површини се уочава присуство тањег слоја фиброзног ткива према кожи и дебљег слоја фиброзног ткива према поткожном ткиву. Запажа се инфилтрација једноједарних ћелија у унутрашњост мембране, али без великог броја ћелија присутних у централним регијама имплантата. На површини имплантата је уочена разноврсна популација једноједарних ћелија, али се могу детектовати и вишеједарне циновске ћелије (Слике 4.41д и 4.42д).

Имплантати КмСКж+Се су готово потпуно ресорбовани на овом термину. Уочавају се остаци имплантата окружени фиброзним ткивом (Слика 4.41г) или само фиброзно ткиво на месту где су били имплантирани имплантати КмСКж+Се (Слика 4.42г).

Хистолошком анализом имплантата КмСПк+Пл се уочавају депозити фиброзног ткива који налажу на саму површину имплантата. У околном везивном ткиву се поред једноједарних ћелија детектују вишеједарне циновске ћелије, чије је присуство повезано са удубљенима на површини имплантата, што указује на њихову улогу у ресорпцији материјала (Слика 4.41д и 4.42д).

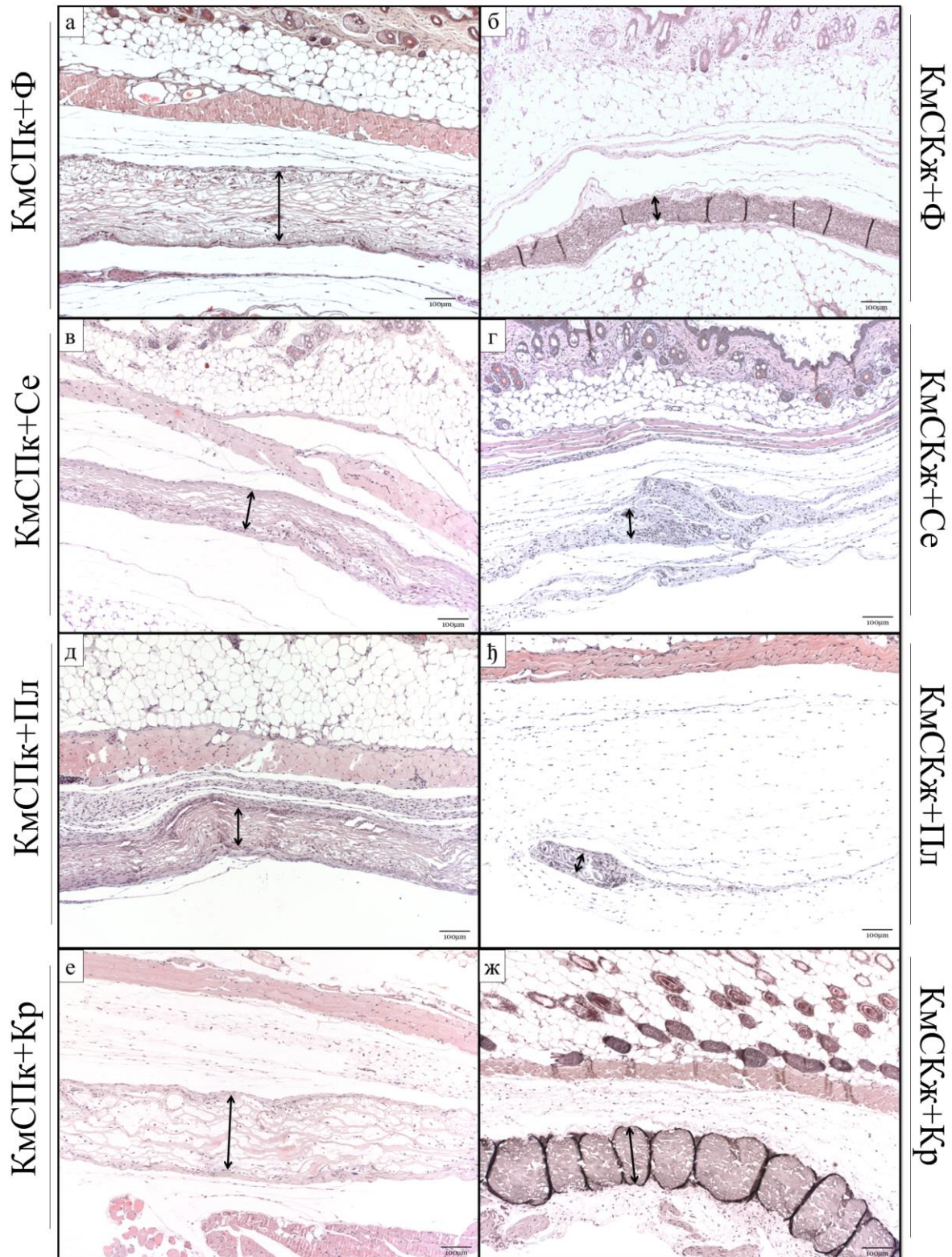
Узнапредовала ресорпција материјала је детектована хистолошком анализом КмСКж+Пл имплантата. Њихови остаци су окружени крвним судовима и једноједарним

ћелијама, при чему се не уочава јасна граница имплантата, већ само преостали фрагменти (Слика 4.41ђ и 4.42ђ).

У имплантатима КмСПк+Кр се не уочава присуство еритроцита нити остатака коагулума који је био јасно видљив у претходним терминима, али се уочава присуство једноједарних ћелија које су инфилтрирале до централне регије имплантата, који је задржао свој растресит изглед са јасно израженим порама (Слике 4.41е и 4.42е).

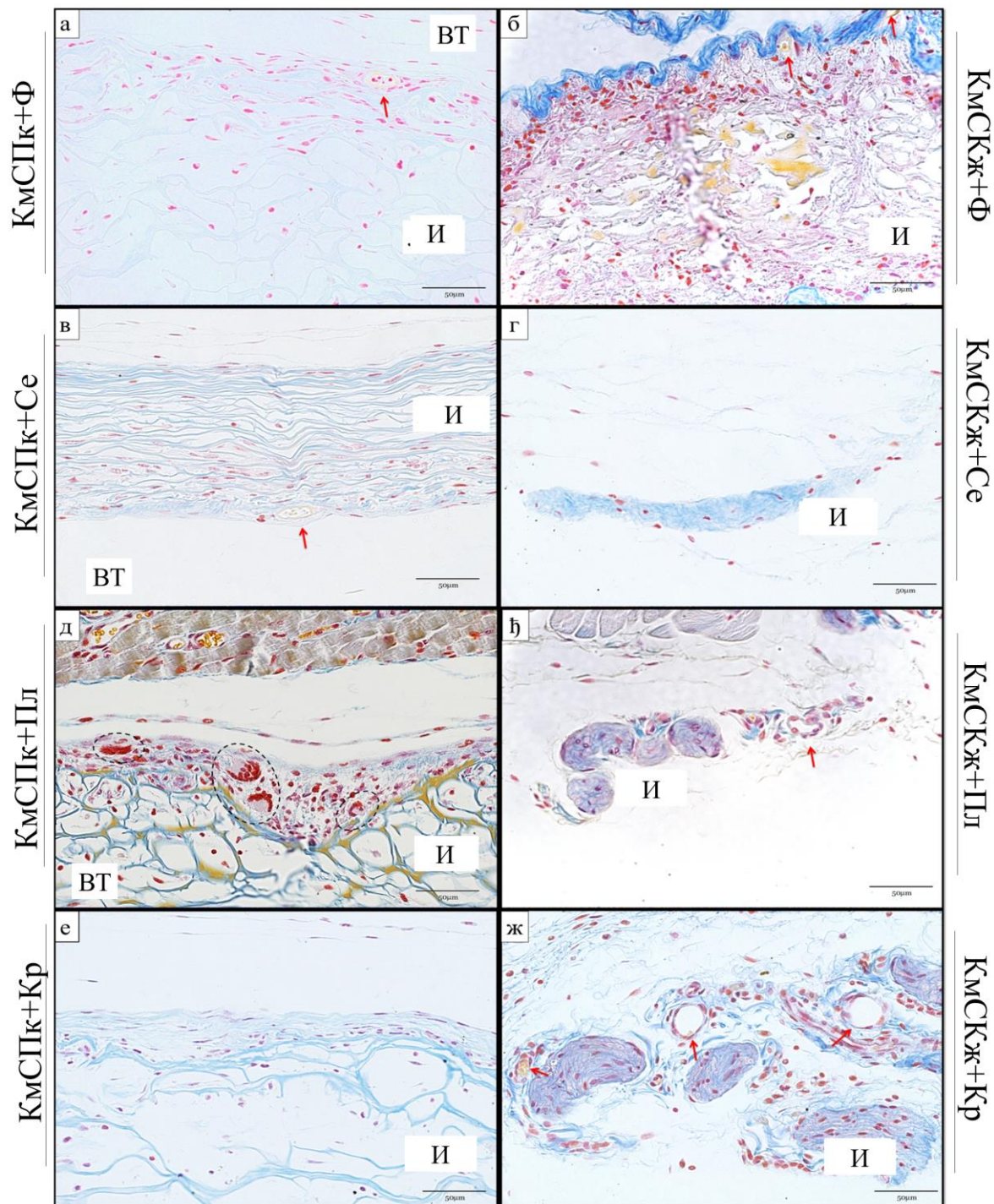
Хистолошком анализом имплантата КмСКж+Кр је уочено присуство јасно дефинисаних имплантата, значајно мање величине у односу на претходне термине (Слика 4.41ж) или груписаних фрагмената имплантата са фиброзним ткивом које је инфилтрирало између њих и у коме је изражен процес ангиогенезе (Слика 4.42ж).

30 дана након имплантације



Слика 4.41. Хистолошка слика имплантата КмСПк+Ф (а), КмСКж+Ф (б), КмСПк+Се (в), КмСКж+Се (г), КмСПк+Пл (д), КмСКж+Пл (ђ), КмСПк+Кр (е), и КмСКж+Кр (ж) тридесет дана након супкутане имплантације мишу. Црне стрелице показују дебљину имплантата. Бојено *H&E* методом, увећање објектива 10x. Скала показује 100 μm.

30 дана након имплантације



Слика 4.42. Хистолошка слика имплантата КмСПк+Ф (а), КмСКж+Ф (б), КмСПк+Се (в), КмСКж+Се (г), КмСПк+Пл (д), КмСКж+Пл (ђ), КмСПк+Кр (е), и КмСКж+Кр (ж) тридесет дана након супкутане имплантације мишу. И – имплантат, ВТ – везивно ткиво. Елипса показује присуство вишеједарних ћелија, а црвене стрелице крвне судове у фиброзном ткиву. Бојено *Azan*-у методом, увећање објектива 40х. Скала показује 500 μm .

4.5.3. Хистоморфометријска анализа дебљине супкутанних имплантата миша

Хистоморфометријска анализа дебљине имплантата је спроведена ради утврђивања степена ресорпције имплантата на три, десет и тридесет дана након супкутане имплантације мишу. Статистичка обрада добијених вредности и рачунање статистичких значајности је вршено груписањем добијених вредности за имплантате у два кластера. Унутар кластера, вредности за дебљину имплантата су компарирани за исте групе имплантата на различитим терминима (утврђивање интраиндивидуалних разлика) или компарацијом вредности добијених за дебљину имплантата за различите група на истим терминима (интериндивидуалне разлике). Први кластер су чинили имплантати који су формиран на бази исте врсте колагенске мембране и којој су додавани различити физиолошки фактори. Први кластер за статистичку анализу су чинили имплантати: КмСПк+Ф, КмСПк+Се, КмСПк+Пл и КмСПк+Кр, у чијој основи је *Jason*[®] колагенска мембрана. Други кластер за статистичку анализу су чинили имплантати: КмСКж+Ф, КмСКж+Се, КмСКж+Пл и КмСКж+Кр, у чијој основи је *Collprotect*[®] колагенска мембрана.

Хистоморфометријском анализом није нађено постојање интраиндивидуалних статистички значајних промена у дебљини имплантата КмСПк+Ф, КмСПк+Се, КмСПк+Пл и КмСПк+Кр на терминима од три, десет и тридесет дана. Блага редуција дебљине имплантата детектована је за имплантате КмСПк+Ф и КмСПк+Кр тридесет дана након имплантације у односу на термин од три дана по имплантацији, али ова разлика није била статистички значајна (График 4.6а).

Компарацијом измерених вредности за дебљину имплантата група из првог кластера, одређена је највећа дебљина за имплантате КмСПк+Ф, статистички значајно већа у односу на дебљину имплантата КмСПк+Се ($####p \leq 0,0001$) и КмСПк+Пл ($##p \leq 0,01$). Дебљина имплантата КмСПк+Кр је статистички значајно већа од имплантата КмСПк+Се ($##p \leq 0,01$) (График 4.6а).

Након десет дана од имплантације, интериндивидуална статистичка значајност не постоји само у случају компарације дебљине измерене за имплантате КмСПк+Ф и КмСПк+Кр. Компаративном анализом је утврђена статистички значајна разлика између свих других група имплантата првог кластера, при чему су најмање вредности за дебљину имплантата на овом термину добијене за имплантате КмСПк+Се, које су биле статистички значајно мање у односу на вредности за дебљину имплантата КмСПк+Ф ($###p \leq 0,001$), КмСПк+Пл ($#p \leq 0,05$) и КмСПк+Кр ($####p \leq 0,0001$). Добијене вредности за дебљину групе КмСПк+Пл су значајно ниже од вредности дебљине за групе имплантата КмСПк+Кр ($#p \leq$

0,05) и КмСПк+Ф (### $p \leq 0,001$) на термину од десет дана након супкутане имплантације мишу (График 4.6а).

На термину од тридесет након имплантације није нађена статистички значајна разлика компарацијом вредности за дебљину имплантата КмСПк+Се и имплантата КмСПк+Пл, као и компарацијом вредности имплантата КмСПк+Пл са вредностима имплантата КмСПк+Кр. Измерене вредности за дебљину имплантата КмСПк+Се су значајно ниже у односу на измерене вредности за имплантате КмСПк+Ф (### $p \leq 0,001$) и у односу на вредности за имплантате КмСПк+Кр ($\#p \leq 0,01$). На овом термину је детектована статистички значајно мања дебљина имплантата КмСПк+Пл у односу на дебљину имплантата КмСПк+Ф ($\#p \leq 0,05$) и у односу на дебљину имплантата КмСПк+Кр ($\#p \leq 0,05$) (График 4.6а).

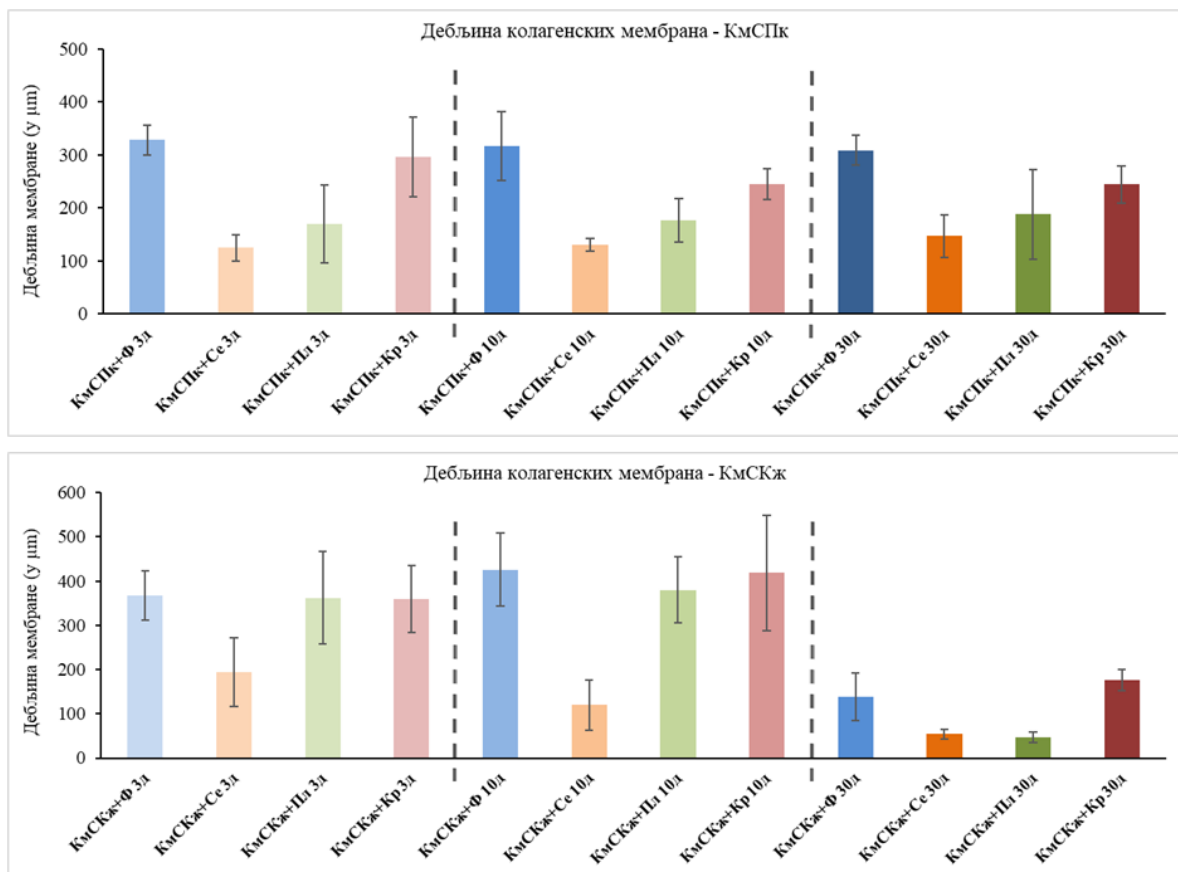


График 4.8. Резултати хистоморфометријске анализе дебљине имплантата; резултати су представљени као аритметичка средина \pm СД.

Хистоморфометријском анализом дебљине имплантата уочен је пораст дебљине имплантата КмСКж+Ф на термину од десет дана у односу на измерене вредности три дана након имплантације и тај пораст није био статистички значајан. Међутим, до тридесет дана након имплантације се одиграла унапредовала ресорпција, па су вредности за дебљину имплантата КмСКж+Ф на термину од тридесет дана биле статистички значајно мање у

односу на измерене вредности на терминима од три дана ($**p \leq 0,01$) и десет дана ($**p \leq 0,01$) након имплантације. Хистоморфометријском анализом дебљина имплантата КмСКж+Се није нађена интраиндивидуална статистичка значајност компарацијом вредности за дебљину имплантата КмСКж+Се три, десет и тридесет дана након имплантације, иако је дошло до видљиве редукције њене дебљине и ресорпције имплантата до последњег термина. Вредности дебљине имплантата КмСКж+Пл су статистички значајно мање на термину од тридесет дана у односу на добијене вредности на терминима од три дана након имплантацији ($**p \leq 0,01$) и десет дана по имплантацији ($**p \leq 0,01$). Овај тренд статистички значајне редукције дебљине имплантата је нађен и анализом имплантата КмСКж+Кр, када је измерено статистички значајно смањење дебљине имплантата на последњем термину у односу на три дана након имплантације ($*p \leq 0,05$) и десет дана након имплантације ($*p \leq 0,05$) (График 4.66).

Три дана након имплантације је детектована најмања дебљина мембране имплантата КмСКж+Се, са статистичком значајношћу у односу на имплантате КмСКж+Ф ($**p \leq 0,01$) и имплантате КмСКж+Кр ($**p \leq 0,01$). Није било интериндивидуално статистички значајних разлика у компарацији са осталим групама на овом термину (График 4.66).

На термину од десет дана након имплантације, дебљина имплантата КмСКж+Се је статистички значајно смањена у односу на термин од три дана, што није запажено у преостале три експерименталне групе овог кластера за статистичку анализу. Интериндивидуална статистичка разлика је нађена у компарацији добијених вредности за дебљину имплантата КмСКж+Се која је измерена као најмања у овом кластеру за статистичку анализу, у односу на имплантате КмСКж+Ф ($***p \leq 0,001$), КмСКж+Пл ($***p \leq 0,001$) и КмСКж+Кр ($*p \leq 0,05$) (График 4.66).

На термину од тридесет дана након имплантације, статистички значајна интериндивидуална разлика у вредностима добијеним за дебљину имплантата детектована компарацијом КмСКж+Се имплантата у односу на имплантате КмСКж+Кр ($*p \leq 0,05$) и КмСКж+Пл имплантата у односу на КмСКж+Кр имплантата ($*p \leq 0,05$) (График 4.66).

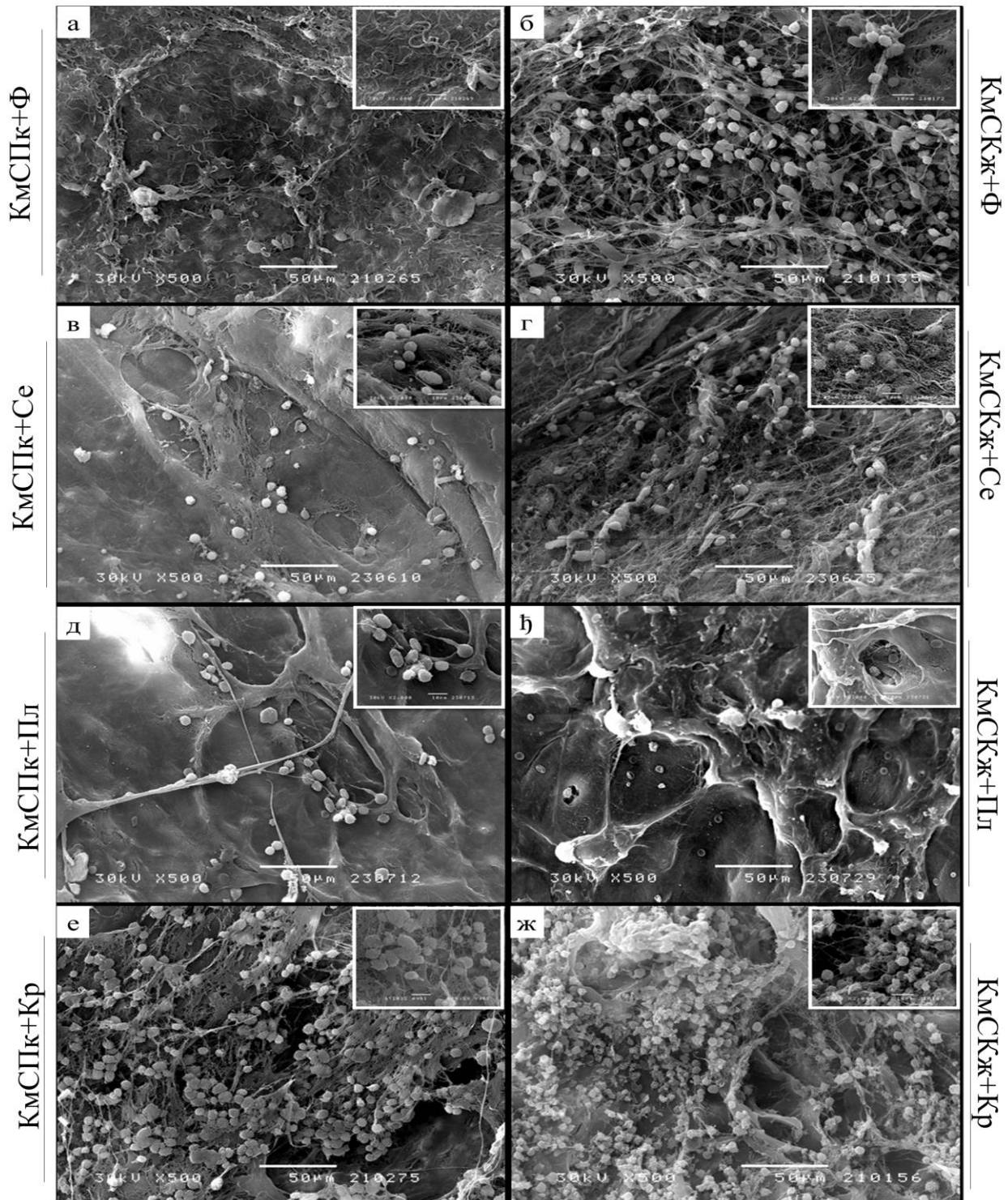
4.5.4. СЕМ анализа имплантата и околног поткожног ткива миша

Компаративна СЕМ анализа имплантата КмСПк+Ф, КмСПк+Се, КмСПк+Пл, КмСПк+Кр, као и КмСКж+Ф, КмСКж+Се, КмСКж+Пл и КмСКж+Кр три, десет и тридесет дана након супкутане имплантације мишу у оквиру Студије 5 је приказана на Сликама 4.43 – 4.48.

4.5.4.1. СЕМ анализа површине имплантата три дана након имплантације

Након три дана од имплантације може се запазити присуство густе мешовите ћелијске популације на површинском слоју имплантата, на страни према поткожном ткиву у групама КмСПк+Ф (Слика 4.43а), КмСКж+Ф (Слика 4.43б), КмСКж+Се (Слика 4.43г), КмСПк+Кр (Слика 4.43е) и КмСКж+Кр (Слика 4.43ж). Међу ћелијама доминира присуство макрофага, лимфоцита и фибробласта уз наглашену продукцију колагенских влакана, која држи ћелије на површини имплантата КмСКж+Ф (Слика 4.43б) и КмСПк+Кр (Слика 4.43). Еритроцити се уочавају у већем броју на површини имплантата КмСПк+Кр (Слика 4.43е). Мање ћелија и спорадична колагенска влакна су уочена на површини имплантата КмСПк+Се (Слика 4.43в), КмСПк+Пл (Слика 4.43д) и КмСКж+Пл (Слика 4.43ђ). Анализом СЕМ микрографија имплантата КмСПк+Ф (Слика 4.43а) уочава се већа инфилтрација ћелија у површинске слојеве имплантата, док су на површини имплантата КмСКж+Кр ћелије углавном орјентисане на површини уврата колагенског имплантата у виду већих или мањих групација, док су шупљине - поре имплантата сиромашније ћелијама (Слика 4.43ж).

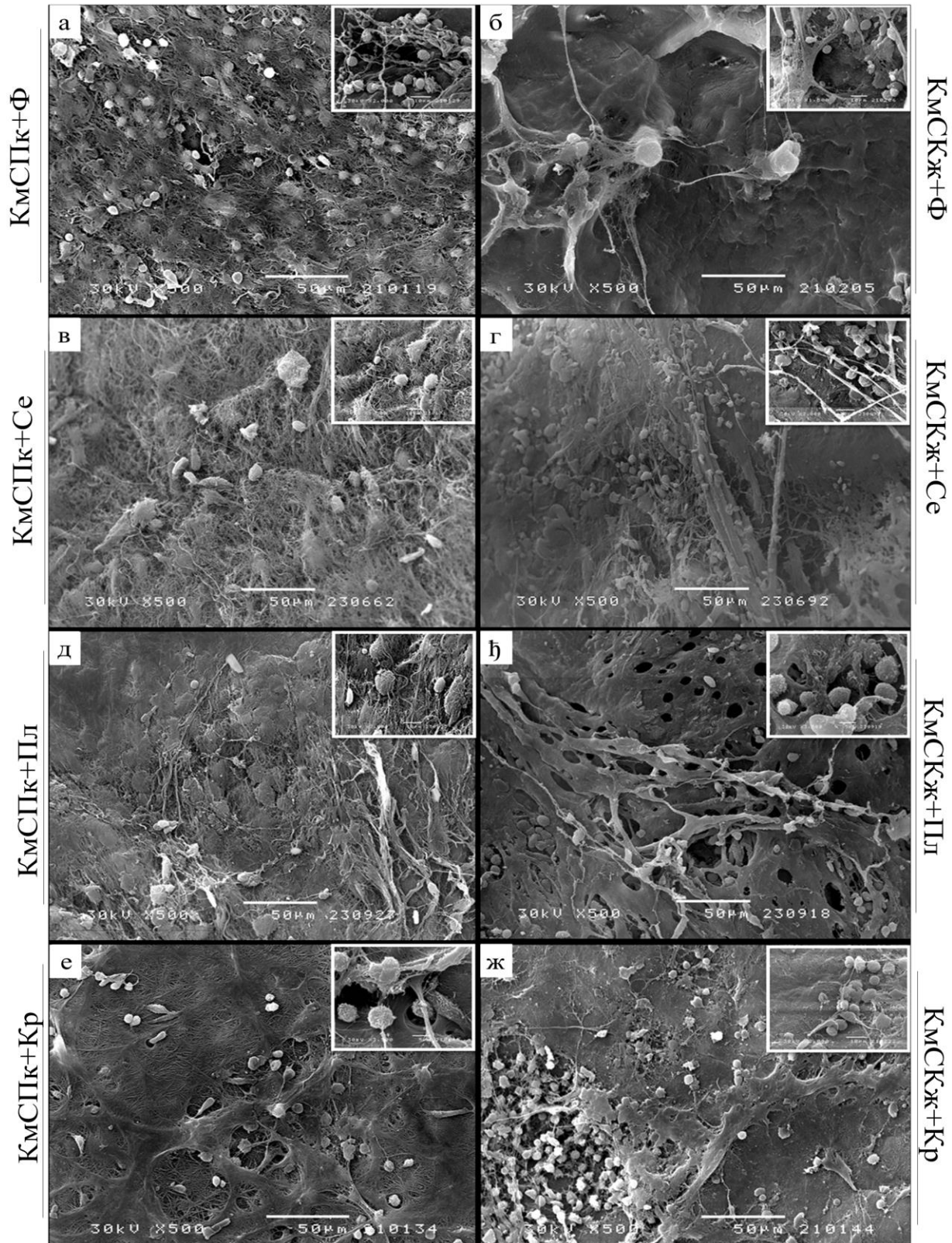
3 дана након имплантације



Слика 4.43. СЕМ микрографије имплантата КмСПк+Φ (а), КмСКж+Φ (б), КмСПк+Се (в), КмСКж+Се (г), КмСПк+Пл (д), КмСКж+Пл (ђ), КмСПк+Кр (е) и КмСКж+Кр (ж) три дана након супкутане имплантације мишу, на страни према поткожном ткиву. Увећање 500х. Скала показује 50 μм.

Након три дана од имплантације могу се запазити бројне ћелије које су продрле у површински слој имплантата КмСПк+Ф (Слика 4.44а), КмСКж+Пл (Слика 4.44ђ) и КмСПк+Кр (Слика 4.44е) на страни имплантата која је орјентисана према кожи. Изражена продукција колагена је запажена на површини имплантата КмСПк+Се (Слика 4.44), КмСПк+Пл (Слика 4.44д) и КмСПк+Кр (Слика 4.44е), при чему се на имплантатима КмСПк+Кр запажа и присуство фибринских влакана у чијој мрежи су уплетене ћелије различите морфологије, са доминацијом макрофага или фибробласта (Слика 4.44е). У мањем броју се уочавају расути макрофаги и лимфоцити ухваћени у колагенску мрежу продуковану од стране спорадично присутних фибробласта на површини имплантата КмСКж+Ф (Слика 4.44б), КмСКж+Се (Слика 4.44в) и КмСКж+Пл (Слика 4.44г). Унутар удубљења имплантата КмСКж+Кр примећује се велики број груписаних ћелија, док је глатки део површине имплантата КмСКж+Кр сиромашан ћелијама (Слика 4.44ж).

3 дана након имплантације

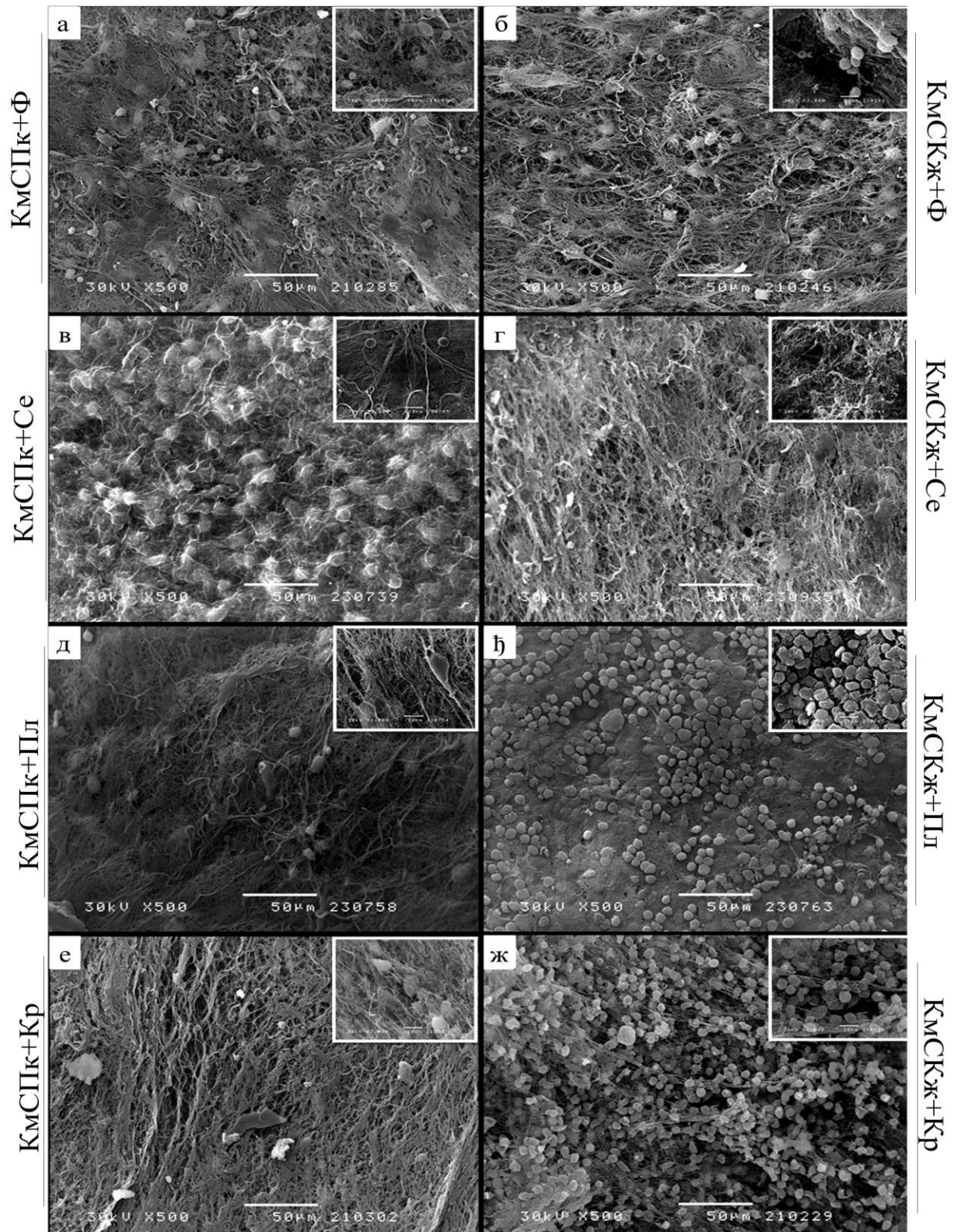


Слика 4.44. СЕМ микрографије имплантата КмСПк+Ф (а), КмСКж+Ф (б), КмСПк+Се (в), КмСКж+Се (г), КмСПк+Пл (д), КмСКж+Пл (ж), КмСПк+Кр (е) и КмСКж+Кр (ж) три дана након супкутане имплантације мишу, на страни према кожи. Увећање 500х. Скала показује 50 µм.

4.5.4.2. СЕМ анализа површине имплантата десет дана након имплантације

На површини имплантата КмСПк+Ф (Слика 4.45а), КмСКж+Ф (Слика 4.45б), КмСКж+Пл (Слика 4.45ђ) и КмСКж+Кр (Слика 4.45ж), на страни према поткожном ткиву се уочавају макрофаги и фибробласти који леже између и унутар мреже, вероватно, новосинтетисаних колагенских влакана, док се на површини те мреже налазе и еритроцити, што указује на присуство неоваскуларизације у овим имплантатима. На површини имплантата КмСПк+Кр (Слика 4.45е) и КмСКж+Се (Слика 4.45г) се не уочава присуство ћелија у великом броју и на СЕМ микрографији доминира густа мрежа колагенских влакана, што може бити услед прекривања ћелија новосинтетисаним колагеном, али и због инфилтрације ћелија у дубље слојеве имплантата. Нешто мања продукција колагенских влакана се запажа на површини имплантата КмСПк+Се (Слика 4.45в), готово потпуно одсуство колагенских влакана се запажа на површини имплантата КмСКж+Пл (Слика 4.45ђ) где доминира присуство ћелија моноцитно-макрофагне популације. На површини имплантата КмСКж+Кр (Слика 4.45ж) се запажа присуство густе мреже колагенских и фибринских влакана која прави танак омот на површини колагенског импланта и поравњава прелаз између пора и уврата имплантата, где су начичкане ћелије макрофага, лимфоцита и фибробласта, присутне појединачно, али и груписане у гроздасте скупине или ланчане низове.

10 дана након имплантације

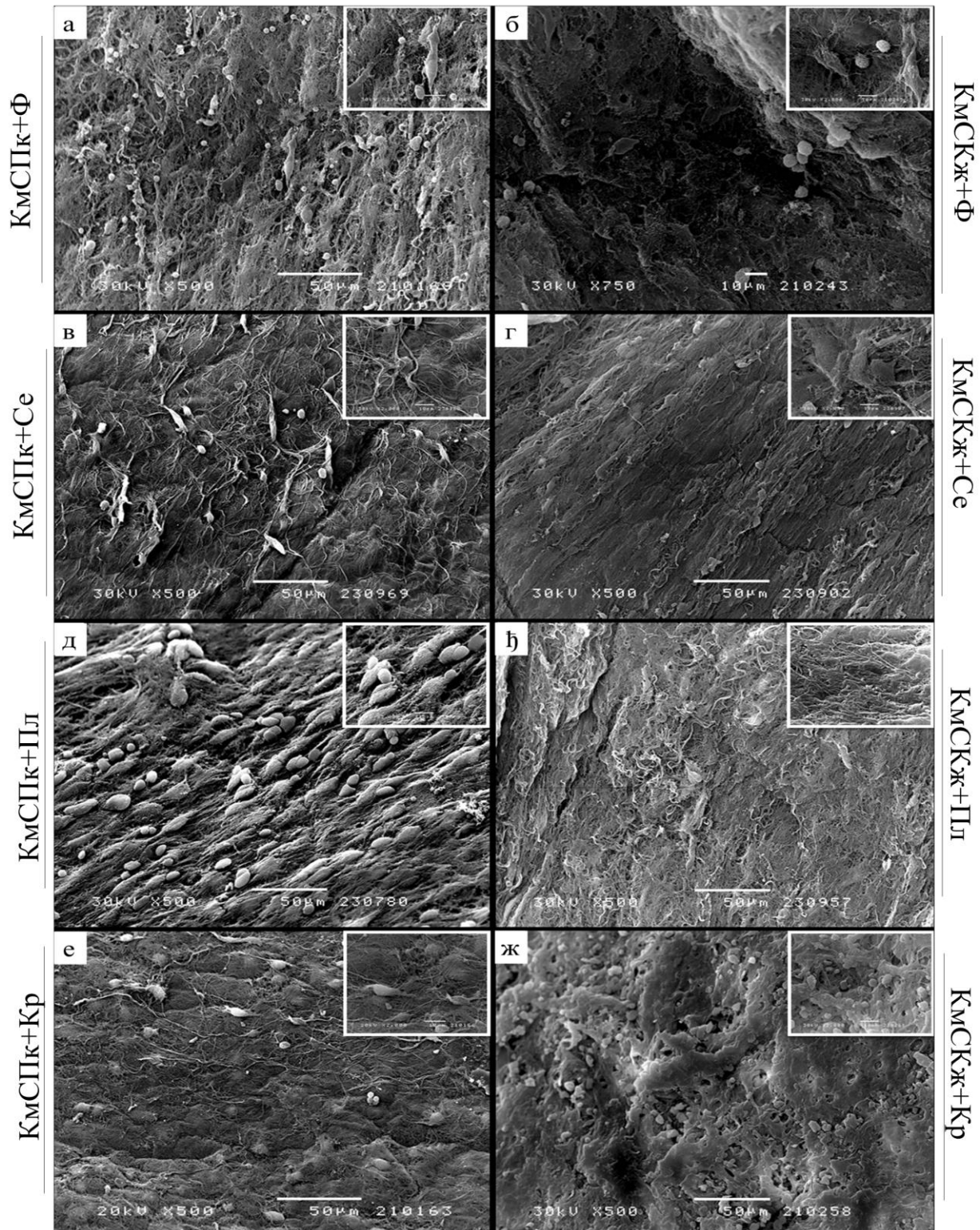


Слика 4.45. СЕМ микрографије имплантата КмСПк+Ф (а), КмСКж+Ф (б), КмСПк+Се (в), КмСКж+Се (г), КмСПк+Пл (д), КмСКж+Пл (ђ), КмСПк+Кр (е) и КмСКж+Кр (ж) десет дана након супкутане имплантације мишу, на страни према поткожном ткиву. Увећање 500х. Скала показује 50 μм.

На површини имплантата КмСПк+Ф (Слика 4.46а), КмСКж+Се (Слика 4.46г), КмСПк+Пл (Слика 4.46д), КмСКж+Пл (Слика 4.46ђ) и КмСПк+Кр (Слика 4.46е), на страни према кожи се уочава присуство колагенских влакана која су орјентисана у паралелним равнима, а не у виду мреже разгранате у свим смеровима. Збијене снопове колагенских влакана прожимају, у већој или мањој мери, крупни фибробласти, који се у највећем броју запажају на површини групе имплантата КмСПк+Пл (Слика 4.46д). Среће се спорадично присуство и ћелија имунског система - макрофага, лимфоцита, али и еритроцита, чије присуство указује на неоваскуларизацију. На површини имплантата КмСКж+Ф (Слика 4.46б) се запажа смањена активност фибробласта и синтеза колагена у односу на друге имплантате.

На површини имплантата КмСКж+Кр се уочава велика регија са наслагама колагенских влакана, испод којих извире велики број ћелија различите морфологије (Слика 4.46ж). Стиче се утисак да ове ћелије нису продрле дубоко у имплантат, али да је продукција колагена била довољно велика да их покрије на одређеним местима (Слика 4.46ж).

10 дана након имплантације



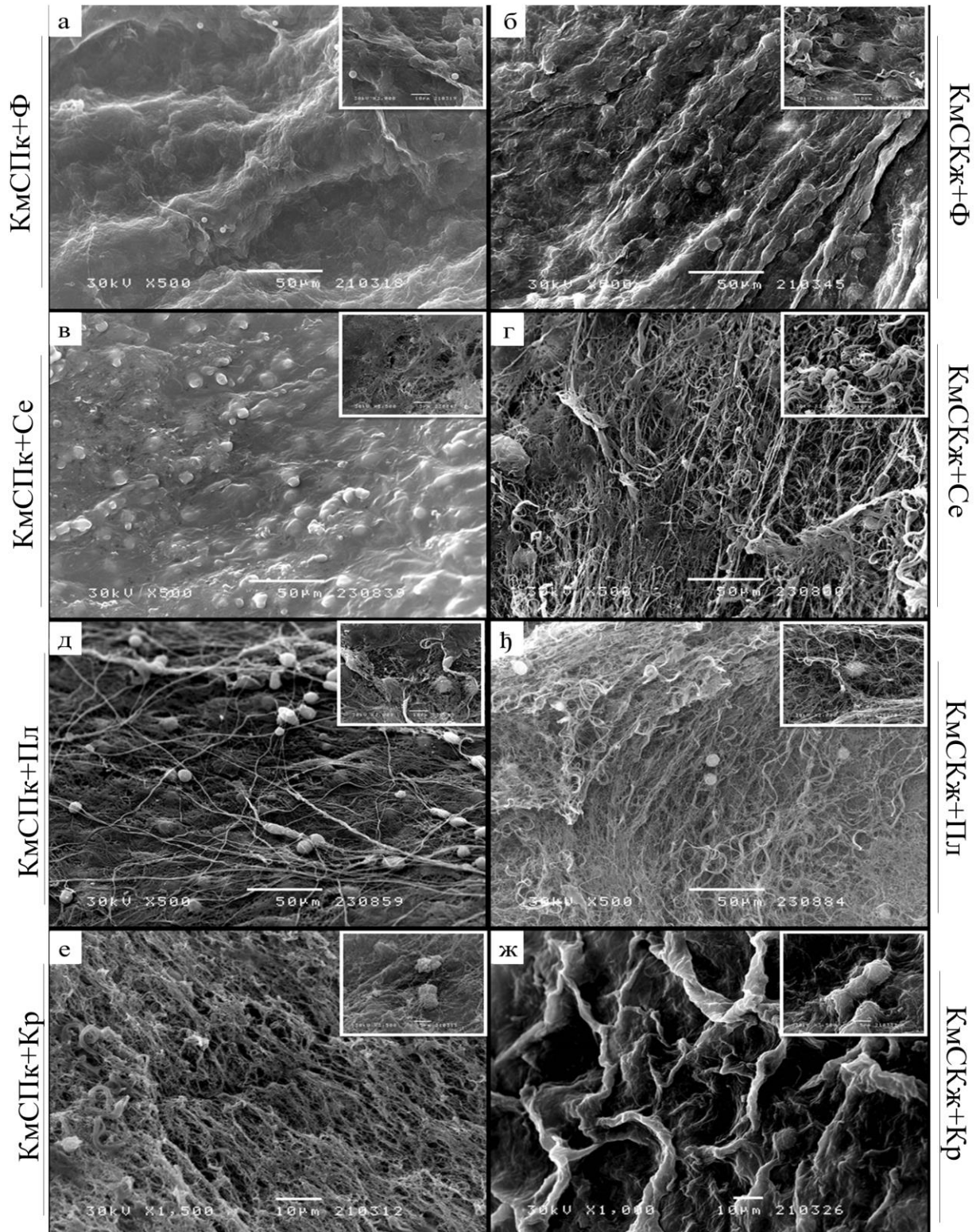
Слика 4.46. СЕМ микрографије имплантата КмСПк+Ф (а), КмСКж+Ф (б), КмСПк+Се (в), КмСКж+Се (г), КмСПк+Пл (д), КмСКж+Пл (ђ), КмСПк+Кр (е) и КмСКж+Кр (ж) десет дана након супкутане имплантације мишу, на страни према кожи. Увећања 500х (а, в-ж) и 750х (б). Скала показује 50 µм (а, в-ж) и 10 µм (б).

4.5.4.3. СЕМ анализа површине имплантата тридесет дана након имплантације

На површини имплантата КмСПк+Ф (Слика 4.47а) и КмСКж+Кр (Слика 4.47ж) на страни према поткожном ткиву тридесет дана након имплантације се види дебео слој новосинтетисаних колагенских снопова који су формирали неравну површину са наборима и улегнућима. Све ћелије су до овог термина инфилтрирале у унутрашњост импланта и не уочавају се на површини, тек се може видети по нека назнака присуства ћелија испод омотача од колагенских снопова. Дебео слој колагенских снопова уочава се и на површини имплантата КмСКж+Ф (Слика 4.47б) и имплантата КмСПк+Се (Слика 4.47в), али са местимично присутним ћелијама на површини.

Анализом СЕМ микрографија имплантата КмСКж+Се (Слика 4.47в), КмСПк+Пл (Слика 4.47д), КмСКж+Пл (Слика 4.47ђ) и КмСПк+Кр (Слика 4.47е) уочава се присуство густе и растресите мреже колагенских влакана, која се нису спојила у дебеле и наслагане колагенске снопове, због чега се може претпоставити да је још увек активан процес продукције колагена од стране фибробласта, чија је активност лепо изражена на површини имплантата КмСПк+Пл (Слика 4.47д). На површини имплантата КмСКж+Кр (Слика 4.47ж) уочавају се јасни уврати имплантата без ћелија, које су, вероватно, до овог термина инфилтрирале дубоко у имплантат, па се не могу видети ни у порамима имплантата.

30 дана након имплантације



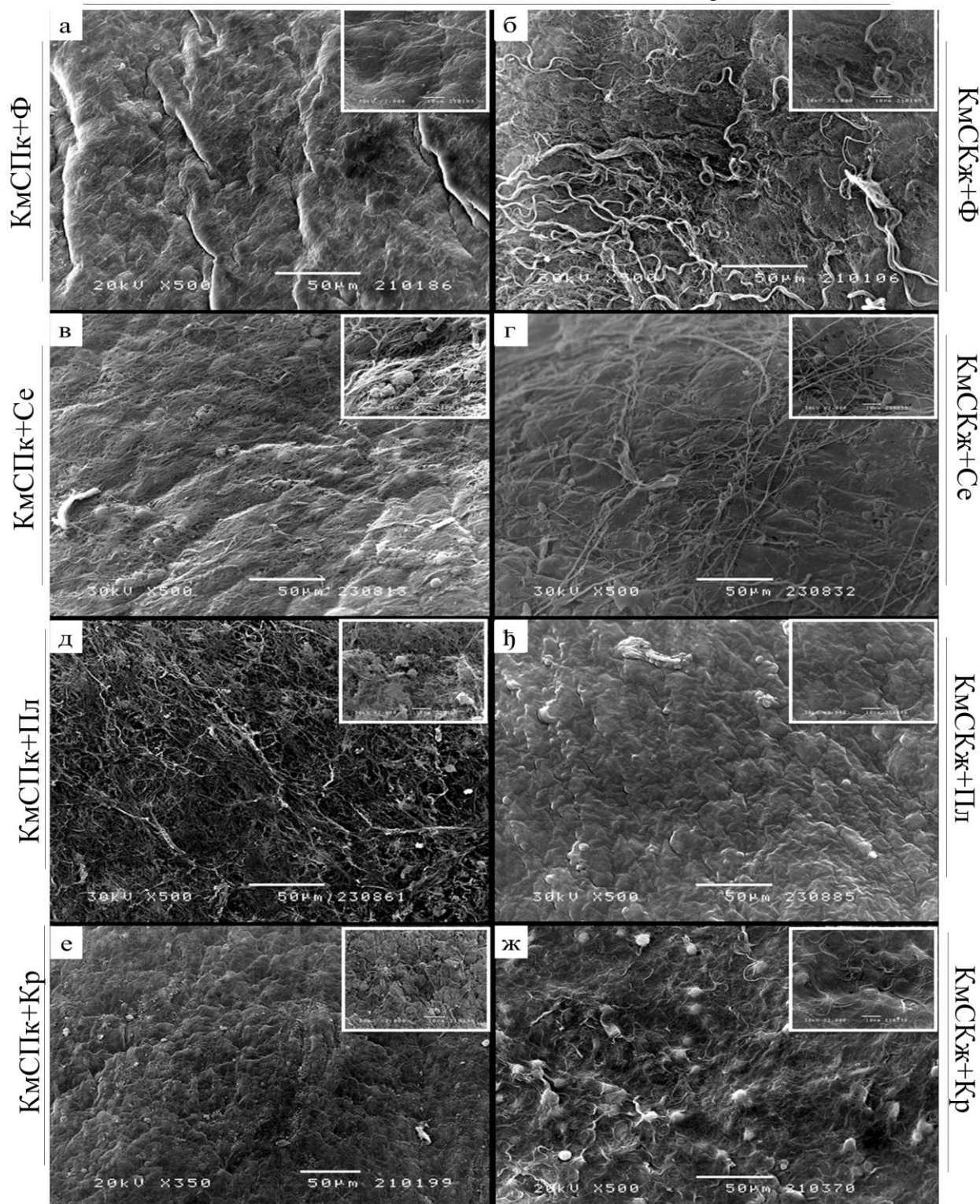
Слика 4.47. СЕМ микрографије имплантата КмСПк+Ф (а), КмСКж+Ф (б), КмСПк+Се (в), КмСКж+Се (г), КмСПк+Пл (д), КмСКж+Пл (ђ), КмСПк+Кр (е) и КмСКж+Кр (ж) тридесет дана након супкутане имплантације мишу, на страни према поткожном ткиву. Увећања 500x (а-ђ), 1500x (е) и 1000x (ж). Скала показује 50 µм (а-ђ) и 10 µм (е, ж).

На површини имплантата КмСПк+Ф (Слика 4.48а) на страни према кожи наслућује се присуство ћелија испод наслага колагена, које формирају танке уврте. Ова слика указује да се до тридесет дана након имплантације дешавала интензивна синтеза колагена упоредо са инфилтрацијом ћелија у колагенски имплантат. Дебеле насlage колагена уочавају се и на површини имплантата КмСПк+Се (Слика 4.48в), КмСКж+Се (Слика 4.48г), КмСКж+Пл (Слика 4.48ђ) и КмСПк+Кр (Слика 4.48е). На површини имплантата КмСПк+Кр уочава се присуство појединачних ћелија, али и груписаних у удубљењима имплантата (Слика 4.48е).

На површини имплантата КмСКж+Ф (Слика 4.48б) и имплантата КмСПк+Пл (Слика 4.48д) се уочава присуство великог броја насумично распоређених колагенских влаканаца, оријентисаних у свим правцима, без присутних ћелија. Ова густа мрежа танких колагенских влакана указује на присуство фибробласта унутар површинских слојева имплантата, који активно продукују колаген у нивоу изнад њих.

СЕМ анализом имплантата КмСКж+Кр (Слика 4.48ж) запажа се спорадично присуство ћелија кружног облика, вероватно ћелија имунског одговора, у првом реду макрофага са узгредно присутним фибробластима који активно синтетишу колагенска влакна.

30 дана након имплантације



Слика 4.48. СЕМ микрографије имплантата К_мСПк+Ф (а), К_мСКж+Ф (б), К_мСПк+Се (в), К_мСКж+Се (г), К_мСПк+Пл (д), К_мСКж+Пл (ђ), К_мСПк+Кр (е) и К_мСКж+Кр (ж) тридесет дана након супкутане имплантације мишу, на страни према кожи. Увећања 500х (а-ђ, ж) и 350х (е). Скала показује 50 μм (а-ж).

4.6. СТУДИЈА 6: Испитивање остеорепарационог потенцијала колагенских мембрана у комбинацији са гранулираним коштанним заменицима на ортотопичном моделу имплантације кунићу

4.6.1. Стање животиња и изглед тибија током експеримента

Све животиње су добро поднеле хируршке интервенције и постоперативни опоравак без ординације антибиотика. Није запажена промена у телесној маси, нити у понашању кунића у терминима од десет, тридесет и деведесет дана по извођењу хируршке интервенције.

Табела 1. Уочени параметри на тибијама кунића током експерименталног периода

Посматрани параметар / термин	ХуКз+ КмСПк	СиКз+ КмСПк	ХуКз+ КмСПк	СиКз+ КмСПк	ХуКз+ КмСПк	СиКз+ КмСПк
	10 дана		30 дана		90 дана	
Без знакова инфламације	2	3	5	7	5	5
Већи оток	10	9	3	1	0	0
Мањи оток	3	3	2	2	0	0
Црвенило	3	3	0	0	0	0
Гној	2	1	1	0	0	0
Влажна рана	3	3	0	0	0	0
Отворена рана	2	2	0	0	0	0

4.6.2. Анализа макроскопског изгледа тибија испод коже

Након десет дана од имплантације се уочава присуство већих или мањих хематома и отока у оквиру места имплантације на тибијама обе експерименталне групе. Изглед тибија је приказан на Сликама 4.49-4.59.

У оквиру групе имплантата ХуКз+ КмСПк којима су испуњене леве тибије кунића се запажа присуство већих и мањих хематома и отока на местима испуњених дефеката. На левој тибији животиње бр. 1 се запажа присуство мањег едема и делимично ресорбованог хематома (Слика 4.49а), док се на тибији животиње бр. 2 може уочити да је површина дефеката који је испуњен имплантатом ХуКз+ КмСПк неприметно виша од нивоа околне кости (Слика 4.49в) уз присуство малог хематома. Велики хематоми и едеми су детектовани

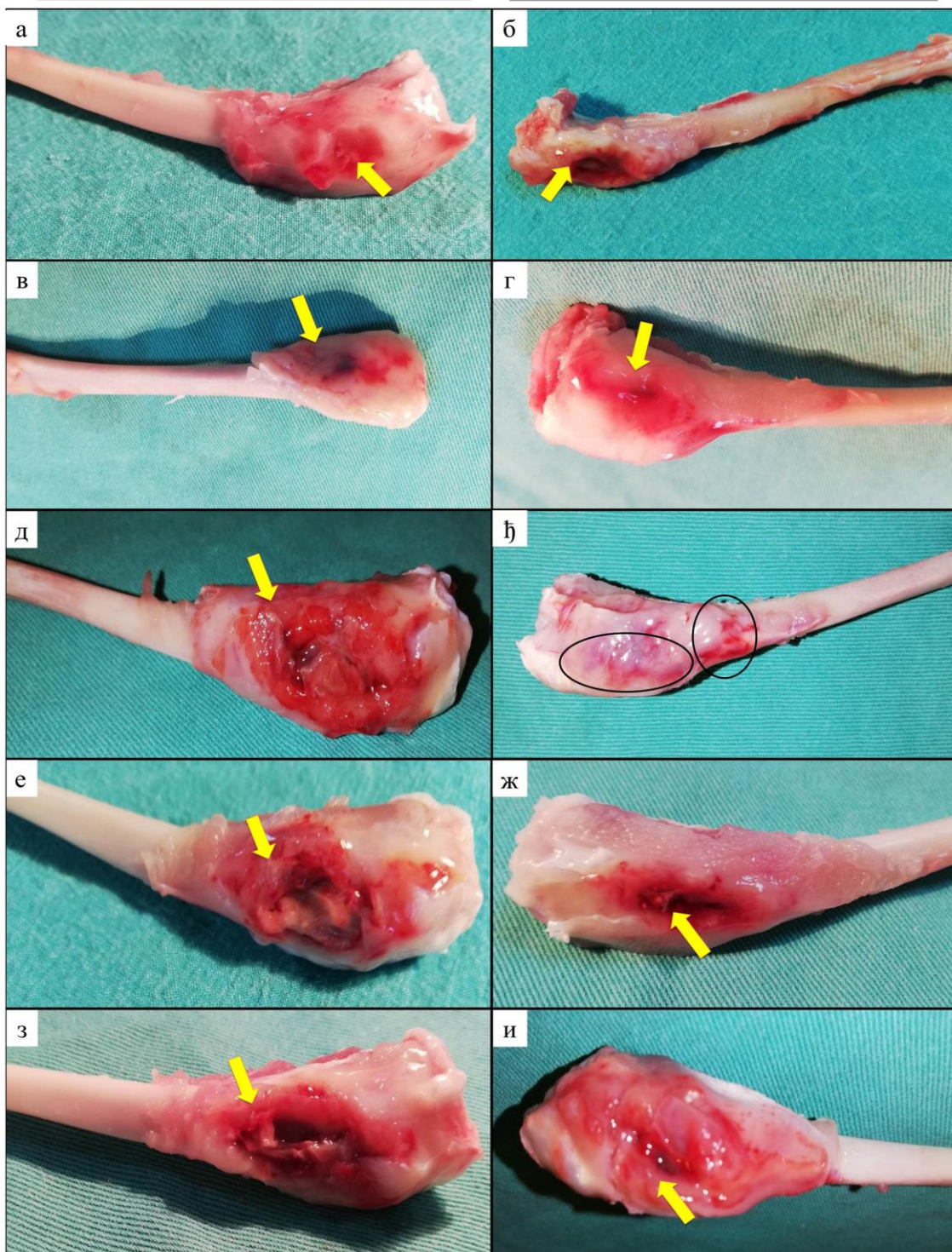
на месту дефеката три тибије (Слика 4.49д, е, з). Кожа је на овим тибијама била чврсто срасла са везивним ткивом испод и била је тешко одвојива. Уз пажљиву дисекцију хируршким скалпелом, део садржаја отока и хематома се ослободио изнад периоста. У присутним флуидима је било могуће детектовати крв и остатке згрушене крви, сукрвицу, али није било знакова густог жутог гноја који би указивали на присуство инфекције (Слика 4.49д, е, з). Колагенска мембрана је као део имплантата била видљива непосредно испод периоста без запажања редукције у њеној величини.

У оквиру групе имплантата СиКз+КмСПк којима су испуњене десне тибије кунџа се, такође, запажа присуство хематома и едема, али мањих у односу на групу дефекте испуњене имплантатима ХуКз+ КмСПк. На десној тибији животиње бр. 1 се запажа удубљење на месту дефекта, вероватно узроковано изливањем садржаја хематома током експлантације тибије (Слика 4.49б). Изглед десне тибије животиње бр. 2 показује ресорпцију хематома уз присутан мали едем (Слика 4.49г), док се на десној тибији животиње бр. 3 уочавају расута хеморагична поља на месту дефекта који није покривен едемом (Слика 4.49ђ). На тибијама животиња бр. 4 и 5 се уочава присуство хематома без отока (Слика 4.49ж) или уз оток (Слика 4.49и).

10 дана након имплантације

ХуКз+ КмСПк

СиКз+КмСПк



Слика 4.49. Пример макроскопског изгледа тибија десет дана након имплантације. Лева (а) и десна тибија (б) животиње 1, лева (в) и десна тибија (г) животиње 2, лева (д) и десна тибија (ђ) животиње 3, лева (е) и десна тибија (ж) животиње 4. и лева (з) и десна тибија (и) животиње 5. Жуте стрелице показују присуство хематома, а елипсоидна форма присуство хеморагичних поља.

Тибије након тридесет дана од имплантације показују изглед зараслих дефеката, са местимично присутним хематомом или хеморагичним пољима. Зарасли дефекти у тибијама обе експерименталне групе се уочавају као ружичасто-беле структуре са спорадично расутим гранулама правилног облика, што највероватније указује на грануле биоматеријала.

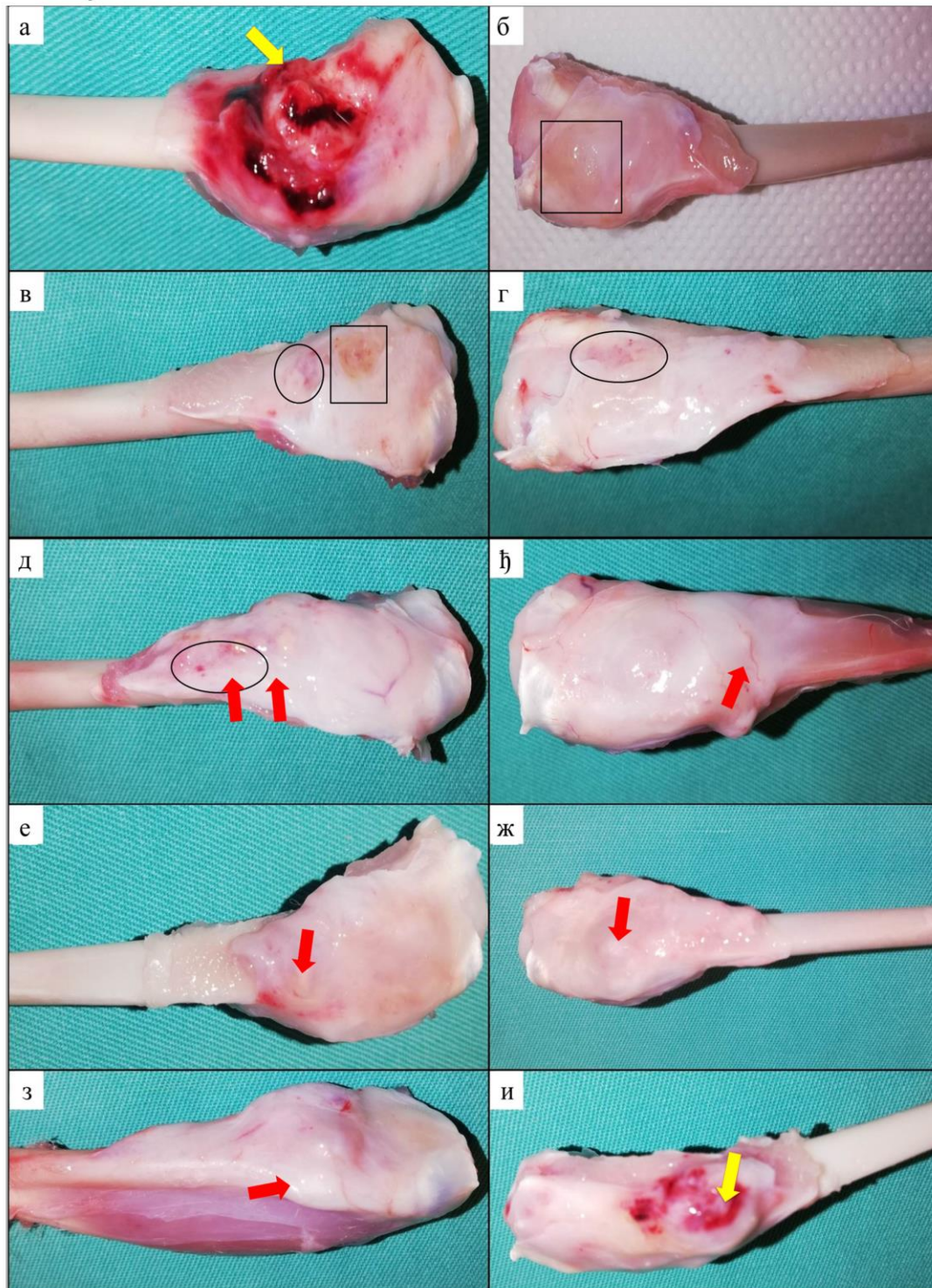
На тибији животиње бр. 1 из ХуКз+ КмСПк групе се уочава присуство великог хематома који је крварио током експлантације (Слика 4.50а). Веома мале површине хеморагичних поља се уочавају на приказу тибија животиња бр. 2 и бр. 3 (Слика 4.50в,д), са присуством малог едема на месту дефекта тибије животиње бр. 2 (Слика 4.50в). Гранулирани материјал се уочава у виду правилно дефинисаних куглица на месту дефеката испод периоста код животиње бр. 3, 4 и 5 (Слика 4.50д,е,з). Код скоро свих тибија (изузев тибије животиње бр. 1) се примећује веома блага избоченост дефекта изнад нивоа околне кости, не као последица едема, већ као последица испуњености дефекта имплантатима.

На приказу дефеката тибија животиња бр. 1 и 2 из групе СиКз+КмСПк се не уочава присуство гранула коштаног заменика, али се уочава присуство малог едема на тибији животиње бр. 1 (Слика 4.50б) и расутих хеморагичних поља на тибији животиње бр. 2 (Слика 4.50г). Грануле коштаног заменика се уочавају расуте око дефеката тибија животиња бр. 3 и 4, без присутних хематома и едема (Слика 4.50ђ,ж). Присуство већег хематома је запажено на тибији животиње бр. 5 (Слика 4.50и).

30 дана након имплантације

ХуКз+ КмСПк

СиКз+КмСПк



Слика 4.50. Пример макроскопског изгледа тибија тридесет дана након имплантације. Лева (а) и десна тибија (б) животиње 1, лева (в) и десна тибија (г) животиње 2, лева (д) и десна тибија (ђ) животиње 3, лева (е) и десна тибија (ж) животиње 4. и лева (з) и десна тибија (и) животиње 5. Жуте стрелице показују присуство хематома, а црвене стрелице показују

грануле коштаног заменика. Елипса показује присуство хеморагичних поља, а поља овичена квадратима присуство малих едема.

Након деведесет дана од имплантације на тибијама се уочавају зарасли дефекти, са спорадично присутним малим зонама хеморагије. Гранулирани облик коштаног заменика се уочава код мањег броја животиња и у мање јасној мери у односу на термин од тридесет дана након имплантације.

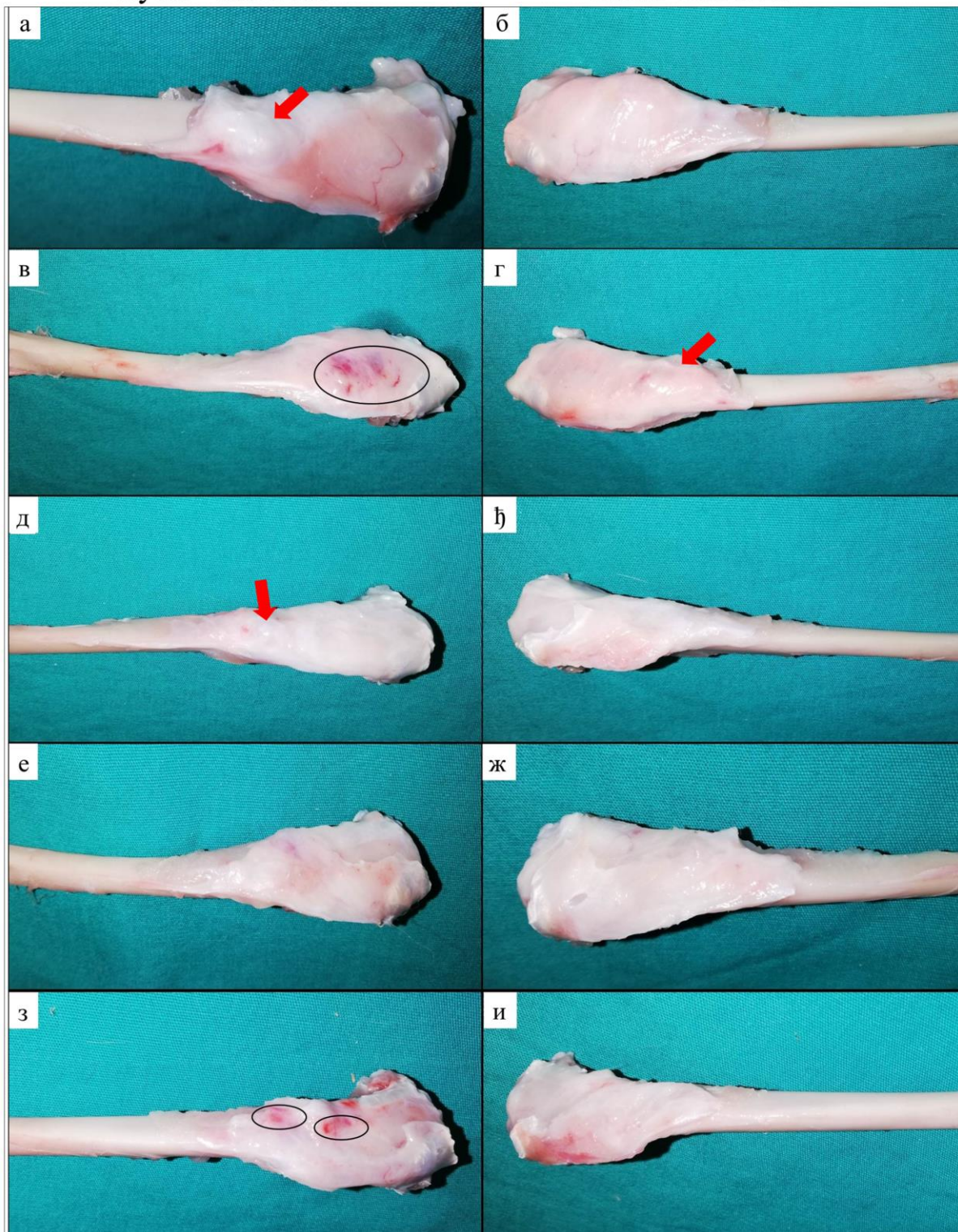
У групи ХуКз+ КмСПк се могао уочити гранулирани коштаног заменика на тибијама две животиње: бр.1 и бр. 3 (Слика 4.51а,д), док се на тибији животиње бр. 4 није видео гранулирани материјал, као ни оток или хематом (Слика 4.51е). Код тибија ове три животиње је место дефекта било скоро у истој равни са околном кости, издигнуто само на месту уочавања гранулираног материјала, што указује на потпуно зарастање дефеката. Код животиња бр. 2 и 5 се на месту дефеката тибије запажају се веома мале хеморагичне зоне (Слика 4.51в,з).

Макроскопски изглед тибија групе СиКз+КмСПк узаује на потпуно репарираних дефекте. Површина места дефеката је скоро у истој равни као и околна кост. Гранулирани материјал се назире само на месту дефекта тибије животиње бр. 2 (Слика 4.51г), док се код других не примећује постојање гранулираног материјала или било каква промена у односу на околну кост испод периоста.

90 дана након имплантације

ХуКз+ КмСПк

СиКз+КмСПк



Слика 4.51. Пример макроскопског изгледа тибија испод коже деведест дана након имплантације. Лева (а) и десна тибија (б) животиње 1, лева (в) и десна тибија (г) животиње 2, лева (д) и десна тибија (ђ) животиње 3, лева (е) и десна тибија (ж) животиње 4. и лева (з) и десна тибија (и) животиње 5. Црвене стрелице показују грануле коштаног заменика, а елипса показује присуство хеморагичних поља.



5. ДИСКУСИЈА

6. ДИСКУСИЈА

Вођена регенерација ткива (енг. *guided tissue regeneration* - *GTR*) захтева добру интеграцију биоматеријала са околним периимплантираним ткивом и иницијацију регенерације од стране биоматеријала. Биоматеријали на бази колагена представљају класу биоматеријала чија је продукција у развоју и који могу да одговоре на захтеве *GTR*. Колагенски биоматеријали имају велику улогу у максиларној и оралној хирургији, али и инжењерству меких ткива. Биоматеријали на бази колагена могу да индукују хемотаксију, адхезију, ангиогенезу и могу зауставити урастање периимплантираног ткива у коштани дефект (*Bottino* и сар., 2012; *Meier* и сар., 2019; *Toledano* и сар., 2020a). Разградњу колагенских биоматеријала узрокују ензими колагеназе металопроотеиназе матрикса (енг. *matrix metalloproteinases* - *MMPs*), које се могу ослободити из активираних полиморфонуклеарних леукоцита, фибробласта и ћелија мононуклеарног система фагоцита (*Ghanaati* и сар., 2012; *Willershausen* и сар., 2004; *Toledano* и сар., 2020a). Постоји пуно комерцијално доступних колагенских мембрана хетерологног порекла, са разликама у физичко-хемијским карактеристикама, испитиваним у различитим студијама *in vitro* и на различитим животињским моделима имплантације (*Bottino* и сар., 2012; *Meier* и сар., 2019).

Један од битних параметара за дефинисање потенцијалне примене колагенских биоматеријала, јесте њихова постојаност, односно очекивано време ресорпције у ткиву. Постојаност колагенских биоматеријала се продужава повећањем њихове стабилности различитим модификацијама, додавањем различитих агенаса, хемијским, физичким или биолошким путем, чиме се иницира стварање попречних веза између колагених валакана, при чему се мора имати на уму намена биоматеријала и у складу са клиничким потребама тежити ка постизању жељеног времена биоресорпције. Подаци из литературе наводе да је жељено време ресорпције колагенских мембрана *in vivo* између четири недеље и неколико месеци, што зависи од клиничког циља који треба постићи (*Bottino* и сар., 2012). Иако је модификација сисарског колагена установљен метод производње (*Rothamel* и сар., 2005), овај процес неретко доводи до интензивнијег имунског одговора ткива са нежељеним реакцијама, зависно од агенаса и процеса коришћених за модификацију (*De Castro Brás* и сар., 2010; *Delgado* и сар., 2015). С друге стране, недостатак у клиничкој примени нативног колагена је брза биоресорпција посредством ензима, макрофага и полиморфонуклеарних леукоцита, услед чега се може нарушити ткивна интеграција и жељени исход клиничког циља.

Поред тога што је употреба колагенских биоматеријала у експанзији, постоји неколико питања на која се треба одговорити. У литературним подацима није употпуности објашњена повезаност између порекла колагена, која у великој мери условљава структуру и главне физичко-хемијске особине колагенских биоматеријала и времена биоресорпције колагенских биоматеријала и изазвану ткивну реакцију. Такође, нема јасних дефиниција о модификацији утицаја колагенских биоматеријала на ткивни одговор у различитим анималним моделима, применом различитих ткивноинжењерских приступа. У актуелним истраживањима постоји успостављена шема примене анималних модела за испитивање свих биоматеријала, па тако и колагенских, али често недостаје сумарни заључак посматрања једног биоматеријала на више различитих модела, или компарација колагенских биоматеријала са додатком различитих крвних деривата, што би представљало имитацију клиничких услова примене. *Bozkurt* и сарадници наводе да је из бројних студија тешко дефинисати јединствене закључке о биоресорпцији и биокомпатибилности колагенских мембрана, наводећи да је у литератури из различитих студија забележено различито време биоресорпције исте колагенске мембране свињског порекла. Указао је на важност директног поређења различитих колагених мембрана, у истој студији и на истом животињском моделу, као и применом истог хируршког поступка (*Bozkurt* и сар., 2014; *Radenković Stošić* и сар., 2024). Због наведеног, значај компаративне анализе резултата добијених имплантацијама на различитим моделима, може бити вишеструки и пружити одговоре на питања везана за место имплантације, начин имплантације, али и утицаја додатка крви и крвних деривата на биофункционалност колагенских имплантата.

5.1. ОСТЕОРЕПАРАЦИОНИ ПОТЕНЦИЈАЛ КОЛАГЕНСКИХ БИОМАТЕРИЈАЛА РАЗЛИЧИТОГ ПОРЕКЛА БЕЗ И СА ДОДАТКОМ КРВИ НА ОРТОТОПИЧНОМ МОДЕЛУ ИМПЛАНТАЦИЈЕ ПАЦОВУ

Порекло колагена, као и начин његове производње значајно утичу на његова својства, укључујући густину, тип и оријентацију колагенских влакана, због чега је важно анализирати одговор ткива на колагенске биоматеријале у зависности од њиховог порекла, односно врсте организма или ткива одакле је колаген изолован. Највећи извор колагенских мембрана за употребу у ткивном инжењерству је сисарског порекла, док је развој алтернативних метода у повоју (*Subhan* и сар., 2015). Сисарски колаген, као што су свињски и говеђи, представља најпопуларнији извор колагена за ткивно инжењерство због високе хомологије са хуманим колагеном (*Stover* и *Verrelli*, 2011). Заправо, говеђи колаген је најсличнији хуманом, након

чега следи коњски, због таксономске близине између коња и говеда са људима. Мала еволуционерна разлика и висока конзервација аминокиселинске секвенце колагена типа I међу кичмењацима чини сличност аминокиселинских секвенци колагена типа I код сисара до 95% (Gallo и сар., 2020). Међутим, услед високих трошкове производње и потенцијалног ризика преноса зооноза, коришћење сисарског колагена често изазива етичке или религијске дилеме. Примена коњског колагена у нешто мањој мери носи ризик од зооноза, и у литератури нису описане имунске реакције (Sparavigna и сар., 2017). С друге стране, колаген из океанских врста, као што су медузе, представља интересантну и лако доступну алтернативу. Осим што може допринети регенерацији ткива, употреба колагена из мора може имати и позитиван утицај на одржавање екосистема. Имајући у виду да пренамножавање медуза угрожава приморски туризам, коришћење њиховог колагена у медицини може имати вишеструке користи (Addad и сар., 2011; Hoyer и сар., 2014).

Процењује се да су медузе старе око 600 милиона година. Имају 29 *miRNK* секвенци (енг. *microRNA*), док је за колаген свиња и говеда изоловано око 400 *miRNK*. Аминокиселинска секвенца колагена медуза показује хомологију са сисарским колагенима типа I, II, III, V и IX, па се назива и колагеном „типа 0” (Flaig и сар., 2020), међутим поједини аутори га класификују и као архаични тип колагена који има највише сличности са колагеном типа I (Cheng и сар., 2017; Ren и сар., 2023).

Претходна испитивања су показала да колагенски скафолд пореклом из медузе служи као супериорнија матрица за култивацију ћелија микроглије пореклом од хуманих индукованих плурипотентних матичних ћелија (енг. *induced pluripotent stem cell lines - iPSCs*) ћелија у односу на колаген типа I репа пацова у тестовима адхезије, ћелијске вијабилности и есејима имуноцитохемије (Mearns-Spragg и сар., 2020). С друге стране, ћелије линије канцера јајника (енг. *ovarian cancer cell line OvCa*) испољиле су образац раста на подлози колагенског скафолда пореклом из *R. pulmo*, у виду појединачних или ћелија удружених у кластере, указујући на идентичну функционалност оваквих матрица са сисарским 3Д системима култивације (Paradiso и сар., 2019). *In vitro* студија је показала да ћелије линије фибробласта L929 показују значајно већу вијабилност и пролиферацију када су култивисане у плејтовима са колагеном медузе (Jellagen®), у односу на ћелије култивисане у плејтовима са говеђим и свињским колагеном, при чему је колаген медузе испољио и значајно нижи ефекат цитотоксичности. У истој студији је ефекат све три групе колагена био сличан на ћелијске линије преостеобласта MC3T3 (Ren и сар., 2023). Скафолди на бази колагена медузе могу бити погодна подлога за култивацију епителних и ћелија фибросаркома, као и фибробласта, преостеобласта и остеобласта, при чему показују остеоиндуктивна и остеокондуктивна својства (Song и сар., 2006; Addad и сар., 2011; Alkildani и сар., 2021).

Колаген из медузе је иницирао идентичан имунски одговор *in vitro* у компарацији са сисарским колагеном у погледу активације тромбоцита и леукоцита и профила синтезе цитокина, подржавајући инвазију и пролиферацију говеђих хондропрогениторских ћелија и иницијацију хондрогенезе у присуству трансформишућег фактора раста $\beta 1$ (енг. *transforming growth factor \beta 1 – TGF-\beta 1*) (Ahmed и сар., 2021). Колаген из медуза *R. pulmo* (Jellagen®) је коришћен за припрему имплантата који су у комбинацији са фактором који подстиче хондрогенезу *TGF-\beta 3* убрзали хондрогену диференцијацију хуманих мезенхимских матичних ћелија (енг. *human mesenchymal stem cells – hMSCs*) *in vitro*. Аутори претпостављају да мањак интегрин-везујућих места на колагенским матрицама пореклом од медузе, може водити ка механизмима адхезије ћелија који се разликују од оних који се јављају у случају примене коњског или говеђег колагена и који омогућавају очување округлог облика ћелија и спречавање дедиференцијације (Pugliano и сар., 2017). Иако резултати из литературе указују да колаген пореклом из медуза *R. pulmo* може бити задовољавајућа замена сисарском колагену, недостајала су детаљнија испитивања на сисарима у циљу сагледавања природе ткивног одговора меког и коштаног ткива на колагенски биоматеријал пореклом из медуза, као и дефинисање реакције ткива на имплантат пореклом од колагена медузе уз додатак крви, с обзиром да је крв неизбежно присутна приликом имплантације биоматеријала у коштане дефекте током клиничке апликације. Према нашим сазнањима, до сада није описан одговор коштаног ткива на колаген медузе имплантиран у коштани дефект са додатком крви.

У оквиру ове докторске дисертације, колаген пореклом из медузе је анализиран кроз две компаративне студије и на два различита модела анималне имплантације: на ектопичном – супкутаном моделу имплантације и на ортотопичном моделу имплантације у дефектима калварија пацова соја *Wistar*, без и са додатком крви.

Изазов у примени колагенских биоматеријала јесте у постизању оптималног периода биоресорпције материјала. Поред тога, за процес регенерације коштаног тива је неопходна добра васкуларизованост како би се ткиво снабдело храњивим материјама, факторима раста и хормонима и како би се омогућило уклањање ћелијског детритуса (Subhan и сар., 2015) и стимулација активности остеобласта (Mercado-Pagán и сар., 2015). Постоје подаци који указују да би додатак крви имплантатима могао да подспешу ангиогенезу (Barbeck и сар., 2015c). У оквиру ове докторске дисертације у Студији 1, је извршена компаративна анализа одговора ткива на колаген коњског порекла и колаген пореклом из медуза, без и са додатком крви. Применом колагенских скафолда коњског порекла (*PARASORB Sombrero* и других) је већ показано да у року од пар минута они могу подстакнути коагулацију, фаворизујући повлачење тромбоцита упоредо са њиховом адхезијом и агрегацијом. Колаген тада делује

као стимулатор који покреће каскадну реакцију од формирања угрушка до редукције крварења (Böhm и сар., 2017; Kawasaki и сар., 2017; Fontes и сар., 2018).

Да бисмо одредили у којој мери су колагенски биоматеријали коњског порекла и порекла из медузе имали утицај на репарацију коштаног дефекта калварије пацова, пратили смо неколико параметра од интереса: површину новоформиране кости, ресорпцију биоматеријала, васкуларизованост имплантата и густину крвних судова. У циљу сагледавања дугорочног инфламаторног одговора ткива на колаген пореклом из медузе урађено је имунохистохемијско бојење ткива у имплантационој регији на *CD11c* и *CD163* маркер (Слика 4.16а, б).

Наши хистоморфометријски резултати показују веће просечне вредности за површину новоформиране кости у оквиру дефекта калварије са имплантатима КскК+Ф (*PARASORB Sombrero*® колагенски скафолд коњског порекла + физиолошки раствор) и КскК+ Кр (*PARASORB Sombrero*® колагенски скафолд коњског порекла + разблажена крв), у односу површину новоформиране кости у оквиру дефекта КскМ+Ф (*Jellagen*®-3D колагенски скафолд + физиолошки раствор) и КскМ+Кр (*Jellagen*®-3D колагенски скафолд + разблажена крв) десет дана након имплантације (График 4.1). Међутим, статистички значајно већа вредност површине новоформиране кости детектована је само у компарацији дефекта са имплантатом КскК+Ф у односу на вредности у дефектима калварије са имплантатима КскМ+Ф (* $p \leq 0,05$). Односно, статистички значајна разлика у површини новоформиране кости пронађена је компарацијом имплантата на бази колагенског биоматеријала којима није додата крв. Такође, хистоморфометријском анализом су измерене ниже просечне вредности за површину новоформиране кости у оквиру дефекта са материјалом имплантата КскМ+Ф и КскМ+Кр у односу на вредности површине новоформиране кости у дефектима њихових контрола у којима није било имплантације десет дана након имплантације (График 4.1). Иако се очекује да колагенски биоматеријали индукују процес регенерације ткива, тај утицај не мора бити очигледан у почетним фазама коштане регенерације, док не дође до биоматеријал не оствари свој пун потенцијал. Десет дана након имплантације у дефекте калварије пацова, имплантати КскМ+Ф су јасно видљиви и испуњавају скоро половину коштаног дефекта. На овом термину није дошло до њихове ресорпције у великој мери и они нису ослободили довољно простора који би омогућио већу новоформацију коштаног ткива. Осим тога, колаген имплантата КскМ+Ф вероватно још увек није интераговао са околним ткивом у тој мери која би омогућила настанак кости (Слике 4.1а и 4.2а).

Однос површина новоформиране кости у коштаном дефектима између различитих експерименталних група имплантата прати и васкуларизованост имплантата десет дана

након имплантације (График 4.3). Хистоморфометријски су измерене највеће вредности васкуларизације за имплантационе области калварија са имплантатима КскК+Ф, а затим КскК+ Кр и КскМ+Кр, а најмање у имплантационој области имплантата КскМ+Ф (График 4.3). Хистоморфометријска компаративна анализа васкуларизованости дефеката је показала статистички значајно већу васкуларизованост дефеката са имплантатима КскК+Ф у односу на дефекте са имплантатима КскМ+Ф (** $p \leq 0,01$), као и у односу на дефекте са имплантатима КскМ+Кр ($*p \leq 0,05$) десет дана након имплантације (График 4.3).

Хистоморфометријском анализом измерене су веће просечне вредности васкуларизованости дефеката са спонтаном регенерацијом у односу на дефекте са имплантатима, у мањој мери на термину од десет дана након имплантације (изузев компарације са дефектима имплантата КскК+Ф), а у већој мери на термину од шездесет дана (График 4.3). Компарацијом густине крвних судова у оквиру дефеката са имплантатима и дефеката са спонтаном регенерацијом унутар истих експерименталних група, није добијена статистичка значајност, иако је просечна вредност густине крвних судова била већа у оквиру контролних дефеката у односу на дефекте са имплантатима. Та разлика је била најмање изражена компарацијом вредности дефекта са спонтаном регенерацијом и вредности за дефекте са имплантатима КскМ+Кр, а највише изражена компарацијом вредности дефеката са спонтаном регенерацијом и вредности за дефекте имплантата ПСК (График 4.3).

С једне стране, васкуларизованост имплантата се јавља као битан фактор предикције и подржавања остеогенезе који прати динамику регенерације коштаног ткива, са друге стране је често у супротној корелацији са биоресорпцијом имплантата. Хистоморфометријском анализом детектоване су највеће вредности површине имплантата КскМ+Ф који није ресорбован у односу на вредности површине имплантата КскК+ Кр и КскМ+Кр, а затим и имплантата КскК+Ф десет дана након имплантације (График 4.2). Управо су у дефектима калварије са имплантатима КскМ+Ф измерене најмање вредности за новоформирану кост, васкуларизованост и густину крвних судова (График 4.2, 4.3, и 4.4). Немодификован колаген пореклом из медуза који је у основи имплантата КскМ+Ф у највећој мери био је нересорбован десет дана након имплантације, док је додатак крви колагену пореклом из медузе приликом формирања имплантата КскМ+Кр убрзао биоресорпцију колагена пореклом из медузе и изазвао пораст васкуларизованости и густине крвних судова у калваријалним дефектима са имплантатима КскМ+Кр, као и просечних вредности за површину новоформиране кости, иако не статистички значајно. Претходна испитивања су показала да додатак крви биоматеријалу *Algipore*® има утицај на ангиогенезу и сазревање крвних судова. Виши степен васкуларизације се доводи у везу са већим бројем вишеједарних *TRAP* позитивних ћелија које могу бити извор фактора раста васкуларног ендотела (*Ghanaati*

и сар., 2010; *Barbeck* и сар., 2015a). С друге стране, углавном су макрофаги и релативно низак број вишеједарних циновских ћелија повезани са реакцијом ткива на *Algipore*® уколико је додата крв (*Barbeck* и сар., 2015c). У нашој Студији 1, хистолошком анализом препарата запажано је, такође, присуство већег броја макрофага на термину од десет дана након имплантације у околном везивном ткиву око имплантата (Слика 4.3а-г), док присуство вишеједарних циновских ћелија није било детектовано у већој мери у имплантационим регијама калварије ни код једне групе имплантата.

Супротно томе, додаток крви колагенском скафолду приликом формирања имплантата КскК+ Кр је на термину од десет дана након имплантације продужио време биоресорпције имплантата уз смањење коштане регенерације, која се огледа у мањој површини новоформиране кости, као и смањених вредности васкуларизованости у односу на вредности добијене за калварије имплантата КскК+Ф који су формиран на бази коњског скафолда без додатка крви (График 4.2).

Анализирајући наведене параметре за праћење коштане регенерације десет дана након имплантације, уочава се да имплантати на бази колагена пореклом из медуза показују мањи остеорегенеративни потенцијал за иницијацију репарације коштаног ткива од колагенских имплантата на бази коњског колагена. Додатак крви колагену пореклом из медузе приликом формирања имплантата КскМ+Кр доводи до побољшања остеорегенеративног потенцијала у односу на колаген истог порекла без додатка крви (имплантати КскМ+Ф), али и смањених вредности параметара остеогенезе у калваријалним дефектима имплантата коњског порекла (КскК+ Кр група) у односу на колаген истог порекла без додатка крви (КскК+Ф група). Иако ове вредности нису статистички значајне, могу указивати на то да додаток крви може различито моделирати одговор коштаног ткива на имплантат десет дана након имплантације, у зависности од извора колагенског биоматеријала. Показано је да комбинација плазме обогаћене тромбоцитима (енг. *platelet-rich plasma - PRP*) и колагена у репарацију парцијалне руптуре лигамената повећава способност контролисаног ослобађања фактора раста за које је показано да могу да модификују природни степен регенерације костију (*Sharma* и *Maffulli*, 2005; *Zhang* и сар., 2013; *Sample* и сар., 2018).

Сви имплантати су били јасно видљиви у дефектима калварија десет дана након имплантације, док их на шездесет дана након имплантације није било могуће јасно детектовати ни у једном калваријалном дефекту (Слике 4.2 и 4.3). Биоресорпција имплантата која се завршила до периода од шездесет дана након имплантације, оставила је за собом новоформирану кост у калваријалним дефектима имплантата свих експерименталних група (Слике 4.2д, ђ и 4.3д, ђ). У нашем експерименту колагенски материјал коњског порекла коме није додата крв је показао најбржу динамику биоресорпције и у највећој мери је ресорбован

десет дана након имплантације у односу на биоматеријале свих других имплантата. Брза биоресорпција колагенског материјала коњског порекла је описана и у литератури. Колагенске мембране *Parasorb Resodont* и *Biocollagen* су се брже разградиле у *in vitro* условима у односу на колагенске мембране пореклом из свињског и говеђег перикарда. Колагенска мембрана *Parasorb Resodont* се деградирала скоро 90% након педесет дана инкубације у *PBS*-у и трипсину, док се у раствору колагеназе *C. histolyticum* комплетно разградила након седам дана (Vallecillo-Rivas и сар., 2021). Насупрот овоме, Gallo и сарадници тврде да је колаген коњског порекла у највећој мери резистентан на деградацију у односу на колаген других сисарских врста (Gallo и сар., 2020). Овај закључак је базиран на орјентацији колагенских влакана. Колагенска влакна коњског порекла се често изолују из тетива где су орјентисана лонгитудинално, а у мањој мери попречно и хоризонтално. Поред тога, колаген пореклом из ткива са компактном организацијом, као што су тетиве коња, има већи садржај лизина и хидроксилизина у односу на колаген других сисара, као што је колаген говеђег порекла (Angele и сар., 2004; Gallo и сар., 2020; Vallecillo-Rivas и сар., 2021). Повећање хидроксилације лизина је корелирано са повећањем броја попречних веза приликом паковања колагенских влакана, што доводи и до повећања термостабилности колагена, али и потенцијално веће резистенције на биоресорпцију (Rittié, 2017; AraÚjo и сар., 2018).

У нашој Студији 1, имплантати коњског порекла и порекла из медуза анализирани су до термина од шездесет дана након имплантације у калваријалне дефекте пацова. Хистоморфометријском анализом површине новоформиране кости шездесет дана након имплантације измерене су статистички значајно веће вредности за површину новоформиране кости у дефектима са имплантатима КскК+Ф ($\#p \leq 0,05$) и КскМ+Ф ($\#p \leq 0,001$), у односу на дефекте са спонтаном регенерацијом, што указује на то да оба колагенска скафолда показују остерегенеративни потенцијал и да су погодни за примену у регенерацији коштаног ткива (График 4.1). Такође, разлика у просечним вредностима површине новоформиране кости дефеката са имплантатима у односу на дефекте са спонтаном регенерацијом била је већа на шездесет дана након имплантације у односу на вредности измерене у калваријама са имплантатима свих експерименталних група и калваријама са спонтаном регенерацијом десет дана након имплантације. Ово је очекивани резултат, с обзиром да шест недеља представља период када се очекује да је дошло до репарације коштаних дефеката који су мање величине од критичне величине дефекта, или дефеката величине веће од критичне величине дефекта, уколико је репарација потпомогнута биоматеријалом.

Хистоморфометријском анализом измерене су највише вредности за површину новоформиране кости у калваријалним дефектима са имплантатима КскК+ Кр у односу на

калваријалне дефекте са имплантатима КскМ+Ф и КскК+Ф шездесет дана након имплантације, иако та разлика није статистички значајна. Нађена је статистичка значајност компарацијом вредности за површину новоформиране кости у калваријалним дефектима са имплантатима КскК+ Кр шездесет дана након имплантације и вредности за површину новоформиране кости у калваријалним дефектима са имплантатима КскК+Ф, КскМ+Кр и КскМ+Ф десет дана након имплантације. Хистоморфометријском анализом је утврђена и статистички значајно већа површина новоформиране кости у калваријалним дефектима са имплантатима КскМ+Ф шездесет дана након имплантације, у односу на калваријалне дефекте са имплантатима КскМ+Ф десет дана након имплантације, као и већа површина новоформиране кости у калваријалним дефектима са имплантатима КскК+Ф шездесет дана након имплантације у односу на калваријалне дефекте са имплантатима КскК+Ф десет дана након имплантације (График 4.1).

Хистоморфометријским анализама су добијене највише вредности за површину новоформиране кости у дефектима калварије имплантата КскК+ Кр шездесет дана након имплантације (График 4.1). У калваријалним дефектима ових имплантата су измерене и најмање вредности васкуларизације имплантата, што може указивати на то да је имплантат на бази колагена коњског порекла са додатком крви достигао максимум свог остеогеног потенцијала шездесет дана након имплантације. Са друге стране највећи број крвних судова на термину од шездесет дана након имплантације је детектован у оквиру калваријалних дефеката имплантата КскМ+Ф, што може указивати на то да је на овом термину још увек активан процес стварања кости под утицајем имплантата на бази колагена пореклом из медузе, са нешто споријом динамиком у односу на утицај имплантата КскК+ Кр. Мало ниже вредности васкуларизације добијене су анализом калваријалних дефеката имплантата КскК+Ф на овом термину (График 4.3).

Претходне студије су показале да се на овом термину могу измерити статистички више вредности за минерализацију и новоформацију кости, као и већи број остеобласта након апликације колагена типа I са додатком фибрина обогаћеног тромбоцитима (енг. *platelet-rich fibrin – PRF*) у односу на небогаћени колагенски матрикс, у моделу интракоштаних дефеката мандибуле пацова (*Razmara* и сар., 2021). Такође, у литератури постоје подаци да *PRP* не изазива значајно повећање диференцијације остеокласта (*Mokhtari* и сар., 2018), али и да *PRP* активиран 10% тромбином подстиче целокупну диференцијацију остеокласта од њихових прекурсора, што даље има утицаја на ремоделацију кости (*Cenni* и сар., 2010). *Collin-Osdoby* и сарадници сматрају да ресорпција кости посредством остеокласта корелира са ангиогенезом и у нормалном развоју кости, као и у патолошким поремећајима и да основни фактор раста фибробласта (енг. *basic fibroblast growth factor – bFGF*) иницира

регрутацију, активацију, адхезију миграцију и диференцијацију хематопоетских ћелија што на крају може довести и до повећања броја остеокласта (*Collin-Osdoby* и сар., 2002).

Вредности васкуларизације и густине крвних судова су веће у контролним дефектима без имплантата у односу на добијене вредности за дефекте са имплантатима шездесет дана након имплантације група КскМ+Ф, КскК+Ф и КскК+Кр, иако не свуда статистички значајно. Богата неоваскуларизација на овом термину може се појавити као подршка фиброном ткиву у случају непотпуно репарираниог коштаног ткива, иако је и његово стварање подржано и по ободима старе кости. Богато развијено васкуларизовано ткиво је запажено шездесет дана након имплантације, када се материјал из групе имплантата КскМ+Ф готово у потпуности разградио, што указује на то да се применом овог материјала на бази колагена медуза потенцијално може постићи оптимално време за регенерацију коштаног ткива (*Nicosia* и сар., 1991; *Copes* и сар., 2019).

Претходна истраживања су показала да колаген коњског порекла изолован из Ахилове тетиве није био погодан за култивацију хуманих хондроцита у периоду од 14 дана (*Raimondi* и сар., 2004), али је скафолд на бази нативног коњског колагена који је коришћен у нашој студији имплантације на калваријама пацова (*PARASORB Sombrero*), оцењен као погоднији за пролиферацију хуманих периосталних ћелија (енг: *human periosteal cells - hPC*) у односу на скафолде на бази поли(лактид-ко-гликолида) (енг. *poly(lactic-co-glycolic) acid - PLGA*). Ипак, експресија маркера кости, депозити остеогених протеина и калцијума, су у већој мери изражени у групама са неорганским скафолдима (*Ceccarelli* и сар., 2017). Наша студија је показала да је колагенски скафолд коњског порекла уз додатак крви (имплантати КскК+ Кр) у много већој мери подржао настанак новог коштаног ткива у односу на описане резултате коштане новоформације у литератури (*Sweeney* и сар., 1998).

Док је додатак крви колагену коњског порекла приликом формирања имплантата КскК+ Кр утицао на продужетак времена биоресорпције имплантата десет дана након имплантације у односу на колаген коњског порекла без додатка крви у имплантатима КскК+Ф, на термину од шездесет дана је изазвао стварање нове кости у већој мери у односу на новоформирану кост под утицајем КскК+Ф имплантата и на новоформирану кост под утицајем колагена пореклом из медуза коме није додата крв приликом формирања КскМ+Ф имплантата. *De novo* формирање кости у калваријалним дефектима имплантата КскМ+Ф износи 46% шездесет дана након имплантације што је знатно више него у калваријалним дефектима са спонтаном регенерацијом, што указује на то да је колаген из медузе одговарајућа алтернативна замена сисарском колагену за употребу у регенерацији коштаног ткива. У литератури је забележено 35% *de novo* формирање костију у случају имплантације матрица на бази колагена и хитозина осам недеља након имплантације, али и 55% и 46% у

случају имплантације колагена типа I и ламинина у дефекте калварије три месеца након имплантације, што су резултати који се сматрају добром основом за апликацију изучаваних материјала у инжењерству кости (Sweeney и сар., 1998).

Такође, битно је напоменути да физичка модификација имплантата, која би се могла догодити током клиничке апликације и коришћеног хируршког приступа, може утицати на реакцију ткива на биоматеријал и брзину биоресорпције колагена (Herrera-Vizcaino и сар., 2020; Khorramirouz и сар., 2018). И структура коњског колагена утиче на адхезију и пролиферацију ћелија. На моделу супкутане имплантације пацову модификација скафолда на бази коњског колагена у спљоштени облик притиском је довела до појаве различитих образаца инфилтрације ћелија, брзине биоресорпције, као и наизменичног упалног одговора (Herrera-Vizcaino и сар., 2020).

5.2. РАЗЛИКЕ У ОДГОВОРУ ПОТКОЖНОГ ТКИВА ПАЦОВА НА КОЛАГЕНСКЕ БИОМАТЕРИЈАЛЕ СИСАРСКОГ ПОРЕКЛА И ПОРЕКЛОМ ИЗ МЕДУЗЕ

У оквиру ове докторске дисертације, колагенски скафолд пореклом из медузе је испитиван и на ектопичном моделу имплантације пацову у оквиру Студије 2, где је уочена његова биоресорпција до шездесет дана након имплантације, при чему се главни део биоресорпције имплантата КскМ (*Jellagen®-3D* колагенски скафолд пореклом из медузе) одвијао између десет и тридесет дана након супкутане имплантације пацову. Шездест дана након супкутане имплантације пацову, хистолошким анализом су уочени фрагменти имплантата, окружени богато развијеним везивним ткивом са великим бројем моноједарних ћелија. Колагенски имплантат КмтСПк (колагенска матрица пореклом из свињског перикарда) задржао је свој интегритет до шездесет дана након имплантације, при чему је имунски одговор ткива имплантационе регије на имплантате КмтСПк био нижег интензитета у односу на имплантате КскМ све до шездесет дана, представљајући закаснелу слику реакције ткива имплантационе регије имплантата КскМ (Слике 4.14 и 4.15).

Бржа биоресорпција имплантата КскМ у односу на имплантате КмтСПк може се довести у везу са изворном структуром колагена, која одређује његов тип и утиче на термостабилност колагена за коју се сматра да је повезана са динамиком деградације *in vitro* и биоресорпције *in vivo*, а вероватно и са начином производње. У основи имплантата КмтСПк је сисарски колаген пореклом из свињског перикарда. Разлике у аминокиселинској секвенци, као и прикљученим молекулима сисарског колагена у односу на колаген пореклом

из медузе, вероватно имају утицаја на образац интеракције имплантата са ћелијама. Како је већ споменуто, колаген из медузе углавном подсећа на тип I који је доминантан тип колагена у дермису и костима сисара (*Cheng* и сар., 2017; *Rastian* и сар., 2018; *Ren* и сар., 2023). Свињски перикард се састоји од колагена типа I и садржи влакна богата гликозаминогликанима (енг. *glycosaminoglycans* - *GAGs*), што утиче на већу ткивну густину и већи степен природног умрежавања, као и на побољшање потпорне функције (*Kayed* и сар., 2015; *Whelan* и сар., 2019). Већи степен природног умрежавања који прати нативни колаген свињског порекла у односу на степен умрежавања у оквиру колагена медуза у великој мери доприноси бржој разградњи колагена пореклом из медузе у односу на колаген сисарског порекла, како је и показано у ектопичном моделу имплантације пацову у нашим испитивањима. У ортотопичном моделу имплантације пацову у оквиру Студије 1. показано је да је испитивани колаген коњског порекла ресорбован брже у односу на колаген медузе без и са додатком крви.

С друге стране, колагенски материјал пореклом из медуза у оквиру имплантата КскМ у моделу супкутане имплантације, и у оквиру групе КскМ+Ф и КскМ+Кр у моделу ортотопичне имплантације модификовани су карбодимидом (енг. *1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide* – *EDC*) у процесу производње, што представља један од најуспешнијих метода за модификацију колагенских биоматеријала (*Yahyouche* и сар., 2011), јер доводи до стварања нетоксичних нуспроизвода који се лако могу елиминисати испирањем (*Davidenko* и сар., 2015). У претходним студијама је доказано да се модификацијом посредством *EDC* агенса постиже већа стабилност колагена медузе и повећава отпорност на ензимску разградњу у *in vitro* условима (*Song* и сар., 2006), док однос колагена: *EDC* агенса 1:7, резултира постизањем температуре топљења од 33°C уместо 28,9°C за немодификовани колаген пореклом од *R. pulmo* (*Addad* и сар., 2011). Могуће је да је ова модификација донекле одложила биоресорпцију имплантата КскМ групе у поткожним цевовима пацова, иако је биоресорпција КскМ наступила раније у односу на имплантате КмтСПк, који по спецификацији произвођача, представља нативни колагенски материјал изолован из перикарда свиње, који није био подвргнут додатној модификацији. Ова модификација би могла бити и разлог спорије биоресорпције имплантата КскМ+Ф и КскМ+Кр у моделу ортотопичне имплантације у оквиру Студије 1. у односу на нативни колаген коњског порекла. Дужа постојаност колагена пореклом од свињског перикарда у односу на колаген коњског порекла је описана и у *in vitro* студији *Vallecillo-Rivas* и колега (*Vallecillo-Rivas* и сар., 2021).

Брзина биоресорпције биоматеријала је повезана са брзином инфилтрације ћелија из околног ткива до површине биоматеријала, а затим од површине ка унутрашњим

периферним слојевима биоматеријала и на крају до централних слојева биоматеријала (*Ghanaati* и сар., 2011; *Barbeck* и сар., 2016b; *Lorenz* и сар., 2018; *Barbeck* и сар., 2020).

Образац реакције ткива у имплантационој регији на имплантата КскМ и КмтСПк, који се огледа у брзини ћелијске инфилтрације ка централним слојевима имплантата, разликује се на десет, тридесет и шездесет дана од супкутане имплантације пацову.

Претходна истраживања су показала биоресорпцију нативног и *EDC* умреженог скафолда на бази колагена медузе до тридесет дана након супкутане имплантације *Wistar* пацову. Оба колагена медузе, као и колаген говеђег порекла који је коришћен као контрола у том експерименту су изазвала хистопатолошку реакцију ткива која се огледала у инфламацији, фибрози и неоваскуларизацији најинтензивније седам дана након имплантације, са тенденцијом опадања интензитета до тридесетог дана, при чему је тренд опадања интензитета био много израженији на имплантате од колагена медузе у односу на говеђи колаген (*Widdowson* и сар., 2018).

Ињектирањем *EDC*-ом модификованог колагена пореклом из медузе је показано да долази до спорије биоресорпције оваквог колагена у моделу ињекционе медијализације гласних жица новозеландских кунића у компарацији са комерцијално доступним материјалима у ларингопластици *Cymetra* (безћелијски матрикс изолован из људске коже) и *Restylane* (на бази хијалурона) при чему аутори претпостављају да спорија ресорпција може бити резултат немогућности околног ткива зеца да разгради колаген медузе и/или да то може бити повезано са природом инфламаторног одговора у вези са величином партикула које смањују ресорпцију овог материјала (*San-Marina* и сар., 2021). Поред тога, *EDC*-ом модификовани колаген медузе доводи до редукције инфламаторног одговора посредством макрофага и цитотоксичних Т-ћелија до дванаест недеља након имплантације уз промоцију *de novo* синтезе колагена у периимплантираном ткиву гласних жица кунића, као и продукцију енергије кроз иницирање процеса бета оксидације (*Bowen* и сар., 2022). *In vitro* проучавања макрофага су показала да колаген модификован глутералдехидом изазива проинфламаторни одговор у већој мери од колагена свињског (*CollaMend™*) и говеђег порекла модификованог *EDC*-ом уз стварање резистенције на ензимску деградацију (*McDade* и сар., 2013; *Delgado* и сар., 2015). *EDC*-ом модификовани колагенски скафолди индукују агрегацију макрофага мишје ћелијске линије у форму циновских ћелија страног тела (енг. *foreign body giant cells - FBGCs*) које разграђују колагенске скафолде пореклом од говеђе ахилове тетиве (*Yahyouche* и сар., 2011).

5.3. КОМПАРАЦИЈА ОДГОВОРА ТКИВА НА КОЛАГЕНСКЕ МЕМБРАНЕ ДОБИЈЕНЕ ИЗ РАЗЛИЧИТИХ ТКИВА НА ЕКТОПИЧНОМ МОДЕЛУ ИМПЛАНТАЦИЈЕ ПАЦОВУ

Разумевање оригиналне структуре сваке баријерне мембране омогућава увид у њихове потенцијалне обрасце инфилтрације, васкуларизације и деградације, што све представља есенцијалне особине баријерних мембрана за вођену регенерацију кости (енг. *guided bone regeneration - GBR*) при чему варијабилност ових фактора може да утиче на клиничке исходе у контексту зарастања рана и повећања запремине компактне кости до које долази услед коштане регенерације. Посебно имајући у виду да ресорбилне колагенске мембране, за разлику од нересорбилних, као што су мембране базирание на политетрафлуороетилену (енг. *polytetrafluorethylene – PTFE*), не омогућавају само баријерну функцију, него и функцију интеграције са меким ткивом, побољшавајући горе поменуте елементе клиничких исхода (*Omar* и сар., 2019).

Хистолошка анализа колагенских мембрана из наше Студије 3 пре имплантације је указала на њихову различиту архитектуру. Колагенска мембрана имплантата КмСТе (*Ossixplus®* колагенска мембрана свињског порекла добијена из тетиве) је непорозна што јој омогућава ексклузивно баријерну функцију која не укључује инфилтрацију ћелија околног ткива (Слика 4.17а). Колагенска мембрана КмСПт (*Bio-gide®* колагенска мембрана свињског порекла добијена из перитонеума) има два јасно дефинисана различита слоја, један који је компактан и други који је растресит, порозан (Слика 4.17б). Произвођач КмСПт колагенске мембране предлаже апликацију порозног слоја уз кост, како би се омогућила убрзана ћелијска инфилтрација и омогућило стварање остеокондуктивне средине за раст кости. Колагенска мембрана КмСПк (*Jason®* колагенска мембрана свињског порекла добијена из перикарда) показује порозну структуру са порама попут саћа, која омогућава ћелијску инфилтрацију (Слика 4.17в).

Хистолошким анализом је утврђено да се образац интеграције колагенске мембране КмСТе групе разликује од обрасца интеграције колагенских мембрана група КмСПт и КмСПк (Слике 4.19, 4.21, 4.23). Узрок томе је највероватније присутна разлика у микроструктури колагенских мембрана потврђена *ex vivo* анализом. Колагенска мембрана у оквиру групе имплантата КмСТе је непорозна, што указује на ексклузивну функцију баријере. Међутим, већ неко време постављају се даљи захтеви за примену мембрана заснованих на колагену у усмереној регенерацији ткива, укључујући трансмембранску васкуларизацију (*Karogianni* и сар., 2021). Резултати Студије 3 показују да мембране из

групе КмСТе не би могле испунити овај захтев у примени колагенских мембрана, што би могло смањити њен регенеративни потенцијал у поређењу са конвенционалним мембранама на бази колагена група КмСПт и КмСПк. У сваком случају, овакав образац интеграције са околним ткивом који не укључује инфилтрацију ћелија, јесте сличан са обрасцем интеграције нересорбилних баријерних мембрана, али свакако са мањим ризиком од дехисценције ране (*Sbricoli* и сар., 2020), што је често било описано у случају примене мембрана које су базиране на *PTFE*. Колагенска мембрана из групе КмСПт, такође, показује смањени ризик за дехисценцију рана чиме може бити задовољавајућа алтернатива примени мембрана на бази *PTFE*, како је показано у једној клиничкој студији (*Zitzmann* и сар., 1997). Колагенска мембрана групе КмСПт је састављена од два карактеристична слоја: компактног и порозног који се треба прислонити уз дефект кости, по препоруци произвођача, ради формирања остеокондуктивног миљеа који би стимулисао раст кости. Колагенска мембрана групе КмСПк има порозност попут саћа, због чега је погодна за инфилтрацију ћелија.

Питање биоресорпције колагенских материјала је од огромне важности за регенерацију кости (*Behring* и сар., 2008). Уколико је време биоресорпције продужено више од онога што је неопходно, може се створити унутрашњи притисак на околно епително ткиво у случају коштаних имплантација, што представља изазов примене у клиничкој стоматолошкој пракси, чак и када је у великој мери уклоњено околно ткиво које би вршило притисак на имплантат. У експериментима других студијских група је показана већа крхкост мембране групе КмСТе у односу на еластичнију КмСПт колагенску мембрану, што може бити последица модификације шећером (*Raz* и сар., 2019).

Ова посматрања су подржана резултатима хистомофометријске анализе који указују на повећање дебљине колагенских мембрана КмСТе групе до 250% од почетне вредности, на термину од десет дана након имплантације да би се на термину од шездесет дана након имплантације дебљина ових мембране смањила, али само на око 200% у односу на првобитну дебљину (График 4.8). Ово повећање дебљине колагенске мембране КмСТе током испитиваног периода, не може бити узроковано ћелијском инфилтрацијом, јер она није запажена током периода посматрања, због чега се може претпоставити да је састав колагенске мембране одговоран за овај феномен. Ниво хидратације колагена зависи од степена умрежавања колагенских влакана, тако да што је мање колагенских влакана умрежено, они могу више везати молекуле воде (*Goodarzi* и сар., 2018). У случају колагенске мембране КмСТе групе, претпоставља се да је утицај рибозе као агенса за њено умрежавање, довео до повећаног капацитета за везивање воде и отицања мембране. Овај феномен је описан и у случају примене других агенаса за умрежавање колагена на бази шећера (*Katimura* и сар., 2014). Умрежавање колагена посредством шећера, данас представља

атрактивну технику, јер се то као процес гликације (eng. *glycation*) дешава и физиолошки, као нпр. током старења, па се претпоставља да то може бити идеалан метод за умрежавање колагена у циљу оптимизације времена биоресорпције, у зависности од жељеног клиничког циља (Kinoshita и сар., 2019). Хистоморфометријском анализом колагенских мембрана КмСПт, показано је повећање њихове дебљине од 260% у односу на почетну вредност, десет дана након имплантације да би се затим њихова дебљина смањивала током посматраног периода до 97% у односу на првобитно измерену вредност, што је забележено на шездесет дана након имплантације, указујући на биоресорпцију овог типа колагенске мембране (График 4.8). Промене које се односе на дебљину колагенске мембране су узроковане ћелијском инфилтрацијом, што је највише изражено у порозним материјалима, док су компактне површине без пора мање подложније биоресорпцији. У случају имплантата групе КмСПт, описано смањење дебљине мембране је претежно последица биоресорпције порозне компоненте мембране и истовремене инфилтрације ћелија унутар порозне компоненте мембране, чији се интензитет повећава у каснијим терминима имплантације. Bozkurt и сарадници су истакли да је забележен различит период биоресорпције исте колагенске мембране свињског порекла *Bio-gide* и да он износи између четири недеље и три месеца, док се у неким студијама на поткожном моделу мишева и пацова ова мембрана показала као стабилна баријера у периоду од два месеца након имплантације (Rothamel и сар., 2005; Ovens и Iukna 2001; Ganathii и сар., 2012; Bozkurt и сар., 2014). Наши резултати показују да се компактни слој колагенске мембране *Bio-gide* одржао као стабилна баријера до последњег периода посматрања, односно до шездесет дана након имплантације, док је порозни слој КмСПт колагенске мембране подлегао биоресорпцији у периоду од тридесет до шездесет дана након имплантације.

Хистолошком анализом није детектована биоресорпција колагенске мембране групе КмСПк до шездесетог дана након имплантације. Реакција околног поткожног ткива на КмСПк групу колагенских мембрана је слична реакцији ткива на колагенске мембране КмСПт. Хистолошком анализом уочавају се једноједарне ћелије, међу којима доминирају макрофаги, али је запажено и присуство вишеједарних циновских ћелија у мањем броју. Колагенске мембране у оквиру група КмСПк и КмСПт нису показале фрагментацију до краја испитиваног периода.

Колагенска мембрана која је у основи имплантата групе КмСПк у ектопичном моделу имплантације пацову, је испитивана и на ектопичном моделу имплантације мишу, самостално (група имплантата КмСПк+Ф) и уз додатак крвних деривата као што су: разблажена крв (КмСПк+Кр), серум (КмСПк+Се) и плазма (КмСПк+Пл).

5.4. ИНФЛАМАТОРНИ ОДГОВОР ОКОЛНОГ ТКИВА НА КОЛАГЕНСКЕ ИМПЛАНТАТЕ РАЗЛИЧИТОГ ПОРЕКЛА И СТРУКТУРЕ У ОРТОТОПИЧНОМ И ЕКТОПИЧНОМ МОДЕЛУ ИМПЛАНТАЦИЈЕ ПАЦОВУ

У научној заједници постоји дискусија на тему да ли су колагенске мембране које индукују јачи инфламаторни одговор ткива или мембране које изазивају слабији инфламаторни одговор ткива погодније за постизање жељеног клиничког резултата (*Omar* и сар., 2019; *Sbricoli* и сар., 2020). Досадашње студије су показале да запаљенски механизми активирају процесе репарације и регенерације ткива (*Frangogiannis* и сар., 2015; *Oishi* и *Manabe*, 2018). Макрофаги и вишеједарне циновске ћелије су детектоване као кључни елементи у одговору ткива на биоматеријал, при чему они својом активношћу регулишу биоресорпцију имплантата, као и процес зарастања ране (*Anderson* и *Miller.*, 1984; *Barbeck* и сар., 2017; *Oishi* и *Manabe*, 2018). У том контексту, макрофаги су способни да изазову биоресорпцију биоматеријала кроз фагоцитозу, утичу на ангиогенезу и преуређивање ванћелијског матрикса, као и на регулацију упалних процеса (*Oishi* и *Manabe*, 2018). Макрофаги су стога неопходни за успостављање хомеостазе и опоравак ткива, јер експримирају про- и антиинфламаторне молекуле и тиме могу да подстакну каскадну серију реакција неопходних за ткивну репарацију (*Wang* и сар., 2014; *Barbeck* и сар., 2017).

Степен новонасталог коштаног ткива у Студији 1 ове докторске дисертације, као и одговор поткожног ткива пацова у Студији 2, указују на биокомпатибилност колагенских материјала пореклом из медузе (График 4.5). Укупно мањи број макрофага је детектован анализом ткива имплантационе регије имплантата КскМ (*Jellagen®-3D* колагенски скафолд пореклом из медузе) у односу на број макрофага у ткиву имплантационе регије имплантата КмтСПк (колагенска матрица пореклом из свињског перикарда) десет и тридесет дана након супкутане имплантације пацову (График 4.6). Значајно већи број макрофага оба подтипа је детектован у ткиву имплантационе регије имплантата КмтСПк у односу на ткиво имплантационе регије имплантата КскМ десет дана након имплантације (График 4.6). Након тридесет дана од имплантације, број антиинфламаторних макрофага био је статистички знатно већи у ткиву имплантационе регије имплантата КскМ, док значајније разлике у броју проинфламаторних макрофага нису пронађене (График 4.6). Ово указује на слабији имунски одговор посредован макрофагима на имплантацију колагена пореклом из медузе у односу на колаген свињског порекла, иако постоје подаци *in vitro* студија да је имунски одговор колагена из медузе сличан са одговором ћелија на говеђи колаген или желатин (*Song* и сар.,

2006). Оптимални одговор ткива на имплантацију биоматеријала иде у смеру побуђивања проинфламаторних макрофага на nižем нивоу у односу на антиинфламаторне макрофаге који оптимално подржавају процес регенерације коштаног ткива, што је у нашој студији и детектовано анализом имплантата КскМ (*Anderson и Miller, 1984; Brown и сар., 2012; Sridharan и сар., 2015*).

Међутим, није ретко да чак и биоресорбилни материјали у виду коштаных заменика индукују одговор ткива посредством проинфламаторних ћелија које продукују ензиме попут тартарат резистентне киселе фосфатазе (енг. *tartrate-resistant acid phosphatase-TRAP*) и који активно учествују у процесу разградње биоматеријала (*Ghanaati и сар., 2010; Barbeck и сар., 2016a; Barbeck и сар., 2016b, Barbeck и сар., 2020*). *Al-Maavi* и колеге су показали да колагенске мембране индукују одговор моно- и мултнуклеарних фагоцита који су *TRAP* позитивни (*Al-Maavi и сар., 2018*). Још је показано да макрофаги поларизовани у подип М1 излагањем *Th1* цитокинима, повећавају експресију проинфламаторних цитокина и производњу реактивних врста кисеоника (*ROS*) (*Atri и сар., 2018*).

Чини се да су проинфламаторни макрофаги, такође, кључни за разградњу колагенских биоматеријала, што може бити од пресудне важности за њихову функцију и одржавање биокомпатибилности. Међутим, потребна су додатна истраживања на молекуларном нивоу како би се потврдили ови налази. Такође је интересантно да резултати показују дугорочнији антиинфламаторни одговор у ткиву имплантационе регије имплантата КскМ, тј. између десетог и тридесетог дана.

Детектован је значајно већи број антиинфламаторних макрофага у дефектима калварије шездесет дана након имплантације имплантата КскМ. Хистоморфометријском анализом је измерена и већа вредност антиинфламаторних макрофага у калваријалним дефектима имплантата КскМ+Ф и у односу на групу спонтане регенерације кости и у директној је зависности са већим процентом новоформиране кости. Овакав налаз се може довести у везу са примарном аминокиселинском секвенцом и секундарном структуром колагена КскМ+Ф и КскМ имплантата на бази колагена пореклом из медузе. Секундарна структура свих колагена је десногира трострука хеликоидна структура састављена од три полипептидна α -ланса са формулом $(Gly-X-Y)_n$, где *X* и *Y* позицију може заузети било која аминокиселина (*Mouw и сар., 2014*). Спиралну конформацију колагена медуза су потврдили *Miki* и сарадници (*Miki и сар., 2015*). *Cheng* и колеге закључују да разлике у аминокиселинском саставу између медуза и типичног колагена I доводе до структурних промена колагена медуза (*Cheng и сар., 2017*). Откривено је да се пролин често налази на позицијама *X* и *Y* у колагену сисара, али је мање пролина посттранслационо модификовано у хидроксипролин у колагену медуза у односу на колаген у кожи свиња. Претпоставља се да резидуе хидроксипролина играју одлучујућу

улогу у стабилности троструке хеликоидне структуре (*Mizuno* и сар., 2001; *Nagai* и сар., 1999), и да уколико су присутне у мањем броју доводе до ниже температуре топљења колагена пореклом из медузе у односу на колаген типа I сисарског порекла (37–41°C) (*Privalov* и сар., 1982; *Addad* и сар., 2011). Овако нижа температура топљења се може дефинисати као адаптација живота медуза у стаништима са нижом температуром у односу на станишта сисара. Губитком кватернарне структуре колагена, не мора нужно да дође до губитка свих његових својстава од важности за регенеративну медицину. И након денатурације троструког хеликса, колаген медуза садржи барем једно везивно место за хепарин које је активно и у линеарној конформацији, при чему колаген медузе препознају и интегрин и хепарин-сулфатни рецептори хуманих ћелија (*Addad* и сар., 2011).

Може се претпоставити да промене структуре колагена доводе до разлика у површинској архитектури имплантата, а затим и до инфламаторног одговора ткива на имплантат. У контексту ткивног инжењерства, „Вроманов ефекат“ се односи на специфичан феномен који је повезан са утицајем површинских особина биоматеријала на интеракцију са ћелијама. Вромановим ефектом се описује промена у биолошком одговору ћелија на површини биоматеријала у зависности од хемијских и физичких карактеристика те површине. На пример, како се структура површине (као што су текстура или храпавост) или хемијске модификације (као што су функционалне групе) могу мењати, тако се могу променити и адхезија, пролиферација и диференцијација ћелија. Овај ефекат је важан у дизајнирању биоматеријала, јер оптимизација површинских особина може побољшати интеграцију и функционалност материјала у биолошким системима. Разумевање Вромановог ефекта може помоћи у развоју бољих биоматеријала за имплантате, регенерацију ткива и друге примене у области ткивног инжењерства и регенеративне медицине (*Hu* и сар., 2001). У литератури је описана промена у адсорпцији протеина као што су албумин, фибриноген, фибронектин, витронектин и гама глобулини, као и шећера, јона и липида на површини имплантата под утицајем особина имплантата као што су хемијске модификације, топографија и храпавост имплантата (*Hu* и сар., 2001; *Latour*, 2008).

Значи, специфична топографија површине биоматеријала може утицати на врсту, количину, састав и промене конформације адхерираних протеина (*Hu* и сар., 2001). Овако изазван састав специфичан за имплантат доводи до адхезије различитих типова ћелија, као што су моноцити или макрофаги, и изазива специфичан облик експресије сигналних молекула од стране ових ћелија (*Hu* и сар., 2001). Сматра се да специфичне карактеристике површине материјала пружају кључне одреднице за одговор ткива на биоматеријал (*Anderson* и *Miller*, 1984; *Hu* и сар., 2001; *Anderson* и сар., 2008), као и да утичу на термичку стабилност

биоматеријала која је повезана са временом биоресорпције, како је већ раније наглашено (Miki и сар., 2015).

Постоје докази да је колаген медуза растворљив при неутралним вредностима pH , па се претпоставља да су механизми биоресорпције посредовани ћелијама на идентичном принципу као они који су познати из обрасца деградације материјала на бази калцијум-фосфата (Schaefer и сар., 2011).

Иако је потребно спровести још испитивања, ови резултати указују да одговор ткива на колаген пореклом из медузе укључује дуготрајан антиинфламаторни одговор макрофага и оптималан образац за усмерену регенерацију кости, што се може претпоставити и за многобројне друге клиничке индикације.

Хистоморфометријском анализом инфламаторног одговора ткива имплантационе регије на колагенске мембране КмСТе, КмСПт и КмСПк, откривено је да све три мембране индукују присуство већег броја антиинфламаторног подтипа макрофага у односу на проинфламаторни, на моделу супкутане имплантације пацову. Јасна разлика између измерених вредности за ова два подтипа макрофага није детектована само у ткиву имплантационе регије имплантата КмСПк шездесет дана након супкутане имплантације пацову. Статистички значајне разлике у броју проинфламаторних макрофага нису биле утврђене у ткиву имплантационе регије различитих колагенских мембрана, али ни између околног ткива колагенских мембрана и контролне групе лажно оперисаних животиња на свим посматраним терминима. Насупрот томе, значајне разлике су детектоване између броја антиинфламаторних макрофага у испитиваним експерименталним групама кроз цео посматрани период. Такође, највеће разлике између проинфламаторног и антиинфламаторног подтипа макрофага су пронађене у ткиву лажно оперисаних животиња током целог периода посматрања. То може бити објашњено повећањем присуства антиинфламаторног подтипа макрофага у присуству имплантата, што води ка балансирању М1/М2 поларизације унутар биоматеријала, као и у ткиву имплантационе области око биоматеријала (Barbeck и сар., 2015; Xia и сар., 2004).

Сличне вредности за антиинфламаторни подтип макрофага су добијене анализом ткива имплантационих регија имплантата КмСТе и КмСПт током целог периода посматрања, и ткива имплантационе регије КмСПк, до тридесет дана након имплантације. Шездесет дана након имплантације, проинфламаторни тип макрофага у групи КмСТе је био знатно заступљенији у односу на ткива имплантационих регија имплантата КмСПт и КмСПк. Ови подаци доводе до закључка да КмСТе колагенска мембрана може да индукује окружење које погодује регенерацији ткива посредством инфламаторног одговора умереног интензитета (График 4.7).

У ткиву имплантационе регије КмСПт колагенске мембране, висока заступљеност антиинфламаторног типа макрофага је била детектована током целог експерименталног периода, са изузетком тридесет дана након имплантације. Овакав број антиинфламаторних макрофага је сличан вредностима за ткиво контролне групе са спонтаном регенерацијом, али су и ниже у поређењу са вредностима добијеним анализом ткива имплантационе регије КмСТе имплантата, шездесет дана након супкутане имплантације пацову (График 4.7).

Хистоморфометријске анализе ткива имплантационе регије имплантата КмСПк су показале иницијално веће вредности за присуство антиинфламаторних макрофага, које су континуирано опадале до краја периода посматрања. Број антиинфламаторних макрофага је био знатно виши у ткиву имплантационе области КмСПк имплантата десет дана након супкутане имплантације пацову, док су вредности у ткиву имплантационе области имплантата КмСПт биле више на тридесет дана по имплантацији. Упркос описаним разликама, на термину од шездесет дана након имплантације, присуство антиинфламаторних макрофага у ткивима имплантационих области КмСПт и КмСПк имплантата било је слично (График 4.7). Иако инфламаторни одговор ткива на имплантате КмСПт и КмСПк током целог периода посматрања није био идентичан, оба имплантата иницирају окружење које промовише регенерацију ткива и води ка значајно израженијим антиинфламаторним условима као очекиваној карактеристици за оптималну примену биоматеријала.

Упоредо са описаним присуством класа макрофага, хистопатолошка анализа је показала да КмСТе имплантати изазивају благи инфламаторни одговор околног ткива праћен минималном фиброзом посредством једноједарних ћелија, што и даље показује на добру биокомпатибилност. Међутим, инфилтрација ћелија из околног ткива у имплантате КмСТе није уочена током целог периода испитивања. Насупрот томе, имплантати у оквиру КмСПт групе су изазвали двозначну реакцију, као последицу постојања два структурно другачија слоја у свом саставу. Хистопатолошка анализа имплантационе регије имплантата КмСПт открива околно ткиво богато крвним судовима, макрофагима, гранулоцитима и лимфоцитима, поред веома малог броја вишеједарних циновских ћелија унутар оба слоја имплантата, али са другачијом динамиком појављивања током посматраног периода. Инфилтрација ћелија у порозни слој имплантата је веома изражена до тридесет дана након имплантације, док овај слој бива потпуно ресорбован до шездесет дана након имплантације. Са друге стране, компактни слој имплантата је био видљив током целог периода посматрања, али са ћелијама које су инфилтрирале у унутрашњост овог слоја у каснијим терминима након имплантације.

У литератури је описано да хемијски модификоване колагенске мембране на бази умреженог колагена изазивају реакцију ткива на страном телу које може да води ка

превременој фрагментацији имплантиране колагенске мембране, што умањује њену баријерну функцију у условима усмерене регенерације кости (*Rothamel* и сар., 2005). *Moses* и сарадници су открили да КмСТе колагенска мембрана показује пролонгирану биоресорпцију и слабу интеграцију са околним ткивом, али без изражене реакције ткива на страно тело (*Moses* и сар., 2008; *Haim* и сар., 2008). У имплантационој регији имплантата КмСТе, откривен је висок број гранулоцита на последњем посматраном термину од шездесет дана након имплантације, што може бити индикација пролонгиране и успорене биоресорпције колагенске мембране КмСТе, која је вероватно започела тек у овом периоду, јер је примећено да гранулоцити активно учествују у физиолошкој транзицији колагена, као и у биоресорпције колагенске мембране КмСПт (*Traci* и сар., 2017; *Neto* и сар., 2020). Умрежавање КмСТе колагенске мембране вероватно изазива ослобађање фрагмената колагена из мембране почетком њене биоресорпције, што изазива регрутацију гранулоцита на каснијим терминима. Ово је подржано чињеницом да гранулоцити имају кратак животно век (*Actor*, 2012) и наводи на претпоставку да биоресорпција колагенске мембране КмСТе може почети у периоду од шездесет дана након имплантације. Такође, пошто је показано да многа патолошка стања у хроничним болестима могу бити повезана са акумулацијом напредних крајњих производа гликације (енг. *advanced glycation end products - AGEs*), која се природно дешава током старења, даља испитивања присуства и акумулације *AGEs* у односу на имунски одговор ткива око имплантата овакве врсте, треба спровести и на молекуларном нивоу (*Bourne* и сар., 2013).

Главна запажања која се односе на дугорочну стабилност, али без инфилтрације ћелија и ткива, упоредива су са претходним клиничким испитивањима колагенске мембране КмСТе. Одсуство интеграционог понашања колагенске мембране КмСТе је идентично клиничким опсервацијама регенерације кости вилице након апликације КмСТе мембране (*Zubery* и сар., 2007; *Zubery* и сар., 2008). Иако резултати ове студије не показују интеграцију ткива са имплантатима КмСТе групе, клинички је описано да ова мембрана подржава регенерацију коштаног ткива. Ове налазетреба даље испитати детаљније у новим *in vivo* студијама, с обзиром да је ефекат одсуства интеграције ткива у имплантатима, у супротности са претходним претпоставкама које упућују да биоактивнија колагенска мембрана у већој мери подржава процесе као што је трансмембранска васкуларизација, а самим тим и процес регенерације ткива (*Zubery* и сар., 2007; *Omar* и сар., 2019).

Разлика у инфилтрацији ћелија није описана између два слоја колагенске мембране КмСПт групе у моделу супкутане имплантације на *Lewis* пацовима, што може бити последица имплантације на другим животињским врстама, али такође и одсуства идентичних експерименталних услова (*Bozkurt* и сар., 2014). Идентично интеграционо понашање је

описано за мембрану која се налази у основи КмСПк групе у другим претклиничким студијама (Karogianni и сар., 2021).

5.5 КОМПАРАЦИЈА ОДГОВОРА ТКИВА НА КОЛАГЕНСКЕ МЕМБРАНЕ РАЗЛИЧИТОГ ПОРЕКЛА НА ЕКТОПИЧНОМ МОДЕЛУ ИМПЛАНТАЦИЈЕ МИШУ

Хистолошка анализа је показала да мембране имају различиту архитектуру, што може бити основа за различито понашање ћелија и одговор ткива. Упркос разликама у порозности ових мембрана, оне су изгледале као стабилна баријера у раније испитиваним временским тачкама. Стиче се утисак КмС мембрана има компактнију структуру са мањим бројем пора неједнаке величине у односу на КмК мембрану која има бројније поре, које имају приближно једнаку величину и равномерније су распоређене. Број и дистрибуција пора су важни фактори који утичу на инфилтрацију ћелија и ресорпцију имплантираног биоматеријала. Различиту архитектуру мембране у испитиваним групама пратила је инфилтрација ћелија истог типа, али са разликом у обрасцу инфилтрације, броју и временском периоду када се инфилтрација уочава.

Већи број инфламаторних ћелија је примећен у КмС групи у термину од три дана у односу на КмК групу. Временски период анализе од три дана се односи на фазу инфламације која се јавља приликом инцизије или креирања дефекта и имплантације биоматеријала, која је праћена инфилтрацијом једноједарних ћелија, полиморфонуклеара, леукоцита, макрофага и других ћелија (Kumar и сар., 2020). Приметно већа инфилтрација моноклеарних ћелија је примећена у обе испитиване мембране 10 дана након имплантације у поређењу са временском периодом од три дана. Продор ћелија је примећен у већим порама углавном у КмС мембрани, док су ћелије равномерно распоређене у КмК мембрани. Моноклеарне ћелије су примећене у већем броју у КмК него у КмС мембрани након 10 дана.

Након 10 дана се појавио танак слој фиброзног ткива унутар границе оба материјала, што указује на почетак интеграције ткива у околно ткиво.

Хистоморфометријска анализа је показала статистички значајно повећање дебљине мембране након 10 дана у поређењу са термином од три дана. Повећање дебљине обе испитиване мембране, промена боје при трихромном бојењу по Азану од жућкасте до плаве која је боја колагена који се боји овом методом бојења, корелира са фазом ћелијске инфилтрације. Може се претпоставити да је повећање густине ћелија заједно са произведеним колагеном од стране инфилтрираних фибробласта и излагањем телесним течностима главни разлог повећане дебљине мембрана и уочене промене у бојењу на

колаген. Познато је да излагање телесним течностима такође може утицати на дебљину мембране. У студији *Willershausen* и сар. је показано да се дебљина колагенских биоматеријала свињског порекла може значајно променити након бубрења у физиолошком раствору, и да је била различита у сувим, влажним и условима *in vivo* (*Willershausen* и сар., 2014).

Постоје литературни подаци који показују да нема статистички значајних разлика између дебљине мембране свињског порекла између три и 10 дана, а да се знаци деградације виде након 10 до 15 дана (*Barbeck* и сар., 2015a; *Barbeck* и сар., 2015b). У студији у којој је извршена поткожна имплантација пацовима, показано је да су колагенски хемостатски сунђери коњског порекла, који садрже двоструко више нативних неповезаних влакана коњског колагена у односу на КмК мембрану коју смо ми испитивали, смањили дебљину 3 и 15 дана након имплантације, а затим је дошло до ћелијске инфилтрације, формирања нове васкуларизације и процеса деградације до 30 дана након имплантације (*Herrera-Vizcaíno* и сар., 2020). Стога се очекује да КмС и КмК мембране пролазе кроз процес деградације под утицајем ензима колагеназе у дужим периодима посматрања.

Подаци из литературе сугеришу да би пожељно време деградације мембране *in vivo* требало да буде између четири недеље и неколико месеци у зависности од клиничког исхода који треба да се постигне (*Bottino* и сар., 2012;) тј. тога да ли се мембрана користи за подстицај регенерације ткива и као матрица за ћелије или има улогу баријерне мембране да спречи продор ћелија у подручје дефекта. У случају мембране *Bio-Gide®* која је свињског порекла, објављени су подаци о различитом периоду биоразградње, између четири недеље [*Rothamel* и сар., 2005; *Moses* и сар., 2008) и три месеца (*Owens* и *Yukna*, 2001). У моделима поткожне имплантације мишевима и пацовима ова мембрана се показала као стабилна баријера у периоду од два месеца (*Ghanaati*, 2012; *Bozkurt* и сар., 2014). У нашем истраживању, КмС мембрана је од почетка стабилнија од КмК мембране, а 30 дана након имплантације ова мембрана је задржала своју структуру, била је потпуно насељена ћелијама везивног ткива и приказано је више остатака мембране у поређењу са КмК мембраном.

Поред тога, у моделу поткожне имплантације код пацова, показало се да модификација коњског сунђера на бази колагена у спљоштени облик притискањем доводи до различитих образаца ћелијске инфилтрације, брзине деградације имплантираног материјала, као и промена у инфламаторном одговору (*Herrera-Vizcaíno* и сар., 2020; *Khorramirouz* и сар., 2018). Ови налази су показали да физичка модификација материјала може утицати на одговор ткива на биоматеријал и брзину биоразградљивости колагена (*Herrera-Vizcaíno* и сар., 2020; *Khorramirouz* и сар., 2018).

КмК мембрана се показала повољнијом за ћелијско окружење него КмС мембрана током испитиваног периода. Интензитет плаве боје након бојења колагена трихромним бојењем по Азану је већи у КмК него у КмС групи, што је у складу са већим бројем ћелија сличних фибробластима које су уочене на препаратима што може указивати на већу стопу производње колагена у КмК у поређењу са КмС мембраном, или може указивати на бољи опоравак мембранских колагенских влакана након имплантације у периоду до 10 дана. Ово се такође може довести у везу са процесом производње испитиваних колагенских мембрана, пошто је КмС мембрана хемијски умрежена, док је КмК мембрана произведена без употребе хемијских умреживача за које је познато да продужавају време разградљивости биоматеријала на бази колагена. У контексту ових запажања, можемо претпоставити да се испитиване мембране могу применити за различите индикације у вођеној регенерацији ткива. На основу добијених резултата, КмК мембрану је боље користити као колагенски матрикс, тј. матрицу за инжењеринг и регенерацију меких ткива, подржавајући почетну фазу зарастања рана, због високог нивоа инфилтрације ћелија и бржег степена разградљивости. С друге стране, КмС мембрану је боље користити као баријерну мембрану, због ниже стопе ћелијске инфилтрације и веће стабилности током времена.

5.5. УТИЦАЈ ДОДАТКА КРВИ И КРВНИХ ДЕРИВАТА НА БИОФУНКЦИОНАЛНОСТ КОЛАГЕНСКИХ МЕМБРАНА НА МОДЕЛУ СУПКУТАНЕ ИМПЛАНТАЦИЈЕ МИШУ

Показано је да додатак биолошки активних компоненти може моделирати утицај колагенског имплантата на репарацију ткива. Рехидратација колагенских материјала применом биолошки активних агенаса попут *PRF*-а на колагенској матрици свињског порекла се показала као супериорнији приступ од рехидратације додатком физиолошког раствора или крви, јер је додатак *PRF*-а довео до благе ацидозе која може оптимизовати процес зарастања рана (*Schröger* и сар., 2024). Према нашим сазнањима, у литератури нема описа како додатак серума, плазме или крви тачно моделира одговор ткива на колагенске мембране различитог порекла.

Биокомпатибилност *Jason*® и *Collprotect*® колагенских мембрана је показана у бројним експериментима на животињама, као и у клиничким студијама (*Barbeck* и сар., 2015b; *Al-Maawi* и сар., 2019; *Merli* и сар., 2018; *Jung* и сар., 2021; *Lindner* и сар., 2022). Ми смо компарирали ове две колагенске мембране кроз четири различита ткивноинжењерска

приступа, односно уз додатак четири различита физиолошка фактора у супкутаној имплантацији мишу.

Термини на којима смо посматрали имплантате и одговор околног ткива су три, десет и тридесет дана након имплантације. Временски период од три дана је период упале након прављења поткожног џепа у интерскапуларном региону миша, праћен инфилтрацијом моноклеарних ћелија, попут неутрофила, полиморфонуклеара, леукоцита и макрофага (*Kumar* и сар., 2007, *Willershausen* и сар., 2014). Фаза пролиферације различитих ћелијских типова у повређеном ткиву се одиграва у периоду од седам до десет дана након имплантације. Главна карактеристика ове фазе је миграција фибробласта. Тридесет дана након имплантације представља период на коме се очекује да дође до ткивне репарације на супкутаном моделу имплантације мишу. Ови термини су општеприхваћени у научној литератури за проучавање одговора околног меког ткива миша на имплантирани биоматеријал (*Ghanaati* и сар., 2011; *Ghanaati* и сар., 2012; *Willershausen* и сар., 2014; *Barbeck* и сар., 2015a).

Наша хистоморфометријска анализа колагенских имплантата пореклом од свињског перикарда је показала да не постоје интраиндивидуалне статистички значајне разлике у дебљини имплантата на терминима од три, десет и тридесет дана (График 4.8.). Додатак физиолошког раствора приликом формирања имплантата КмСПк+Ф (*Jason*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из перикарда + физиолошки раствор) или крви приликом формирања КмСПк+Кр (*Jason*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из перикарда + разблажена крв) имплантата, је имао идентичан утицај на колагенску мембрану пореклом од свињског перикарда и довео је до благе биоресорпције мембране до тридесет дана након имплантације, у већој мери у имплантатима КмСПк+Кр, код којих се највећи део биоресорпције десио између три и десет дана по имплантацији (График 4.8).

СЕМ анализа три дана након имплантације показује већи број ћелија различите морфологије на површини имплантата КмСПк+Ф и КмСПк+Кр. На површини имплантата КмСПк+Ф и КмСПк+Кр се јављају једноједарне ћелије моноцито-макрофагног система које су у нешто већој мери инфилтрирале у поре колагенске мембране групе имплантата КмСПк+Ф (Слике 49а и 50а), у односу на поре имплантата КмСПк+Кр. На површини имплантата могу се уочити макрофаги, фибробласти и лимфоцити повезани густом мрежом колагенских и фибринских влакана из крвног угрушка, који делимично испуњава поре имплантата КмСПк+Кр онемогућавајући дубљу инфилтрацију ћелија на овом термину (Слике 49е и 50е), што је у корелацији са хистолошким запажањима (Слике 43а и 43е, Слике 44а и 44е).

Додатак крвних деривата је довео до одређених разлика у степену биоресорпције између различитих имплантата базираних на колагенској мембрани пореклом из свињског перикарда, при чему се исти однос између различитих имплантата, запажа на свим посматраним терминима: три, десет и тридесет дана након имплантације. Додатак серума колагенској мембрани довео је до највеће ресорпције имплантата КмСПк+Се (*Jason*[®] колагенска мембрана свињског порекла добијена из перикарда + серум) у односу на све друге групе имплантата, што је детектовано већ на првом термину, односно три дана након имплантације (статистички значајно у односу на 3 КмСПк+Кр, График 4.8). Увећан степен биоресорпције колагенске мембране је примећен и у имплантатима КмСПк+Пл (*Jason*[®] колагенска мембрана свињског порекла добијена из перикарда + плазма) три дана након супкутане имплантације мишу (статистички значајно у односу на имплантате КмСПк+Ф, График 4.8).

СЕМ анализа показује да додавање серума и плазме колагенској мембрани пореклом из свињског перикарда доводи до приказа колагенске површине која није много богата ћелијама. Уочава се спорадично јављање ћелија уз новопродукована колагена влакна, која указују да се упоредо са биоресорпцијом имплантата одигравала и продукција колагена на овом термину (Слике 4.43в,д и 4.44в,д).

Овај однос у измереним вредностима за дебљину различитих група имплантата задржава се и десет дана након супкутане имплантације. Хистоморфометријска анализа показује да је биоресорпција имплантата КмСПк+Се била највише изражена на термину од десет дана након имплантације (статистички значајно већа од вредности дебљине имплантата КмСПк+Ф, КмСПк+Пл и КмСПк+Кр, График 4.8). Дебљина имплантата КмСПк+Пл је статистички мања у односу на вредности за групе имплантата КмСПк+Кр и КмСПк+Ф на овом термину (График 4.8).

На СЕМ микрографијама се на површини имплантата КмСПк+Ф могу уочити спорадично присутни макрофаги и фибробласти између густе мреже колагенских влакана, са већим бројем ћелија које су продрле у унутрашњост имплантата. Приметна је и мрежа новосинтетисаних колагенских влакана са појединачним еритроцитима, што може указивати и на почетак неоваскуларизације (Слике 4.45а и 4.46а). На површини имплантата КмСПк+Кр се запажа присуство новосинтетисаних колагенских влакана, док су ћелије инфилтрирале у дубље регионе, паралелно са ресорпцијом крвног угрушка, чији остаци на овом термину нису били видљиви ни на хистолошким препаратима (Слике 4.45е и 4.46е). На површини имплантата КмСПк+Се и КмСПк+Пл се уочава присуство великог броја колагенских влакана у густо синтетисаној мрежи, са присуством ћелија испод колагенских депозита које, вероватно, и даље учествују у процесу синтезе колагена (Слике 4.45в, д и 4.46в, д)

Тридесет дана након имплантације, дебљина имплантата КмСПк+Се је била значајно мања у поређењу са дебљином имплантата КмСПк+Ф и КмСПк+Кр. На овом термину је измерена и мања дебљина имплантата КмСПк+Пл у поређењу са дебљином имплантата КмСПк+Ф и КмСПк+Кр (График 4.8).

На површини имплантата КмСПк+Ф се на СЕМ микрографијама види слој новосинтетисаних колагенских депозита који су формирали неравну површину са наборима и улегнућима на површини имплантата. До овог термина су све ћелије инфилтрирале у унутрашњост импланта и не уочавају се на површини, а тек се може видети нека назнака њиховог присуства у виду испупчења испод колагенског омотача (Слике 4.47а и 4.48а). Слика површине имплантата КмСПк+Кр показује присуство густе и растресите мреже колагенских влакана која се нису спојила у гушће колагенске снопове (Слика 4.47е) за разлику од КмСПк+Ф имплантата на страни орјентисаној према поткожном ткиву (Слика 4.47а). Због тога се може претпоставити да је још увек активан процес продукције колагена од стране фибробласта, иако се они, као ни друге ћелије не виде на површини колагенског имплантата КмСПк+Кр. На страни колагенског имплантата КмСПк+Кр окренутој према кожи присутна је компактнија формација (Слика 4.48е). На овом термину су и на површини имплантата КмСПк+Се и КмСПк+Пл видљиви обимни колагенски депозити са обе стране мембране (Слике 4.47в, д и 4.48в, д), док су појединачне ћелије уплетене у мрежу колагенских влакана уочене на површини имплантата КмСПк+Пл (Слика 4.48д).

Наши резултати су показали да додатак серума (имплантати КмСПк+Се), а затим и плазме (имплантати КмСПк+Пл) колагенској мембрани пореклом из свињског перикарда значајно убрзава биоресорпцију колагена већ на термину од три дана након имплантације, у односу на имплантате који су формирано додатком физиолошког раствора (имплантати КмСПк+Ф) или крви (имплантати КмСПк+Кр). Биоресорпција колагена која није статистички значајна уочава се у имплантатима КмСПк+Кр, од три до тридесет дана по имплантацији, а у најмањој мери је присутна у имплантатима КмСПк+Ф на посматраном периоду. Овај однос у степену ресорпције између различитих група имплантата на бази колагенске мембране свињског перикарда, који је уочен три дана по имплантацији, задржава се до тридесет дана по имплантацији, при чему су се највеће промене десиле у првој инфламаторној фази ткивне реакције. Претходна истраживања су показала да имплантати пореклом од свињског перикарда (*Jason* мембрана) супкутано мишевима остају стабилни до тридесет дана након имплантације, без видљивог продирања ткива или знакова биоресорпције (*Korzinskas* и сар., 2018). *Gueldenpfennig* и сарадници су детектовали исту мембрану деведесет дана након имплантације, без знакова биоресорпције (*Gueldenpfennig* и сар., 2020). С друге стране, нема знакова постојаности ове мембране шест недеља након

имплантације у комбинацији са мрежицама на бази магнезијума у дефектима калварије кунџа (*Barbeck* и сар., 2021).

Додатак серума колагену пореклом из свињске коже приликом формирања имплантата КМСКЖ+Се (*Collprotect*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из коже + серум) је довео до највеће биоресорпције међу свим посматраним групама имплантата. Статистички је значајно виши ниво биоресорпције имплантата КМСКЖ+Се у односу на имплантате КМСКЖ+Ф (*Collprotect*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из коже + физиолошки раствор) или КМСКЖ+Кр (*Collprotect*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из коже + разблажена крв), који су настали додатком физиолошког раствора и крви приликом формирања имплантата, три дана након супкутане имплантације мишу (График 4.8). На термину од три дана након имплантације се запажа велики број моноједарних ћелија које су адхерирале паралелно уз колагенска влакна на површини имплантата КМСКЖ+Се (Слике 4.37г и 4.38г). Дебљина имплантата КМСКЖ+Се је у наредним периодима наставила да опада, али та промена није нађена као статистички значајна, компарацијом вредности за дебљину имплантата на три и тридесет дана након имплантације.

Колагенски имплантати КМСКЖ+Ф, КМСКЖ+Кр и КМСКЖ+Пл (*Collprotect*® колагенска мембрана свињског порекла добијена из коже + плазма) достижу пик у дебљини мембране десет дана након имплантације, након чега следи биоресорпција имплантата (График 4.8). Повећање дебљине имплантата на бази колагенске мембране пореклом из свињске коже се није десило само у имплантатима КМСКЖ+Се, који су формирани додавањем серума колагенској мембрани. На СЕМ микрографијама се уочава најмањи број присутних ћелија на површини имплантата КМСКЖ+Се у односу на друге имплантате на бази колагена свињске коже, тако да вероватно није било довољно активних фибробласта за продукцију колагена који би повећао дебљину мембране формирањем новосинтетисаних колагенских влакана која би прожела имплантат (Слика 4.48г). У литератури је описано повећање дебљине колагенске мембране до термина од десет дана након супкутане имплантације, захваљујући продору ћелија околног ткива у унутрашње слојеве колагенске мембране (*Al-Maawi* и сар., 2018). Временски период од десет дана представља довољно дуг период током кога моноједарне ћелије могу да инфилтрирају у средишње слојеве мембране, имајући у виду да подаци из литературе сугеришу да фибробласти могу да мигрирају за 0,2 μm на дневном нивоу уз продукцију колагена током пролиферативне фазе ткивне репарације (*Kumar* и сар., 2007). Резултати друге студије су показали да инкубацијом говеђе колагенске мембране на бази колагена типа I, пореклом из Ахилове тетиве, са фибрином обогаћеним тромбоцитима (енг. *platelet-rich fibrin – PRF*) у трајању од 15 минута, долази до продирања леукоцита, тромбоцита и фибринске мреже у поре централног дела мембране, док су

моноједарне ћелије инфилтрирале у централни део мембране *in vivo* тек десет дана након супкутане имплантације пацову, чиме је показано да биолошке течности далеко брже продиру у колагенске мембране у односу на ћелије и да праве основу за инфилтрацију ћелија (Al-Maawi и сар., 2018). Упоредо са тим, *ex vivo* испитивања исте мембране су показала да она показује способност адсорпције *PRF*-а који садржи фибриноген и протеине плазме, као и високу концентрацију тромбоцита и леукоцита, због чега представља идеалан систем за имитацију интеракције биоматеријала са ткивом домаћина након имплантације (Al-Maawi и сар., 2018).

У нашем испитивању, тридесет дана након имплантације, степен биоресорпције имплантата КмСКж+Ф и КмСКж+Пл је био статистички значајан у поређењу са вредностима у истим групама на терминима од три или десет дана након супкутане имплантације мишу (** $p \leq 0,01$). Овај тренд статистички значајне редукције дебљине имплантата на термину од тридесет дана у односу на прве термине посматрања, присутан је и у оквиру имплантата КмСКж+Кр, где је нађено статистички значајно смањење дебљине имплантата на последњем термину, у односу на вредности дебљине имплантата на три и десет дана након имплантације (График 4.8). На термину од тридесет дана након имплантације, интериндивидуална разлика у дебљини имплантата је нађена у дебљини имплантата КмСКж+Се у односу на имплантате КмСКж+Кр и имплантата КмСКж+Пл у односу на имплантате КмСКж+Кр (График 4.8). На СЕМ микрографијама се види депозиција колагенских влакана чија се оријентација као и дебљина разликују, али су ћелије присутне у малом броју, спорадично распоређене (Слике 4.47б, г, ђ, ж и 4.48б, г, ђ, ж).

Наши резултати показују да додаток крвних деривата колагенским мембранама пореклом из свињског перикарда и свињске коже приликом формирања имплантата, моделира биоресорпцију имплантата која се најбрже дешава уз додаток серума, затим уз додаток плазме, док додаток физиолошког раствора и крви има сличан утицај на постојаност колагенских имплантата (График 4.8).

Узрок највећег утицаја серума на ресорпцију колагенске мембране пореклом из свињског перикарда, али и свињске коже, може бити потенцијално повећано присуство металопротеиназа матрикса (енг. *matrix metalloproteinases* - *MMPs*) у серуму у односу на некоагулисану плазму, што указује на њихово највеће отпуштање током коагулације и фибринолизе (Mannello и сар., 2007; Gerlach и сар., 2007). Ови ензими припадају фамилију цинк-зависних ендопептидаза које учествују у разграђивању и ремоделовању компоненти ванћелијског матрикса, пре свега колагена, желатина, казеина и еластина, самим тим и у репарацији и ремоделацији ткива (Jonsson и сар., 2016; Cabral-Pacheco и сар., 2020). Промена у њиховој активности се повезује са абнормалном деградацијом ванћелијског

матрикса што може довести до хроничних дегенеративних болести, попут брзонапредујућег деструктивног остеоартритиса, као и васкуларним компликацијама као последицом дијабетеса, или ка неуродеградацији и прогресији канцера (*Zitka* и сар., 2010; *Masuhara* и сар., 2002; *Cabral-Pacheco* и сар., 2020). Такође, њиховој активности се у највећој мери преписује и разградња колагенских мембрана посебно деловањем металопроотеиназа из група: *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-8*, *MMP-13* и *MMP-14* (*Ohuchi* и сар., 1997; *Lauer-Fields* и сар., 2002; *Chattopadhyay* и *Raines*, 2014).

MMPs у солубилној форми су саставни део плазме, а у облику интрацелуларних зимогена се налази у тромбоцитима и леукоцитима (*Vartio* и сар., 1989; *Moutsiakis* и сар., 1992). Постоје подаци да је ниво *MMPs* знатно виши у узорцима серума него у плазми у узорцима пацијената који су учествовали у скринингу колоректалног карцинома (*Jonsson* и сар., 2016). У серуму су детектовани виши нивои *MMP-1*, *MMP-3*, и *MMP-9* у односу на некоагулисану плазму (*Jung* и сар., 1996; *Lein* и сар., 1997; *Jung* и сар., 2001; *Mannello*, 2003; *Mannello* и сар., 2008;). , а управо се то поклапа са променама у биоресорпцији колагенске мембране пореклом из свињског перикарда у нашим експерименталним групама Њихова биоресорпција се десила у прва три дана по имплантацији, што може бити директна последица деловања повишених концентрација *MMPs* у односу на физиолошке вредности и то највише са додатком серума, а потом и плазме.

Иако је динамика биоресорпције слична за све посматране имплантате и води ка постизању највећег нивоа биоресорпције до тридесет дана након имплантације, ипак постоје одређене разлике у понашању имплантата на бази колагенских мембрана различитог порекла. Док је додаток плазме колагенској мембрани у имплантатима КмСПк+Пл довео до промене дебљине имплантата већ на термину од десет дана по имплантацији, значајна промена дебљине имплантата КмСКж+Пл се запажа тек тридесет дана након имплантације, што указује да је дошло до благог закашњења у реакцији колагенске мембране пореклом из свињске коже уз додату плазму, у односу на колагенску мембрану пореклом из свињског перикарда, али је на крају степен ресорпције имплантата КмСКж+Пл био већи у односу на имплантате КмСПк+Пл (График 4.8). Такође, додаток крви колагенској мембрани пореклом из свињског перикарда приликом формирања имплантата КмСПк+Кр је довео до веће биоресорпције имплантата на свим посматраним терминима, у односу на биоресорпцију имплантата КмСПк+Ф који су формирано додатком физиолошког раствора на колагенску мембрану истог порекла. С друге стране, додаток крви колагенској мембрани пореклом из коже свиња у имплантатима КмСКж+Кр на термину од тридесет дана након имплантације није довео до веће биоресорпције ових имплантата у односу на имплантате који су настали додатком физиолошког раствора колагенској мембрани пореклом из коже (КмСКж+Ф

група). Док с једне стране за физиолошки раствор се не очекује дуготрајн утицај осим почетне рехидратације колагенске мембране, јер не садржи у себи ћелије, факторе раста и друге биолошки активне агенсе, с друге стране крв садржи ове компоненте које су присутне у уравнотеженој концентрацији која је у складу са физиолошким вредностима, где ни једна врста активних биомолекула није у већој мери концентрисанија од других путем центрифугирања или на неки други начин, па интеракција са колагенским имплантатима активира каскаду стварања крвног угрушка који има локализован карактер (Слике 4.37е и 4.38е).

До тридесет дана након имплантације, примећена је већа ресорпција колагенских имплантата на бази колагена из свињске коже у односу на имплантате на бази колагена из свињског перикарда у оквиру свих испитиваних група у супкутаном моделу имплантације мишу. Иако су оба колагена свињског порекла, односно изолована из исте врсте животиње, постоје разлике које су последица специфичне ткивне организације. Орјентација колагенских фибрила има велику улогу у издржавању притиска и механичке силе. У различитим ткивима, колагенска влакна су распоређена на начин који одговара њиховој функцији. На пример, у тетивама су молекули колагена типично орјентисани и паковани са очуваним периодичним обрасцем од 67 nm у структури, да би се формирала групе колагенских фибрила дијаметра од 400 nm која су укључена у пружање структурне подршке и издржавање механичког стреса (*Franchi и сар., 2007; Terzi и сар., 2018; Salvatore и сар., 2020*). С друге стране, колаген је у кожи анизотропно дистрибуиран (дуж Лангерових линија истезања) и пакован у лабаву мрежу која омогућава кожи да буде флексибилна и да се прилагоди различитим механичким стресовима (*Meyer, 2019*). Колагенска влакна перикарда играју кључну улогу у ојачавању срчаног мишића и одржавању структурног интегритета. Захваљујући овим влакнима, перикард може да издржи велика оптерећења која проистичу из цикличних промена притиска, као што су отварање и затварање срчаних залистака, протицање крви, привремено напрезање зида услед савијања, као и током затварања залистака и привременог задржавања крви (*Alavi и сар., 2023; Thubrikar и сар., 1983; Vesely и сар., 1988*). Због тога су колагенска влакна у перикарду изузетно густа, што омогућава њихову високу отпорност на кидање и пружа стабилност у више смерова (*Meyer, 2019; Vallecillo-Rivas и сар., 2021*). Колаген из свињске коже често се користи у ткивном инжењерству због тога што се дермис свиња превасходно састоји од колагена типа I, који чини 60% до 70% његовог састава. Овај колаген је присутан у дермису заједно с компонентама као што су крвни и лимфни судови, који се уклањају током процеса пречишћавања и изолације колагена (*Friess, 1998; Chattopadhyay и Raines, 2014; Gorlov и сар., 2018; An и сар., 2017*). Колагенска влакна у кожи нису тако компактно организована као у другим ткивима, већ имају растреситу структуру. Због тога је

колаген из коже подложнији дејству деградационих ензима, а процес ремоделовања коже током раста, истезања и старења је физиолошки нормалан. Мембране направљене од свињског колагена имају отворену и порозну мрежу колагенских влакана која су истовремено густа. Како су раније показали резултати, нативне колагенске мембране омогућавају миграцију крвних судова у место дефекта, што омогућава бржу васкуларизацију у области имплантације. Велика густина колагенских влакана у мембрани може да делује као баријера против урастања меког ткива (*Rothamel* и сар., 2012; *Vallecillo-Rivas* и сар., 2021).

Различити обрасци понашања ћелија су претходно описани култивисањем *Jason*® и *Collprotect*® колагенских мембрана *in vitro*. Ћелије из ћелијске линије људског остеосаркома (енг. *human osarcoma cell line SAOS-2*) култивисане на колагенској мембрани *Collprotect*® показале су већу вијабилност у односу на оне култивисане на колагенским мембранама *Bio-Gide*® и *Jason*®, посебно на терминима од пет и седам дана. Након три и пет дана, евалуација колагена типа I је показала да ћелије култивисане на *Jason*® и *Collprotect*® колагенским мембранама имају већи ниво продукције колагена у односу на ћелије култивисане на *Bio-Gide*® колагенској мембрани. Након седам дана, повећање нивоа остеопонтина је уочено култивацијом ћелија на све три врсте колагенских мембрана (*Marques* и сар., 2023).

Подаци из литературе указују да архитектура саме мембране може да модификује утицај порекла. Тако, двослојна мембрана пореклом из коже свиња (*Bio-gide*®) је показала виши ниво васкуларизације, као и колагенска мембрана из перикарда (*Jason*®), у односу на колагенску мембрану пореклом из коже свиња хомогеније структуре (*Collprotect*®) у моделу супкутане имплантације мишу. Такође, установљено је да додатни премаз колагенске мембране хидроксиапатитом који је обogaћен силицијум диоксидом повећава васкуларизацију и процес биолошког ремоделовања (*Dau* и сар., 2020).

5.6. УЛОГА КОЛАГЕНСКЕ МЕМБРАНЕ У СТАБИЛИЗАЦИЈИ ГРАНУЛИРАНОГ МАТЕРИЈАЛА ИМПЛАНТИРАНОГ НА МОДЕЛУ ТИБИЈЕ КУНИЋА

Анализом резултата у Студији 6 уочено је да су и у једној и у другој групи експерименталних имплантата, ХуКз+КмСПк и СиКз+КмСПк, присутни одређени знаци постоперативног тока, али са разликама у интензитету и трајању. Након десет дана од имплантације, тибије у групи ХуКз+КмСПк показују присуство већих хематома и едема, док су тибије у групи СиКз+КмСПк имале мању учесталост и интензитет ових појава (Слика

4.49). Ове разлике указују на потенцијално различиту биокомпатибилност и реакцију организма на имплантате. У групи ХуКз+КмСПк, хематоми су били значајнији и у неким случајевима су се појавили у комбинацији са едемима, што може указивати на постојање интензивнијег инфламаторног одговора или тежих реакција на материјал имплантата. Међутим, присуство колагенских мембрана у овом периоду сугерише да је процес зарастања у основи напредовао, без знакова инфекције.

Након тридесет дана, оба типа имплантата показала су побољшања у виду смањења едема и хеморагија, као и постојања гранулираног материјала у подручју дефекта, који је био видљивији код тибија са ХуКз+КмСПк имплантатима (Слика 4.50). Ова појава указује на то да је материјал имплантата и даље присутан и потенцијално активан у процесу регенерације кости, иако се може приметити да се висина дефекта полако изједначава са околном кости. У групи СиКз+КмСПк, појавили су се мање хеморагичне зоне и мања количина гранулираног материјала, што може сугерисати бржу и ефикаснију интеграцију имплантата у ткиво, са мањим запаљенским одговором.

Конечно, након деведесет дана, тибије у оба експериментална сета показују скоро потпуно зарасле дефекте са малим или без видљивих хеморагијских зона. У групи ХуКз+КмСПк, присуство гранулираног материјала у неким случајевима указује на то да је процес регенерације још увек у току, док у групи СиКз+КмСПк већина тибија показује потпуну репарацију (Слика 4.51). Ови налази сугеришу да би имплантати из групе СиКз+КмСПк могли имати супериорнију способност за потпуну рехабилитацију у поређењу са ХуКз+КмСПк имплантатима, што може бити од значаја за будуће истраживање и клиничку примену.

Иако су неопходне даље хистолошке и хистоморфометријске анализе за процену утицаја колагенске мембране на стабилизацију гранулираног материјала кроз посматрани период, као и повезаности са опсегом неоформације кости и неоваскуларизације, на основу макроскопских налаза се може закључити да колагенска мембрана пореклом из перикарда свиње успешно делује као баријера која стабилизује присуство гранулираног коштаног материјала у коштаном дефектима тибије кунића и тиме потпомаже остеорепаративни процес.

5.7. ЗНАЧАЈ ДОБИЈЕНИХ РЕЗУЛТАТА ЗА ПОТЕНЦИЈАЛНУ ПРИМЕНУ У КЛИНИЧКОЈ ПРАКСИ

Значај добијених резултата у експерименталном делу ове докторске дисертације је вишедимензионалан, што омогућава њихову разноврсну примену. У нашим истраживањима је показано да колагенски биоматеријал пореклом из медузе може бити одговарајући алтернативни извор за колаген сисарског порекла у усмереној регенерацији коштаног и меког ткива. Ипак, колаген различитог порекла има различит ефекат на остеорепарацију у раној и у касној фази регенерације коштаног ткива, што додатно може бити моделирано додатком крви и крвних деривата. Такође, додаток крви и крвних деривата има утицај на време ресорпције колагенских мембрана, што значи да је избором одговарајућег начина припреме колагенских мембрана могуће моделирати време њихове баријерне функције у практичној примени. Додавање крви и крвних деривата колагенским биоматеријалима утиче на резултате репарације меког и коштаног ткива, али се ефекат разликује у зависности од извора колагена, па је од непроцењивог значаја одабир одговарајућег биоматеријала и ткивноинжењерског приступа у клиничкој апликацији у зависности од жељеног клиничког исхода.



6. ЗАКЉУЧЦИ

6. ЗАКЉУЧЦИ

У односу на постављене циљеве, примењене методе и добијене резултате, можемо закључити да се колагенски биоматеријали различито понашају у зависности од порекла, специјског и ткивног, начина производње, структуре и додатака који се примењују у комбинацији са колагенским биоматеријалима. Такође, одговор ткива на различите колагенске биоматеријале и начине примене зависи и од коришћеног модела имплантације.

На основу упоредне анализе колагенских скафолда различитог порекла у ортотопичном моделу коштаног дефекта на калварији пацова, можемо закључити да:

- у раној фази репарације коштаног дефекта, колагенски скафолд пореклом из медузе (КскМ) показује слабији остеорегенеративни потенцијал и спорију деградацију у односу на колагенски скафолд коњског порекла (КскК);
- у каснијој фази репарације, ситуација је обрнута, односно, колагенски скафолд пореклом из медузе показује већи остеорегенеративни потенцијал у односу на колагенски скафолд коњског порекла;
- колагенски скафолд пореклом из медузе показује дуже време постојаност у ткиву у односу на колагенски скафолд коњског порекла
- додатак крви повећава остеорегенеративни потенцијал у раној фази и убрзава биоресорпцију колагенског скафолда пореклом из медузе, али успорава биоресорпцију и смањује остеорегенеративни потенцијал колагенског скафолда коњског порекла;
- додатак крви је повећао остеорегенеративни потенцијал колагенском скафолду коњског порекла и довео до већег нивоа регенерације коштаног ткива у односу на колагенски скафолд коњског порекла без додатка крви у касној фази репарације.
- генерално, додатак крви битно модификује понашање колагенског скафолда коњског порекла и колагенског скафолда пореклом из медузе на ортотопичном моделу имплантације у дефекте на калварији пацова.

Упоредна анализа одговора ткива на поткожно имплантиране колагенске биоматеријале различитог специјског порекла је показала да је:

- ресорпција колагенског скафолда пореклом из медузе бржа током имплантационог периода од 30 дана у односу на колагенску матрицу свињског порекла.
- у каснијем анализираном периоду на 90 дана, није било трагова колагенског скафолда пореклом из медузе, док је колагенска матрица из скињског перикарда опстала као имплантант до 90. дана.
- укупни број макрофага је већи на 10 и 30 дана од имплантације у случају колагенске матрице свињског порекла у односу на колагенски скафолд из медузе што указује на слабији инфламаторни одговор ткива на колаген из медузе у односу на колаген свињског порекла, а коначно значи да је колаген пореклом из медузе погоднији за примену у ткивном инжењерству и регенеративној медицини у односу на свињски колаген, у погледу инфламаторног одговора.

У моделу поткожне имплантације колагенских мембрана различитог ткивног порекла пацову дошли смо до следећих закључака:

- Колагенска мембрана свињског порекла добијена из тетиве (КмСТе) је показала одсуство интеграције са околним ткивом и било је потребно више времена за деградацију у односу на колагенске мембране свињског порекла добијене из перитонеума (КмСПт) и перикарда (КмСПк);
- Колагенска мембрана добијена из тетиве се није показала погодном средином за инфилтрацију ћелија из околног ткива, највероватније због специфичности производње која је подразумевала умрежавање шећером које је довело до густог умрежавања колагенских влакана што је онемогућило инфилтрацију ћелија;
- Запажен је сличан одговор ткива на колагенске мембране свињског порекла добијене из перитонеума (КмСПт) и перикарда (КмСПк), вероватно као последица порекла колагена изолованог из исте врсте, сличне технике производње без умрежавања колагена, као и сличне архитектуре материјала који је порозан;
- Испитивана колагенска мембрана из тетиве свиње која је умрежена шећером има добар потенцијал примене у својству баријерне мембране, док се друге две испитиваве мембране, из перикарда и перитонеума, могу погодно користити као матрице у ткивном инжењерству.

На основу упоредне анализе одговора ткива на имплантиране колагенске мембране различитог порекла, свињског и коњског, на моделу поткожне имплантације мишу, можемо закључити:

- да су обе испитиване колагенске мембране погодне за примену у вођеној (потпомогнутој) регенерацији ткива, да су биокompatibilне, али се разликују у обрасцу ћелијске инфилтрације и брзини деградације, вероватно због различитог порекла, физичко-хемијских карактеристика и различитог процеса производње што их кандидује за различита поља примене.
- Колагенска мембрана коњског порекла (КмК) показује краће време деградације у односу на колагенску мембрану свињског порекла (КмС) на ектопичном моделу имплантације мишу, што значи да би, КмС мембрана била боља за примену као баријерна мембрана, док би КмК мембрана била боља за примену у ткивном инжењерству као матрица.

У односу на додатак крви или крвних деривата колагенским мембранама различитог ткивног порекла на моделу поткожне имплантације мишу, може се закључити:

- Додатак крви није довео до разлике у времену биоресорпције колагенских мембрана свињског порекла добијених било из перикарда (КмСПк), било из коже (КмСКж), у односу на додатак физиолошког раствора.
- Серум се показао као физиолошки фактор који доводи до најбрже деградације колагенских мембрана свињског порекла добијених било из перикарда, било из коже, већ на термину од три дана након имплантације поткожно мишу, при чему је овај тренд приметан и на осталим терминима.
- Додатак плазме убрзава биоресорпцију колагенских мембрана свињског порекла добијених из перикарда и коже, али у мањој мери у односу на додатак серума.
- Дебљи фиброзни слој се уочава у групи са физиолошким раствором после имплантације мембрана из коже у односу на мембране из перикарда, а додатак крви доводи до смањења фиброзног слоја.
- Анализом површине мембрана из перикарда на скенинг електронском микроскопу могло се видети да је инфилтрација ћелијама већа, које су уз то разноврсне морфологије, као и присуство влакана уз изражену порозност на три дана од имплантације у групи са додатком крви, али и да су ћелије присутне у групацијама и

у мањем броју и без влакана уз мању порозност када су додати плазма или серум на те мембране.

- СЕМ анализом је установљено да додатак крви повећава целуларност на обе колагенске мембране у односу на серум и плазму и да је најмања целуларност присутна уз додатак физиолошког раствора на мембрани из коже, три дана од имплантације.
- За различите апликације треба применити различите додатке, па уколико се жели већу целуларност и стабилност мембране онда би требало користити крв или физиолошки раствор као додатак, јер се додатком серума или плазме убрзава процес биоресорпције.

У моделу ортотопичне имплантације биоматеријала у коштане дефекте у тибији кунића:

- колагенска мембрана свињског порекла добијена из перикарда (КмСПк), делује као постојана баријера у стабилизацији гранулираног коштаног материјала деведесет дана након имплантације на ортотопичном моделу имплантације у коштане дефекте на тибији кунића и омогућава адекватан процес репарације коштаных дефеката.

Наши резултати показују да су сви испитивани колагенски биоматеријали погодни за употребу у регенеративној медицини и ткивном инжењерству при чему треба водити рачуна о њиховим карактеристикама које су различите у односу на специјес и ткивно порекло, као и структуру због начина производње. Биолошке карактеристике колагенских биоматеријала се такође могу модификовати физиолошким додацима као што су крв и крвни деривати што може побољшати регенеративну способност колагенских биоматеријала. Њиховим испитивањем кроз примену на различитим моделима, уз различите методе, користећи претходно наведене податке, може се направити персонализован приступ у клиничкој пракси регенеративне медицине и стоматологије.



7. ЛИТЕРАТУРА

7. ЛИТЕРАТУРА

- Actor JK. (2012) Cells and Organs of the Immune System. *Anim Sci J*, 87: 7–16.
- Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. (2008) Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev*, 14(2):199-215.
- Ahmed Z, Powell LC, Matin N, Mearns-Spragg A, Thornton CA, Khan IM, Francis LW. (2021) Jellyfish Collagen: A Biocompatible Collagen Source for 3D Scaffold Fabrication and Enhanced Chondrogenicity. *Mar Drugs*, 22;19(8):405.
- Alavi SH, Ruiz V, Krasieva T, Botvinick EL, Kheradvar A. (2023) Characterizing the Collagen Fiber Orientation in Pericardial Leaflets Under Mechanical Loading Conditions. *Ann Biomed Eng*, 41(3):547-561.
- Alkildani S, Jung O, Barbeck M. (2021) *In Vitro* Investigation of Jellyfish Collagen as a Tool in Cell Culture and (Bone) Tissue Engineering. *Anticancer Res*, 41(2):707-717.
- Al-Maawi S, Herrera-Vizcaíno C, Orłowska A, Willershausen I, Sader R, Miron RJ, Choukroun J, Ghanaati S. (2019) Biologization of Collagen-Based Biomaterials Using Liquid-Platelet-Rich Fibrin: New Insights into Clinically Applicable Tissue Engineering. *Materials (Basel)*, 12(23):3993.
- Al-Maawi S, Orłowska A, Sader R, James Kirkpatrick C, Ghanaati S. (2017) In vivo cellular reactions to different biomaterials-Physiological and pathological aspects and their consequences. *Semin Immunol*, 29:49-61.
- Al-Maawi S, Vorakulpipat C, Orłowska A, Zrnc TA, Sader RA, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S. (2018) *In vivo* Implantation of a Bovine-Derived Collagen Membrane Leads to Changes in the Physiological Cellular Pattern of Wound Healing by the Induction of Multinucleated Giant Cells: An Adverse Reaction? *Front Bioeng Biotechnol*, 14;6:104.
- Alvarez V, Mondragón I, Vázquez A. (2007) Influence of chemical treatments on the interfacial adhesion between sisal fibre and different biodegradable polymers. *Composite Interfaces*, 14(7-9):605-16.
- Alves R, Grimalt R. (2018) A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. *Skin Appendage Disord*, 4(1):18-24.
- An YZ, Heo YK, Lee JS, Jung UW, Choi SH. (2017) Dehydrothermally Cross-Linked Collagen Membrane with a Bone Graft Improves Bone Regeneration in a Rat Calvarial Defect Model. *Materials (Basel)*, 10;10(8):927.

- An YZ, Kim YK, Lim SM, Heo YK, Kwon MK, Cha JK, Lee JS, Jung UW, Choi SH. (2018) Physicochemical properties and resorption progress of porcine skin-derived collagen membranes: In vitro and in vivo analysis. *Dent Mater J*, 30;37(2):332-340.
- Anderson JM, Miller KM. (1984) Biomaterial biocompatibility and the macrophage. *Biomaterials*, 5(1):5-10.
- Angele P, Abke J, Kujat R, Faltermeier H, Schumann D, Nerlich M, Kinner B, Englert C, Ruszczak Z, Mehrl R, Mueller R. (2004) Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. *Biomaterials*, 25(14):2831-41.
- Araújo IBDS, Bezerra TKA, Nascimento ESd, Gadelha CAdA, Santi-Gadelha T, Madruga MS. (2018) Optimal conditions for obtaining collagen from chicken feet and its characterization. *Food Sci Technol*, 38:167–173.
- Arora NS, Ramanayake T, Ren YF, Romanos GE. (2009) Platelet-rich plasma: a literature review. *Implant Dent*, 18(4):303-10.
- Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. (2018) Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci*, 19;19(6):1801.
- Badrul AH, Aminuddin BS, Sharaf I, Samsudin OC, Munirah S, Ruszymah BH. (2004) The effects of autologous human serum on the growth of tissue engineered human articular cartilage. *Med J Malaysia*, 59 Suppl B:11-2.
- Barbeck M, Booms P, Unger R, Hoffmann V, Sader R, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S. (2017) Multinucleated giant cells in the implant bed of bone substitutes are foreign body giant cells- New insights into the material-mediated healing process. *J Biomed Mater Res A*, 105(4):1105-1111.
- Barbeck M, Hoffmann C, Sader R, Peters F, Hübner WD, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S. (2016) Injectable Bone Substitute Based on β -TCP Combined With a Hyaluronan-Containing Hydrogel Contributes to Regeneration of a Critical Bone Size Defect Towards Restitutio ad Integrum. *J Oral Implantol*, 42(2):127-37.
- Barbeck M, Jung O, Smeets R, Gosau M, Schnettler R, Rider P, Houshmand A, Korzinskas T. (2020) Implantation of an Injectable Bone Substitute Material Enables Integration Following the Principles of Guided Bone Regeneration. *In Vivo*, 34(2):557-568.
- Barbeck M, Lorenz J, Holthaus MG, Raetscho N, Kubesch A, Booms P, Sader R, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S. (2015) Porcine Dermis and Pericardium-Based, Non-Cross-Linked Materials Induce Multinucleated Giant Cells After Their In Vivo Implantation: A Physiological Reaction? *J Oral Implantol*, 41(6):e267-81.

- Barbeck M, Lorenz J, Kubesch A, Böhm N, Booms P, Choukroun J, Sader R, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S. (2015) Porcine Dermis-Derived Collagen Membranes Induce Implantation Bed Vascularization Via Multinucleated Giant Cells: A Physiological Reaction? *J Oral Implantol*, 41(6):e238-51.
- Barbeck M, Motta A, Migliaresi C, Sader R, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S. (2016) Heterogeneity of biomaterial-induced multinucleated giant cells: Possible importance for the regeneration process? *J Biomed Mater Res A*, 104(2):413-8.
- Barbeck M, Najman S, Stojanović S, Mitić Ž, Živković JM, Choukroun J, Kovačević P, Sader R, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S. (2015) Addition of blood to a phycogenic bone substitute leads to increased in vivo vascularization. *Biomed Mater*, 11;10(5):055007. doi: 10.1088/1748-6041/10/5/055007.
- Batas L, Tsalikis L, Stavropoulos A. (2019) PRGF as adjunct to DBB in maxillary sinus floor augmentation: histological results of a pilot split-mouth study. *Int J Implant Dent*, 1;5(1):14.
- Behring J, Junker R, Walboomers XF, Chessnut B, Jansen JA. (2008) Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review. *Odontology*, 96(1):1-11.
- Blair P, Flaumenhaft R. (2009) Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*, 23(4):177-89.
- Blatt S, Burkhardt V, Kämmerer PW, Pabst AM, Sagheb K, Heller M, Al-Nawas B, Schiegnitz E. (2020) Biofunctionalization of porcine-derived collagen matrices with platelet rich fibrin: influence on angiogenesis in vitro and in vivo, *Clin Oral Investig*, 24(10):3425-3436.
- Böhm S, Strauß C, Stoiber S, Kasper C, Charwat V. (2017) Impact of Source and Manufacturing of Collagen Matrices on Fibroblast Cell Growth and Platelet Aggregation. *Materials (Basel)*, 15;10(9):1086.
- Bottino MC, Thomas V, Schmidt G, Vohra YK, Chu TM, Kowolik MJ, Janowski GM. (2012) Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration--a materials perspective. *Dent Mater*, 28(7):703-21.
- Bowen AJ, Ekbom DC, Hunter D, Voss S, Bartemes K, Mearns-Spragg A, Oldenburg MS, San-Marina S. (2022) Larynx proteomics after jellyfish collagen IL: Increased ECM/collagen and suppressed inflammation. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*, 24;7(5):1513-1520.
- Brown BN, Ratner BD, Goodman SB, Amar S, Badylak SF. (2012) Macrophage polarization: an opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine. *Biomaterials*, 33(15):3792-802.
- Bunyaratavej P, Wang HL. (2001) Collagen membranes: a review. *J Periodontol*, 72(2):215-29.

- Caballé-Serrano J, Chappuis V, Monje A, Buser D, Bosshardt DD. (2019) Soft tissue response to dental implant closure caps made of either polyetheretherketone (PEEK) or titanium. *Clin Oral Implants Res*, 30(8):808-816.
- Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, Martinez-Avila N, Martinez-Fierro ML. (2020) The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci*, 20;21(24):9739.
- Carano RA, Filvaroff EH. (2003) Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today*, 1;8(21):980-9.
- Ceccarelli G, Presta R, Lupi SM, Giarratana N, Bloise N, Benedetti L, Cusella De Angelis MG, Rodriguez Y Baena R. (2017) Evaluation of Poly(Lactic-co-glycolic) Acid Alone or in Combination with Hydroxyapatite on Human-Periosteal Cells Bone Differentiation and in Sinus Lift Treatment. *Molecules*, 2;22(12):2109.
- Chattopadhyay S, Raines RT. (2014) Review collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*, 101(8):821-33.
- Chen J, Yang P, Liao Y, Wang J, Chen H, Sun H, Huang N. (2015) Effect of the duration of UV irradiation on the anticoagulant properties of titanium dioxide films. *ACS Appl Mater Interfaces*, 25;7(7):4423-32.
- Chen J, Zhao A, Chen H, Liao Y, Yang P, Sun H, Huang N. (2014) The effect of full/partial UV-irradiation of TiO₂ films on altering the behavior of fibrinogen and platelets. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 1;122:709-718.
- Cheng X, Shao Z, Li C, Yu L, Raja MA, Liu C. (2017) Isolation, Characterization and Evaluation of Collagen from Jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye for Use in Hemostatic Applications. *PLoS One*, 19;12(1):e0169731.
- Chia-Lai PJ, Orłowska A, Al-Maawi S, Dias A, Zhang Y, Wang X, Zender N, Sader R, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S. (2018) Sugar-based collagen membrane cross-linking increases barrier capacity of membranes. *Clin Oral Investig*, 22(4):1851-1863.
- Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. (2002) Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res*, 17: 513-520.
- Choukroun J, Ghanaati S. (2018) Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients' own inflammatory cells, platelets and growth factors: the first introduction to the low speed centrifugation concept. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 44(1):87-95.

- Clark RA. (2001) Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci*, 936:355-67.
- Copes F, Pien N, Van Vlierberghe S, Boccafoschi F, Mantovani D. (2019) Collagen-Based Tissue Engineering Strategies for Vascular Medicine. *Front Bioeng Biotechnol*, 12;7:166.
- Coraça-Huber DC, Steixner SJM, Najman S, Stojanovic S, Finze R, Rimashevskiy D, Saginova D, Barbeck M, Schnettler R. (2022) Lyophilized Human Bone Allograft as an Antibiotic Carrier: An In Vitro and In Vivo Study. *Antibiotics*, 11(7):969.
- Cvetković VJ, Najdanović JG, Vukelić-Nikolić MĐ, Stojanović S, Najman SJ. (2015) Osteogenic potential of in vitro osteo-induced adipose-derived mesenchymal stem cells combined with platelet-rich plasma in an ectopic model. *Int Orthop*, 39(11):2173-80.
- Dau M, Volprich L, Grambow E, Vollmar B, Frerich B, Al-Nawas B, Kämmerer PW. (2020) Collagen membranes of dermal and pericardial origin-In vivo evolvement of vascularization over time. *J Biomed Mater Res A*, 108(12):2368-2378.
- Davidenko N, Schuster CF, Bax DV, Raynal N, Farndale RW, Best SM, Cameron RE. (2015) Control of crosslinking for tailoring collagen-based scaffolds stability and mechanics. *Acta Biomater*, 25:131-142.
- de Sousa Gomes P, Daugela P, Poskevicius L, Mariano L, Fernandes MH. (2019) Molecular and Cellular Aspects of Socket Healing in the Absence and Presence of Graft Materials and Autologous Platelet Concentrates: a Focused Review. *J Oral Maxillofac Res*, 5;10(3):e2.
- Delgado LM, Bayon Y, Pandit A, Zeugolis DI. (2015) To cross-link or not to cross-link? Cross-linking associated foreign body response of collagen-based devices. *Tissue Eng Part B Rev*, 21(3):298-313.
- Dennes TJ, Schwartz J. (2008) Controlling cell adhesion on polyurethanes. *Soft Matter*, 4(1):86-89.
- Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso MD, Kang BS, Nally M, Lanata N, Wang HL, Quirynen M. (2018) The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*, 29(2):171-184.
- Ekström K, Omar O, Granéli C, Wang X, Vazirisani F, Thomsen P. (2013) Monocyte exosomes stimulate the osteogenic gene expression of mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 18;8(9):e75227.
- El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X, Al-Maawi S, Orłowska A, Dias A, Booms P, Dohle E, Sader R, Kirkpatrick CJ, Choukroun J, Ghanaati S. (2017) Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). *Eur J Trauma Emerg Surg*, 45(3):467-479.

- Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. (2017) Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci*, 125(5):315-337.
- Fan L, Ren Y, Emmert S, Vučković I, Stojanovic S, Najman S, Schnettler R, Barbeck M, Schenke-Layland K, Xiong X. (2023) The Use of Collagen-Based Materials in Bone Tissue Engineering. *Int J Mol Sci*, 13;24(4):3744.
- Fernández-Montes Moraleda B, San Román J, Rodríguez-Lorenzo LM. (2016) Adsorption and conformational modification of fibronectin and fibrinogen adsorbed on hydroxyapatite. A QCM-D study. *J Biomed Mater Res A*, 104(10):2585-94.
- Fidler AL, Boudko SP, Rokas A, Hudson BG. (2018) The triple helix of collagens - an ancient protein structure that enabled animal multicellularity and tissue evolution. *J Cell Sci*, 9;131(7):jcs203950.
- Flaig It, Radenković M†, Najman S, Pröhl A, Jung O, Barbeck M. (2020) In Vivo Analysis of the Biocompatibility and Immune Response of Jellyfish Collagen Scaffolds and its Suitability for Bone Regeneration. *Int J Mol Sci*, 25;21(12):4518.
- Floege J, Eitner F, Alpers CE. (2008) A new look at platelet-derived growth factor in renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 19(1):12-23.
- Fontes CER, Mardegam MJ, Prado-Filho OR, Ferreira MV. (2018) COMPARATIVE ANALYSIS OF SURGICAL HEMOSTATIC SPONGES IN LIVER INJURY: STUDY IN RATS. *Arq Bras Cir Dig*, 1;31(1):e1342.
- Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. (2009) Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med*, 37(11):2259-72.
- Franchi M, Trirè A, Quaranta M, Orsini E, Ottani V. (2007) Collagen structure of tendon relates to function. *ScientificWorldJournal*, 30;7:404-20.
- Frangogiannis NG. (2015) Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration. *Curr Opin Cardiol*, 30(3):240-5.
- Friess W. (1998) Collagen--biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 45(2):113-36.
- Gallo N, Natali ML, Sannino A, Salvatore L. (2020) An Overview of the Use of Equine Collagen as Emerging Material for Biomedical Applications. *J Funct Biomater*, 1;11(4):79.
- George J, Kuboki Y, Miyata T. (2006) Differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts on honeycomb collagen scaffolds. *Biotechnol Bioeng*, 20;95(3):404-11.
- Gerlach RF, Demacq C, Jung K, Tanus-Santos JE. (2007) Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clin Biochem*, 40(1-2):119-23.

- Ghanaati S, Barbeck M, Hilbig U, Hoffmann C, Unger RE, Sader RA, Peters F, Kirkpatrick CJ. (2011) An injectable bone substitute composed of beta-tricalcium phosphate granules, methylcellulose and hyaluronic acid inhibits connective tissue influx into its implantation bed in vivo. *Acta Biomater*, 7(11):4018-28.
- Ghanaati S, Barbeck M, Orth C, Willershausen I, Thimm BW, Hoffmann C, Rasic A, Sader RA, Unger RE, Peters F, Kirkpatrick CJ. (2010) Influence of β -tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo. *Acta Biomater*, 6(12):4476-87. doi: 10.1016/j.actbio.2010.07.006.
- Ghanaati S, Schlee M, Webber MJ, Willershausen I, Barbeck M, Balic E, Görlach C, Stupp SI, Sader RA, Kirkpatrick CJ. (2011) Evaluation of the tissue reaction to a new bilayered collagen matrix in vivo and its translation to the clinic. *Biomed Mater*, Feb;6(1):015010. doi: 10.1088/1748-6041/6/1/015010.
- Ghanaati S. (2012) Non-cross-linked porcine-based collagen I-III membranes do not require high vascularization rates for their integration within the implantation bed: a paradigm shift. *Acta Biomater*, 8(8):3061-72. doi: 10.1016/j.actbio.2012.04.041.
- Goodarzi H, Jadidi K, Pourmotabed S, Sharifi E, Aghamollaei H. (2019) Preparation and in vitro characterization of cross-linked collagen-gelatin hydrogel using EDC/NHS for corneal tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol*, 1;126:620-632.
- Gorlov IF, Titov EI, Semenov GV, Slozhenkina MI, Sokolov AY, Omarov RS, Goncharov AI, Zlobina EY, Litvinova EV, Karpenko EV. (2018) Collagen from porcine skin: A method of extraction and structural properties. *Int J Food Prop*, 21:1031–1042.
- Griffin MF, Ibrahim A, Seifalian AM, Butler PEM, Kalaskar DM, Ferretti P. (2017) Chemical group-dependent plasma polymerisation preferentially directs adipose stem cell differentiation towards osteogenic or chondrogenic lineages. *Acta Biomater*, 1;50:450-461.
- Gueldenpfennig T, Houshmand A, Najman S, Stojanovic S, Korzinskas T, Smeets R, Gosau M, Pissarek J, Emmert S, Jung O, Barbeck M. (2020) The Condensation of Collagen Leads to an Extended Standing Time and a Decreased Pro-inflammatory Tissue Response to a Newly Developed Pericardium-based Barrier Membrane for Guided Bone Regeneration. *In Vivo*, 34(3):985-1000.
- Hankey DP, McCabe RE, Doherty MJ, Nolan PC, McAlinden MG, Nelson J, Wilson DJ. (2001) Enhancement of human osteoblast proliferation and phenotypic expression when cultured in human serum. *Acta Orthop Scand*, 72(4):395-403.
- Herrera-Vizcaíno C, Al-Maawi S, Sader R, Kirkpatrick CJ, Choukroun J, Ghanaati S. (2020) Modification of collagen-based sponges can induce an upshift of the early inflammatory

- response and a chronic inflammatory reaction led by M1 macrophages: an in vivo study. *Clin Oral Invest*, 24(10):3485–500.
- Hirsh SL, McKenzie DR, Nosworthy NJ, Denman JA, Sezerman OU, Bilek MM. (2013) The Vroman effect: competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 1;103:395-404.
- Horowitz MC, Coleman DL, Ryabry JT and Einhorn TA. (1989) Osteotropic agents induce the differential secretion of granulocyte-macrophage colony stimulating factor by the osteoblast cell line MCT3-E1. *J Bone Mineral Res*, 4: 911-921.
- Hrubec TC, Whichard JM, Larsen CT, Pierson FW. (2002) Plasma Versus Serum: Specific Differences in Biochemical Analyte Values. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 16(2):101-105.
- Hu WJ, Eaton JW, Ugarova TP, Tang L. Molecular basis of biomaterial-mediated foreign body reactions. (2001) *Blood*, 15;98(4):1231-8.
- Issaq HJ, Xiao Z, Veenstra TD. (2007) Serum and Plasma Proteomics. *Chem Rev*, 107(8):3601-3620.
- Jeyachandran YL, Mielczarski E, Rai B, Mielczarski JA. (2009) Quantitative and qualitative evaluation of adsorption/desorption of bovine serum albumin on hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Langmuir*, 6;25(19):11614-20.
- Jin X, Park JY, Lee JS, Jung UW, Choi SH, Cha JK. (2023) Tissue integration patterns of non-crosslinked and crosslinked collagen membranes: an experimental *in vivo* study. *J Periodontal Implant Sci*. 53(3):207-217.
- Jonsson A, Hjalmarsson C, Falk P, Ivarsson ML. (2016) Levels of matrix metalloproteinases differ in plasma and serum - aspects regarding analysis of biological markers in cancer. *Br J Cancer*, 6;115(6):703-6.
- Jung K, Lein M, Laube C, Lichtinghagen R. (2001) Blood specimen collection methods influence the concentration and the diagnostic validity of matrix metalloproteinase 9 in blood. *Clin Chim Acta*, 314(1-2):241-4.
- Jung K, Meisser A, Bischof P. (2005) Blood sampling as critical preanalytical determinant to use circulating MMP and TIMP as surrogate markers for pathological processes. *Int J Cancer*, 10;116(6):1000-3.
- Jung K, Nowak L, Lein M, Henke W, Schnorr D, Loening SA. (1996) Role of specimen collection in preanalytical variation of metalloproteinases and their inhibitors in blood. *Clin Chem*, 42(12):2043-5.

- Jung O, Hesse B, Stojanovic S, Seim C, Weitkamp T, Batinic M, Goerke O, Kačarević ŽP, Rider P, Najman S, Barbeck M. (2021) Biocompatibility Analyses of HF-Passivated Magnesium Screws for Guided Bone Regeneration (GBR). *Int J Mol Sci*, 22;22(22):12567.
- Jung O, Radenkovic M, Stojanović S, Lindner C, Batinic M, Görke O, Pissarek J, Pröhl A, Najman S, Barbeck M. (2020) *In Vitro* and *In Vivo* Biocompatibility Analysis of a New Transparent Collagen-based Wound Membrane for Tissue Regeneration in Different Clinical Indications. *In Vivo*, 34(5):2287-2295.
- Junqueira, L. C. U., & Carneiro, J. (2005). *Basic Histology: Text & Atlas*. McGraw-Hill. <https://books.google.rs/books?id=IYHBfPfnOx0C>
- Kälvegren H, Jönsson S, Jonasson L. (2011) Release of matrix metalloproteinases-1 and -2, but not -9, from activated platelets measured by enzyme-linked immunosorbent assay. *Platelets*, 22(8):572-8.
- Kamimura W, Koyama H, Miyata T, Takato T. (2014) Sugar-based crosslinker forms a stable atelocollagen hydrogel that is a favorable microenvironment for 3D cell culture. *J Biomed Mater Res A*, 102(12):4309-16.
- Kapogianni E, Alkildani S, Radenkovic M, Xiong X, Krastev R, Stöwe I, Bielenstein J, Jung O, Najman S, Barbeck M, Rothamel D. (2021) The Early Fragmentation of a Bovine Dermis-Derived Collagen Barrier Membrane Contributes to Transmembraneous Vascularization-A Possible Paradigm Shift for Guided Bone Regeneration. *Membranes (Basel)*, 11(3):185.
- Karp JM, Sarraf F, Shoichet MS, Davies JE. (2004) Fibrin-filled scaffolds for bone-tissue engineering: An in vivo study. *J Biomed Mater Res A*, 1;71(1):162-71.
- Kawasaki S, Origasa H, Tetens V, Kobayashi M. (2017) Comparison of TachoSil and TachoComb in patients undergoing liver resection-a randomized, double-blind, non-inferiority trial. *Langenbecks Arch Surg*, 402(4):591-598.
- Kayed HR, Sizeland KH, Kirby N, Hawley A, Mudie ST, Haverkamp RG. (2015) Collagen cross linking and fibril alignment in pericardium. *RSC Adv*, 5(5):3611-3618.
- Khorrarnirouz R, Go JL, Noble C, Jana S, Maxson E, Lerman A, Young MD. (2018) A novel surgical technique for a rat subcutaneous implantation of a tissue engineered scaffold. *Acta Histochem*, 120(3):282-291.
- Kimball DB Jr, Rickles FR, Gockerman JP, Hattler BG, Light JA, Conrad ME. (1976) Procoagulant and platelet aggregating properties of antilymphocyte sera. *J Lab Clin Med*, (5):868-81.
- Kinoshita S, Mera K, Ichikawa H, Shimasaki S, Nagai M, Taga Y, Iijima K, Hattori S, Fujiwara Y, Shirakawa JI, Nagai R. (2019) *N*ω-(Carboxymethyl)arginine Is One of the Dominant Advanced Glycation End Products in Glycated Collagens and Mouse Tissues. *Oxid Med Cell Longev*, 10;2019:9073451.

- Kolar P, Schmidt-Bleek K, Schell H, Gaber T, Toben D, Schmidmaier G, Perka C, Buttgerit F, Duda GN. (2010) The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue Eng Part B Rev*, 16(4):427-34.
- Korzinskas T, Jung O, Smeets R, Stojanovic S, Najman S, Glenske K, Hahn M, Wenisch S, Schnettler R, Barbeck M. (2018) In Vivo Analysis of the Biocompatibility and Macrophage Response of a Non-Resorbable PTFE Membrane for Guided Bone Regeneration. *Int J Mol Sci*, 27;19(10):2952.
- Kronenberg F, Trenkwalder E, Kronenberg MF, König P, Utermann G, Dieplinger H. (1998) Influence of hematocrit on the measurement of lipoproteins demonstrated by the example of lipoprotein(a). *Kidney Int*, 54(4):1385-9.
- Kubesch A, Barbeck M, Al-Maawi S, Orłowska A, Booms PF, Sader RA, Miron RJ, Kirkpatrick CJ, Choukroun J, Ghanaati S. (2019) A low-speed centrifugation concept leads to cell accumulation and vascularization of solid platelet-rich fibrin: an experimental study in vivo. *Platelets*, 30(3):329-340.
- Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. (2003). *Robbins basic pathology* (7th ed., Updated ed). Saunders
- Kunert-Keil C, Gredes T, Heinemann F, Dominiak M, Botzenhart U, Gedrange T. (2015) Socket augmentation using a commercial collagen-based product--an animal study in pigs. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 46:177-83.
- Ladenson JH, Tsai LM, Michael JM, Kessler G, Joist JH. (1974) Serum versus heparinized plasma for eighteen common chemistry tests: is serum the appropriate specimen? *Am J Clin Pathol*, 62:545-552.
- Lang S, Loibl M, Herrmann M. (2018) Platelet-Rich Plasma in Tissue Engineering: Hype and Hope. *Eur Surg Res*, 59(3-4):265-275.
- Latour, R. Biomaterials: Protein-Surface Interactions. In *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering, Second Edition—Four Volume Set*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2008; pp. 270-284. [CrossRef]
- Lauer-Fields JL, Juska D, Fields GB. (2002) Matrix metalloproteinases and collagen catabolism. *Biopolymers*, 66(1):19-32.
- Laurens N, Koolwijk P, de Maat MP. (2006) Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost*, 4(5):932-9.
- Lee EU, Kim DJ, Lim HC, Lee JS, Jung UW, Choi SH. (2015) Comparative evaluation of biphasic calcium phosphate and biphasic calcium phosphate collagen composite on osteoconductive potency in rabbit calvarial defect. *Biomater Res*, 12;19:1.

- Lee SW, Kim SG. (2014) Membranes for the Guided Bone Regeneration. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*, 36(6):239-46.
- Lein M, Nowak L, Jung K, Koenig F, Lichtinghagen R, Schnorr D, Loening SA. (1997) Analytical aspects regarding the measurement of metalloproteinases and their inhibitors in blood. *Clin Biochem*, 30(6):491-6.
- Li J, Chen M, Wei X, Hao Y, Wang J. (2017) Evaluation of 3D-Printed Polycaprolactone Scaffolds Coated with Freeze-Dried Platelet-Rich Plasma for Bone Regeneration. *Materials (Basel)*, 19;10(7):831.
- Li J, Zhao J, Xu Y, Xu A, He F. (2023) Titanium surface interacting with blood clot enhanced migration and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Front Bioeng Biotechnol*, 11:1136406.
- Lin DT, Young TH, Fang Y. (2001) Studies on the effect of surface properties on the biocompatibility of polyurethane membranes. *Biomaterials*, 22(12):1521-9.
- Lin K, Zhang D, Macedo MH, Cui W, Sarmiento B, Shen G. (2019) Advanced Collagen-Based Biomaterials for Regenerative Biomedicine. *Adv Funct Mater*, 29(3):1804943.
- Lindner C, Alkildani S, Stojanovic S, Najman S, Jung O, Barbeck M. (2022) In Vivo Biocompatibility Analysis of a Novel Barrier Membrane Based on Bovine Dermis-Derived Collagen for Guided Bone Regeneration (GBR). *Membranes*, 12(4):378.
- Lindner C, Pröhl A, Abels M, Löffler T, Batinic M, Jung O, Barbeck M. (2020). Specialized Histological and Histomorphometrical Analytical Methods for Biocompatibility Testing of Biomaterials for Maxillofacial Surgery in (Pre-) Clinical Studies. *In Vivo*, 34(6), 3137–3152.
- Liu W, Kang N, Seriwatanachai D, Dong Y, Zhou L, Lin Y, Ye L, Liang X, Yuan Q. (2016). Chronic Kidney Disease Impairs Bone Defect Healing in Rats. *Scientific Reports*, 6(1), 23041.
- Lorenz J, Barbeck M, Kirkpatrick CJ, Sader R, Lerner H, Ghanaati S. (2018) Injectable Bone Substitute Material on the Basis of β -TCP and Hyaluronan Achieves Complete Bone Regeneration While Undergoing Nearly Complete Degradation. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 33(3):636–644.
- Lu HH, Vo JM, Chin HS, Lin J, Cozin M, Tsay R, Eisig S, Landesberg R. (2008) Controlled delivery of platelet-rich plasma-derived growth factors for bone formation. *J Biomed Mater Res A*, 15;86(4):1128-36.
- Lum G, Gambino SR. A Comparison of Serum versus Heparinized Plasma for Routine Chemistry Tests. (1974) *Am J Clin Pathol*, 61(1):108-113.

- Malhotra A, Pelletier MH, Yu Y, Walsh WR. (2013) Can platelet-rich plasma (PRP) improve bone healing? A comparison between the theory and experimental outcomes. *Arch Orthop Trauma Surg*, 133(2):153-65.
- Mannello F, Tanus-Santos JE, Meschiari CA, Tonti GA. (2008) Differences in both matrix metalloproteinase 9 concentration and zymographic profile between plasma and serum with clot activators are due to the presence of amorphous silica or silicate salts in blood collection devices. *Anal Biochem*, 1;374(1):56-63.
- Mannello F, Tonti GA, Canestrari F. (2007) The 'never-ending story' of the influence of blood specimen collection methods affecting the concentration, the zymographic profile and the usefulness of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in multiple sclerosis diagnosis/prognosis: a landmark for limiting the misuse of serum samples. *Mult Scler*, 13:687–690.
- Mannello F. (2003) Effects of blood collection methods on gelatin zymography of matrix metalloproteinases. *Clin Chem*, 49(2):339-40.
- Marques D, Teixeira LN, Elias CN, Lemos AB, Martinez EF. (2023) Surface topography of resorbable porcine collagen membranes, and their effect on early osteogenesis: An in vitro study. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*, 124(6S):101607.
- Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. (1998) Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 85(6):638-46.
- Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. (2004) *J Oral Maxillofac Surg*, 62(4):489-96.
- Masuhara K, Nakai T, Yamaguchi K, Yamasaki S, Sasaguri Y. (2002) Significant increases in serum and plasma concentrations of matrix metalloproteinases 3 and 9 in patients with rapidly destructive osteoarthritis of the hip. *Arthritis & Rheumatism*, 46(10):2625-2631.
- Mazlyzam AL, Aminuddin BS, Saim L, Ruszymah BHI. (2008) Human Serum Is an Advantageous Supplement for Human Dermal Fibroblast Expansion: Clinical Implications for Tissue Engineering of Skin. *Archives of Medical Research*, 39(8):743-752.
- McAlinden MG, Wilson DJ. (2000) Comparison of cancellous bone-derived cell proliferation in autologous human and fetal bovine serum. *Cell Transplant*, 9(4):445-51.
- McDade JK, Brennan-Pierce EP, Ariganello MB, Labow RS, Michael Lee J. (2013) Interactions of U937 macrophage-like cells with decellularized pericardial matrix materials: influence of crosslinking treatment. *Acta Biomater*, 9(7):7191-9.

- McGovern JA, Griffin M, Hutmacher DW. (2018) Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. *Dis Model Mech*, 23;11(4):dmm033084.
- Meder F, Daberkow T, Treccani L, Wilhelm M, Schowalter M, Rosenauer A, Mädler L, Rezwani K. (2012) Protein adsorption on colloidal alumina particles functionalized with amino, carboxyl, sulfonate and phosphate groups. *Acta Biomater*, 8(3):1221-9.
- Mercado-Pagán ÁE, Stahl AM, Shanjani Y, Yang Y. (2015) Vascularization in bone tissue engineering constructs. *Ann Biomed Eng*, 43(3):718-29.
- Merli M, Moscatelli M, Mariotti G, Pagliaro U, Raffaelli E, Nieri M. (2018) Comparing membranes and bone substitutes in a one-stage procedure for horizontal bone augmentation. Three-year post-loading results of a double-blind randomised controlled trial. *Eur J Oral Implantol*, 11(4):441-452.
- Meyer M. (2019) Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. *Biomed Eng Online*, 18;18(1):24.
- Mian M, Beghè F, Mian E. (1992) Collagen as a pharmacological approach in wound healing. *Int J Tissue React*, 14 Suppl:1-9.
- Mijiritsky E, Assaf HD, Peleg O, Shacham M, Cerroni L, Mangani L. (2021) Use of PRP, PRF and CGF in Periodontal Regeneration and Facial Rejuvenation-A Narrative Review. *Biology (Basel)*, 10;10(4):317.
- Miki A, Inaba S, Baba T, Kihira K, Fukada H, Oda M. (2015) Structural and physical properties of collagen extracted from moon jellyfish under neutral pH conditions. *Biosci Biotechnol Biochem*, 79(10):1603-7.
- Milillo L, Cinone F, Lo Presti F, Lauritano D, Petrucci M. (2021) The Role of Blood Clot in Guided Bone Regeneration: Biological Considerations and Clinical Applications with Titanium Foil. *Materials (Basel)*, 4;14(21):6642.
- Minors DS. (2007) Haemostasis, blood platelets and coagulation. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 8(5):214-216.
- Moses O, Vitrial D, Aboodi G, Sculean A, Tal H, Kozlovsky A, Artzi Z, Weinreb M, Nemcovsky CE. (2008) Biodegradation of three different collagen membranes in the rat calvarium: a comparative study. *J Periodontol*, 79(5):905-11.
- Moutsaki D, Mancuso P, Krutzsch H, Stetler-Stevenson W, Zucker S. (1992) Characterization of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human plasma. *Connect Tissue Res*, 28(3):213-30.
- Mouw JK, Ou G, Weaver VM. (2014) Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(12):771-85.

- Najman SJ, Cvetković VJ, Najdanović JG, Stojanović S, Vukelić-Nikolić MĐ, Vučković I, Petrović D. (2016) Ectopic osteogenic capacity of freshly isolated adipose-derived stromal vascular fraction cells supported with platelet-rich plasma: A simulation of intraoperative procedure. *J Craniomaxillofac Surg*, 44(10):1750-1760.
- Nami N, Feci L, Napoliello L, Giordano A, Lorenzini S, Galeazzi M, Rubegni P, Fimiani M. (2016) Crosstalk between platelets and PBMC: New evidence in wound healing. *Platelets*, 27(2):143-8.
- Neto AMD, Sartoretto SC, Duarte IM, Resende RFB, Neves Novellino Alves AT, Mourão CFAB, Calasans-Maia J, Montemezzi P, Tristão GC, Calasans-Maia MD. (2020) In Vivo Comparative Evaluation of Biocompatibility and Biodegradation of Bovine and Porcine Collagen Membranes. *Membranes (Basel)*, 15;10(12):423.
- Nguyen DHK, Pham VTH, Al Kobaisi M, Bhadra C, Orłowska A, Ghanaati S, Manzi BM, Baulin VA, Joudkazis S, Kingshott P, Crawford RJ, Ivanova EP. (2016) Adsorption of Human Plasma Albumin and Fibronectin onto Nanostructured Black Silicon Surfaces. *Langmuir*, 18;32(41):10744-10751.
- Nicosia RF, Belser P, Bonanno E, Diven J. Regulation of angiogenesis in vitro by collagen metabolism. (1991) *In Vitro Cell Dev Biol*, 27A(12):961-6.
- Nurden AT. (2011) Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost*, 105 Suppl 1:S13-33.
- Oberdiek F, Vargas CI, Rider P, Batinic M, Görke O, Radenković M, Najman S, Baena JM, Jung O, Barbeck M. (2021) Ex Vivo and In Vivo Analyses of Novel 3D-Printed Bone Substitute Scaffolds Incorporating Biphasic Calcium Phosphate Granules for Bone Regeneration. *Int J Mol Sci*, 30;22(7):3588.
- Oh JH, Kim HJ, Kim TI, Baek JH, Ryoo HM, Woo KM. (2012) The effects of the modulation of the fibronectin-binding capacity of fibrin by thrombin on osteoblast differentiation. *Biomaterials*, 33(16):4089-99.
- Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. (1997) Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem*, 24;272(4):2446-51.
- Oishi Y, Manabe I. (2018) Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *Int Immunol*, 29;30(11):511-528.
- Oliveira MN, Varela HA, Nascimento RM, Sahoo N, Carvalho O, Henriques B, Souza JCM. (2024) Injectable Platelet-Rich Fibrin in Contact with Bone Substitutes, Porous Zirconia, or

- Laser-Textured Implant Surfaces: A Detailed Morphological Analysis. *Biomedical Materials & Devices*, 2(1):415-426.
- Omar O, Elgali I, Dahlin C, Thomsen P. (2019) Barrier membranes: More than the barrier effect? *J Clin Periodontol*, 46 Suppl 21(Suppl Suppl 21):103-123.
- Ortolani E, Quadrini F, Bellisario D, Santo L, Polimeni A, Santarsiero A. (2015) Mechanical qualification of collagen membranes used in dentistry. *Ann Ist Super Sanita*, (3):229-35.
- Oryan A, Alidadi S, Moshiri A. Platelet-rich plasma for bone healing and regeneration. (2016) *Expert Opin Biol Ther*, 16(2):213-32.
- Owens KW, Yukna RA. (2001) Collagen Membrane Resorption in Dogs: A Comparative Study. *Implant Dent*, 10(1):49-58.
- Peric M, Dumic-Cule I, Grcevic D, Matijasic M, Verbanac D, Paul R, Grgurevic L, Trkulja V, Bagi CM, Vukicevic S. (2015) The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. *Bone*, 70:73-86.
- Perut F, Filardo G, Mariani E, Cenacchi A, Pratelli L, Devescovi V, Kon E, Marcacci M, Facchini A, Baldini N, Granchi D. (2013) Preparation method and growth factor content of platelet concentrate influence the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Cytotherapy*, 15(7):830-9.
- Privalov PL. Stability of proteins. (1982) Proteins which do not present a single cooperative system. *Adv Protein Chem*, 35:1-104.
- Pröhl A, Batinic M, Alkildani S, Hahn M, Radenkovic M, Najman S, Jung O, Barbeck M. (2021) In Vivo Analysis of the Biocompatibility and Bone Healing Capacity of a Novel Bone Grafting Material Combined with Hyaluronic Acid. *Int J Mol Sci*, 1;22(9):4818.
- Pryor ME, Yang J, Polimeni G, Koo KT, Hartman MJ, Gross H, Agelan A, Manns JM, Wikesjö UM. (2005) Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: radiographic observations. *J Periodontol*, (8):1287-92.
- Radenković M, Alkildani S, Stoewe I, Bielenstein J, Sundag B, Bellmann O, Jung O, Najman S, Stojanović S, Barbeck M. (2021) Comparative In Vivo Analysis of the Integration Behavior and Immune Response of Collagen-Based Dental Barrier Membranes for Guided Bone Regeneration (GBR). *Membranes (Basel)*, 15;11(9):712.
- Radenković Stošić M, Stojanović S, Tomić M, Živković J, Kovačević P, Najman S. Subcutaneous tissue response to the two implanted collagen-based membranes of different origin. *Acta Medica Medianae* 2024. doi:10.5633/amm.2024.0314, Accepted for publication, Retrieved May 23, 2024, from: https://publisher.medfak.ni.ac.rs/AMM_1/accepted/2023-3broj/celi_radovi/55.Milena%20Radenkovic%20Stosic.pdf

- Rand ML, Wang H, Bang KW, Teitel JM, Blanchette VS, Freedman J, Nurden AT. (2010) Phosphatidylserine exposure and other apoptotic-like events in Bernard-Soulier syndrome platelets. *Am J Hematol*, 85(8):584-92.
- Razmara F, Bayat M, Shirian S, Shirian S, Shabankare G, Mohamadnia A, Mortazavi M, Alijani MR, Bahrami N. (2021) Application of a collagen scaffold saturated with platelet-rich plasma in prevention of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in the rat animal model. *Heliyon*, 7(5):e06930.
- Ren Y, Liu L, Xiong X, Krastev R, Smeets R, Rimashevskiy D, Schnettler R, Alkildani S, Emmert S, Jung O, Barbeck M. (2023) Suitability of *R. pulmo* Jellyfish-Collagen-Coated Well Plates for Cytocompatibility Analyses of Biomaterials. *Int J Mol Sci*, 3;24(3):3007.
- Renné T, Gailani D. (2007) Role of Factor XII in hemostasis and thrombosis: clinical implications. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 5(4):733-41.
- Rittié L. (2017) Type I Collagen Purification from Rat Tail Tendons. *Methods Mol Biol*, 1627:287-308.
- Rodriguez IA, Growney Kalaf EA, Bowlin GL, Sell SA. (2014) Platelet-rich plasma in bone regeneration: engineering the delivery for improved clinical efficacy. *Biomed Res Int*, 2014;2014:392398.
- Roohpour N, Wasikiewicz JM, Moshaverinia A, Paul D, Grahn MF, Rehman IU, Vadgama P. (2010) Polyurethane Membranes Modified with Isopropyl Myristate as a Potential Candidate for Encapsulating Electronic Implants: A Study of Biocompatibility and Water Permeability. *Polymers*, 2(3):102-119.
- Rothamel D, Schwarz F, Fienitz T, Smeets R, Dreiseidler T, Ritter L, Happe A, Zöller J. (2012) Biocompatibility and biodegradation of a native porcine pericardium membrane: results of in vitro and in vivo examinations. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 27(1):146-54.
- Rothamel D, Schwarz F, Sager M, Herten M, Sculean A, Becker J. (2005) Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: An experimental study in the rat. *Clinical Oral Implants Research*, 16(3), 369–378.
- Salvatore L, Gallo N, Aiello D, Lunetti P, Barca A, Blasi L, Madaghiele M, Bettini S, Giancane G, Hasan M, Borovkov V, Natali ML, Campa L, Valli L, Capobianco L, Napoli A, Sannino A. (2020) An insight on type I collagen from horse tendon for the manufacture of implantable devices. *Int J Biol Macromol*, 1;154:291-306.
- Sanders DL, Kingsnorth AN. (2012) Prosthetic mesh materials used in hernia surgery. *Expert Rev Med Devices*, 9(2):159-79. doi: 10.1586/erd.11.65.

- San-Marina S, Bowen AJ, Oldenburg MS, Voss SG, Hunter DE, Macura S, Meloche R, Miller AL 2nd, Spragg AM, Ekblom DC. (2021) MRI Study of Jellyfish Collagen, Hyaluronic Acid, and Cadaveric Dermis for Injection Laryngoplasty. *Laryngoscope*, 131(8):E2452-E2460. doi: 10.1002/lary.29501.
- Santo L, Quadrini F, Bellisario D, Polimeni A, Santarsiero A. (2018) Variability of Mechanical Properties of Collagen Membranes used in Dentistry. *MatPlast*, 55(4):488-493.
- Sarkar MR, Augat P, Shefelbine SJ, Schorlemmer S, Huber-Lang M, Claes L, Kinzl L, Ignatius A. (2006) Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Biomaterials*, 27(9):1817-23.
- Sbricoli L, Guazzo R, Annunziata M, Gobatto L, Bressan E, Nastri L. (2020) Selection of Collagen Membranes for Bone Regeneration: A Literature Review. *Materials (Basel)*, 9;13(3):786.
- Schaefer S, Detsch R, Uhl F, Deisinger U, Ziegler G. (2011) How Degradation of Calcium Phosphate Bone Substitute Materials is influenced by Phase Composition and Porosity. *Advanced Engineering Materials*, 13(4):342-350.
- Schliephake H, Tavassol F, Gelinsky M, Dard M, Sewing A, Pompe W. (2004) Use of a mineralized collagen membrane to enhance repair of calvarial defects in rats. *Clin Oral Implants Res*, 15(1):112-8.
- Schmidt-Bleek K, Kwee BJ, Mooney DJ, Duda GN. (2015) Boon and Bane of Inflammation in Bone Tissue Regeneration and Its Link with Angiogenesis. *Tissue Eng Part B Rev*, 21(4):354-64.
- Schröger SV, Blatt S, Sagheb K, Al-Nawas B, Kämmerer PW, Sagheb K. (2024) Platelet-rich fibrin for rehydration and pre-vascularization of an acellular, collagen membrane of porcine origin. *Clin Oral Invest*, 28(1):99.
- Shapiro F. (2008) Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater*, 1;15:53-76.
- Sharma P, Maffulli N. (2005) Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am*, 87(1):187-202.
- Sheikh Z, Khan AS, Roohpour N, Glogauer M, Rehman IU. (2016) Protein adsorption capability on polyurethane and modified-polyurethane membrane for periodontal guided tissue regeneration applications. *Materials Science and Engineering: C*, 68:267-275.
- Shiu HT, Goss B, Lutton C, Crawford R, Xiao Y. (2014) Formation of blood clot on biomaterial implants influences bone healing. *Tissue Eng Part B Rev*, 20(6):697-712.
- Sieger D, Korzinskas T, Jung O, Stojanovic S, Wenisch S, Smeets R, Gosau M, Schnettler R, Najman S, Barbeck M. (2019) The Addition of High Doses of Hyaluronic Acid to a Biphasic

- Bone Substitute Decreases the Proinflammatory Tissue Response. *Int J Mol Sci*, 22;20(8):1969.
- Silvipriya K, Kumar K, Bhat A, Kumar B, John A, Lakshmanan P. (2015) Collagen: Animal Sources and Biomedical Application. *J App Pharm Sci*, 5(3):123-127.
- Song E, Yeon Kim S, Chun T, Byun HJ, Lee YM. (2006) Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. *Biomaterials*, 27(15):2951-61.
- Sparavigna A, Tateo A, Inselvini E, Tocchio M, Orlandini MC, Botali G. (2017) Anti-age activity and tolerance evaluation of collagen micro-injection treatment associated to topical application of a cosmetic formulation. *J Clin Exp Dermatol Res* 8(3):1000391.
- Sridharan R, Cameron AR, Kelly DJ, Kearney CJ, O'Brien FJ. (2015) Biomaterial based modulation of macrophage polarization: a review and suggested design principles. *Materials Today*, 18(6):313-325.
- Stevens MM. (2008) Biomaterials for bone tissue engineering. *Mater Today*, 11(5): 18-25. Sharma, P., Maffulli, N., 2005. Tendon injury and tendinopathy. *J Bone Jt Surg*, 87 (1), 187–202.
- Stojanović S, AlKhoury H, Radenković M, Cvetković V, Jablonska M, Schmelzer CEH, Syrowatka F, Živković JM, Groth T, Najman S. (2021) Tissue response to biphasic calcium phosphate covalently modified with either heparin or hyaluronic acid in a mouse subcutaneous implantation model. *J Biomed Mater Res A*, 109(8):1353-1365.
- Stover DA, Verrelli BC. (2011) Comparative vertebrate evolutionary analyses of type I collagen: potential of COL1a1 gene structure and intron variation for common bone-related diseases. *Mol Biol Evol*, 28(1):533-42.
- Street J, Winter D, Wang JH, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP. (2000) Is human fracture hematoma inherently angiogenic? *Clin Orthop Relat Res*, (378):224-37.
- Subhan F, Ikram M, Shehzad A, Ghafoor A. (2015) Marine Collagen: An Emerging Player in Biomedical applications. *J Food Sci Technol*, 52(8):4703-7.
- Sweeney SM, Guy CA, Fields GB, San Antonio JD. (1998) Defining the domains of type I collagen involved in heparin- binding and endothelial tube formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 23;95(13):7275-80.
- Szpak P. (2011) Fish bone chemistry and ultrastructure: implications for taphonomy and stable isotope analysis. *Journal of Archaeological Science*, 38(12):3358-3372.
- Teerlink T, Nijveldt RJ, de Jong S, van Leeuwen PAM. (2002) Determination of Arginine, Asymmetric Dimethylarginine, and Symmetric Dimethylarginine in Human Plasma and Other Biological Samples by High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry*, 303: 131–137.

- Terzi A, Storelli E, Bettini S, Sibillano T, Altamura D, Salvatore L, Madaghiele M, Romano A, Siliqi D, Ladisa M, De Caro L, Quattrini A, Valli L, Sannino A, Giannini C. (2018) Effects of processing on structural, mechanical and biological properties of collagen-based substrates for regenerative medicine. *Sci Rep*, 23;8(1):1429.
- Thubrikar MJ, Deck JD, Aouad J, Nolan SP. (1983) Role of mechanical stress in calcification of aortic bioprosthetic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 86(1):115-25.
- Tierney CM, Jaasma MJ, O'Brien FJ. (2009) Osteoblast activity on collagen-GAG scaffolds is affected by collagen and GAG concentrations. *J Biomed Mater Res A*, 91(1):92-101.
- Toledano M, Asady S, Toledano-Osorio M, García-Godoy F, Serrera-Figallo MA, Benítez-García JA, Osorio R. (2020) Differential Biodegradation Kinetics of Collagen Membranes for Bone Regeneration. *Polymers (Basel)*, 4;12(6):1290.
- Toledano M, Carrasco-Carmona Á, Medina-Castillo AL, Toledano-Osorio M, Osorio R. (2020) Protein adsorption and bioactivity of functionalized electrospun membranes for bone regeneration. *Journal of Dentistry*, 102:103473.
- Tu C, Chen J, Huang C, Xiao Y, Tang X, Li H, Ma Y, Yan J, Li W, Wu H, Liu C. (2020) Effects of electromagnetic fields treatment on rat critical-sized calvarial defects with a 3D-printed composite scaffold. *Stem Cell Res Ther*, 6;11(1):433.
- Vartio T, Baumann M. (1989) Human gelatinase/type IV procollagenase is a regular plasma component. *FEBS Lett*, 25;255(2):285-9.
- Vesely I, Boughner D, Song T. (1988) Tissue buckling as a mechanism of bioprosthetic valve failure. *Ann Thorac Surg*, 46(3):302-8.
- Vukelić-Nikolić MĐ, Najman SJ, Vasiljević PJ, Jevtović-Stoimenov TM, Cvetković VJ, Andrejev MN, Mitić ŽJ. (2018) Osteogenic capacity of diluted platelet-rich plasma in ectopic bone-forming model: Benefits for bone regeneration. *J Craniomaxillofac Surg*, 46(11):1911-1918.
- Wang HL, Miyauchi M, Takata T. (2002) Initial attachment of osteoblasts to various guided bone regeneration membranes: an in vitro study. *J Periodontal Res*, 37(5):340-4.
- Wang N, Liang H, Zen K. (2014) Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol*, 28;5:614. doi: 10.3389/fimmu.2014.00614.
- Wend S, Kubesch A, Orłowska A, Al-Maawi S, Zender N, Dias A, Miron RJ, Sader R, Booms P, Kirkpatrick CJ, Choukroun J, Ghanaati S. (2017) Reduction of the relative centrifugal force influences cell number and growth factor release within injectable PRF-based matrices. *J Mater Sci Mater Med*, 25;28(12):188.

- Whelan A, Duffy J, Gaul RT, O'Reilly D, Nolan DR, Gunning P, Lally C, Murphy BP. (2019) Collagen fibre orientation and dispersion govern ultimate tensile strength, stiffness and the fatigue performance of bovine pericardium. *J Mech Behav Biomed Mater*, 90:54-60.
- Widdowson JP, Picton AJ, Vince V, Wright CJ, Mearns-Spragg A. (2018) In vivo comparison of jellyfish and bovine collagen sponges as prototype medical devices. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 106(4):1524-1533.
- Willershausen I, Barbeck M, Boehm N, Sader R, Willershausen B, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S. (2014) Non-cross-linked collagen type I/III materials enhance cell proliferation: in vitro and in vivo evidence. *J Appl Oral Sci*, 22(1):29-37.
- Wiltfang J, Kloss FR, Kessler P, Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Zimmermann R, Schlegel KA. (2004) Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin Oral Implants Res*, 15(2):187-93.
- Wrotniak M, Bielecki T, Gaździk TS. (2007) Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery. *Ortop Traumatol Rehabil*, 9(3):227-38.
- Xu W, Spilker G, Weinand C. (2015) Methodological Consideration of Various Intraosseous and Heterotopic Bone Grafts Implantation in Animal Models. *J Tissue Sci Eng*, 6: 1-8.
- Yahyouche A, Zhidao X, Czernuszka JT, Clover AJ. (2011) Macrophage-mediated degradation of crosslinked collagen scaffolds. *Acta Biomater*, 7(1):278-86.
- Yamamoto N, Isobe M, Negishi A, Yoshimasu H, Shimokawa H, Ohya K, Amagasa T, Kasugai S. (2003) Effects of autologous serum on osteoblastic differentiation in human bone marrow cells. *J Med Dent Sci*, 50(1):63-9.
- Yarovaya GA, Blokhina TB, Neshkova EA. (2002) Contact system. New concepts on activation mechanisms and bioregulatory functions. *Biochemistry (Mosc)*, 67(1):13-24.
- Zeugolis DI, Paul GR, Attenburrow G. (2009) Cross-linking of extruded collagen fibers--a biomimetic three-dimensional scaffold for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A*, 15;89(4):895-908.
- Zhang Y, Zhang X, Shi B, Miron R. (2013) Membranes for guided tissue and bone regeneration. *Annals of Oral and Maxillofacial Surgery*, 01;1(1):10.
- Zhuo R, Miller R, Bussard KM, Siedlecki CA, Vogler EA. (2005) Procoagulant stimulus processing by the intrinsic pathway of blood plasma coagulation. *Biomaterials*, 26(16):2965-73.
- Zitka O, Kukacka J, Krizkova S, Huska D, Adam V, Masarik M, Prusa R, Kizek R. (2010) Matrix metalloproteinases. *Curr Med Chem*, 17(31):3751-68.

- Zitzmann NU, Naef R, Schärer P. (1997) Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 12(6):844-52.
- Zubery Y, Goldlust A, Alves A, Nir E. (2007) Ossification of a novel cross-linked porcine collagen barrier in guided bone regeneration in dogs. *J Periodontol*, 78(1):112-21.
- Zubery Y, Nir E, Goldlust A. (2008) Ossification of a collagen membrane cross-linked by sugar: a human case series. *J Periodontol*, 79(6):1101-7.
- Zucker S, Cao J. (2005) Measurement of matrix metalloproteinases in serum of patients with melanoma: snarled in technical pitfalls. *Clin Cancer Res*, 15;11(14):5069-70.

A decorative banner with a floral pattern and a central text box. The banner has a light gray background with a subtle, repeating pattern of flowers and leaves. The text "8. ПРИЛОЗИ" is centered in a bold, black, serif font. The banner has a pointed top and bottom edge.

8. ПРИЛОЗИ

8. ПРИЛОЗИ

БИОГРАФИЈА И БИБЛИОГРАФИЈА КАНДИДАТА

Биографија

Милена Б. Раденковић Стошић је рођена 13. јуна 1990. године у Нишу, Р. Србија. Основну школу и гимназију природно-математичког смера је завршила у Нишу. Школске 2009/10. је уписала основне академске студије на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу, на Департману за биологију и екологију. Основне академске студије је завршила 2012. године са звањем „Биолог“ и просечном оценом 9, 56. Милена Б. Раденковић Стошић је школске 2012/13. године уписала мастер академске студије на Департману за биологију и екологију, студијски програм Биологија, Природно-математичког факултета у Нишу које је завршила 2014. године одбраном мастер рада са оценом 10 и просечном оценом 9,71 у току студија. Докторске академске студије је уписала школске 2015/16. године на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу, на Департману за биологију и екологију, студијски програм Биологија.

Као стипендиста Министарства просвете Републике Србије, Милена Б. Раденковић Стошић је била ангажована на пројекту „Виртуелни коштаноглобни систем човека и његова примена у претклиничкој и клиничкој пракси“ (Ев бр: ИИИ41017). Запослена је као истраживач-приправник на истом пројекту од 2018. године, а као истраживач-сарадник на Медицинском факултету Универзитета у Нишу од 2020. године. Као истраживач је учествовала у једном међународном билатералном пројекту са Немачком и тренутно је ангажована на пројекту Призма Фонда за науку Републике Србије.

Библиографија

Милена Б. Раденковић Стошић је аутор или коаутор 13 радова категорије М20, једног рада категорије М50, и аутор или коаутор више саопштења са међународних скупова штампаних у целини или изводу.

Рад у врхунском међународном часопису – М21:

1. Alkildani S, Ren Y, Liu L, Rimashevskiy D, Schnettler R, Radenković M, et al. Analyses of the Cellular Interactions between the Ossification of Collagen-Based Barrier Membranes and the Underlying Bone Defects. *IJMS*. 2023 Apr 6;24(7):6833.
2. Bielenstein J, Radenković M, Najman S, Liu L, Ren Y, Cai B, et al. In Vivo Analysis of the Regeneration Capacity and Immune Response to Xenogeneic and Synthetic Bone Substitute Materials. *IJMS*. 2022 Sep 13;23(18):10636. doi: [10.3390/ijms231810636](https://doi.org/10.3390/ijms231810636)
3. Stöwe I, Pissarek J, Moosmann P, Pröhl A, Pantermehl S, Bielenstein J, et al. Ex Vivo and In Vivo Analysis of a Novel Porcine Aortic Patch for Vascular Reconstruction. *IJMS*. 2021 Jul 16;22(14):7623. doi: [10.3390/ijms22147623](https://doi.org/10.3390/ijms22147623)
4. Pröhl A, Batinic M, Alkildani S, Hahn M, Radenkovic M, Najman S, et al. In Vivo Analysis of the Biocompatibility and Bone Healing Capacity of a Novel Bone Grafting Material Combined with Hyaluronic Acid. *IJMS*. 2021 May 1;22(9):4818. doi: [10.3390/ijms22094818](https://doi.org/10.3390/ijms22094818)
5. Oberdiek F, Vargas CI, Rider P, Batinic M, Görke O, Radenković M, et al. Ex Vivo and In Vivo Analyses of Novel 3D-Printed Bone Substitute Scaffolds Incorporating Biphasic Calcium Phosphate Granules for Bone Regeneration. *IJMS*. 2021 Mar 30;22(7):3588. doi: [10.3390/ijms22073588](https://doi.org/10.3390/ijms22073588)
6. Stojanović S, AlKhoury H, Radenković M, et al. Tissue response to biphasic calcium phosphate covalently modified with either heparin or hyaluronic acid in a mouse subcutaneous implantation model. *J Biomed Mater Res*. Published online October 31, 2020:jbm.a.37126. doi:10.1002/jbm.a.37126
7. Flaig I*, **Radenković M***, Najman S, Pröhl A, Jung O, Barbeck M. In Vivo Analysis of the Biocompatibility and Immune Response of Jellyfish Collagen Scaffolds and its Suitability for Bone Regeneration. *IJMS*. 2020;21(12):4518. doi:10.3390/ijms21124518
8. Živković JM, Stojanović ST, Vukelić-Nikolić MĐ, et al. Macrophages' contribution to ectopic osteogenesis in combination with blood clot and bone substitute: possibility for application

in bone regeneration strategies. *International Orthopaedics*. Published online October 6, 2020. doi:10.1007/s00264-020-04826-0

Рад у истакнутом међународном часопису – M22:

1. **Radenković M***, Alkildani S*, Stoewe I, Bielenstein J, Sundag B, Bellmann O, et al. Comparative In Vivo Analysis of the Integration Behavior and Immune Response of Collagen-Based Dental Barrier Membranes for Guided Bone Regeneration (GBR). *Membranes*. 2021 Sep 15;11(9):712. doi: [10.3390/membranes11090712](https://doi.org/10.3390/membranes11090712)
2. Kapogianni E, Alkildani S, **Radenkovic M**, Xiong X, Krastev R, Stöwe I, et al. The Early Fragmentation of a Bovine Dermis-Derived Collagen Barrier Membrane Contributes to Transmembraneous Vascularization—A Possible Paradigm Shift for Guided Bone Regeneration. *Membranes*. 2021 Mar 9;11(3):185. doi: [10.3390/membranes11030185](https://doi.org/10.3390/membranes11030185)
3. Barbeck M, Jung O, Xiong X, Krastev R, Korzinskas T, Najman S, **Radenković M**, Wegner N, Knyazeva M, Walther F. Balancing Purification and Ultrastructure of Naturally Derived Bone Blocks for Bone Regeneration: Report of the Purification Effort of Two Bone Blocks. *Materials*. 2019; 12(19): 3234.

Рад у међународном часопису – M23:

1. Barbeck M, Alkildani S, Mandlule A, **Radenković M**, Najman S, Stojanović S, et al. *In Vivo* Analysis of the Immune Response to Strontium- and Copper-doped Bioglass. *In Vivo*. 2022;36(5):2149–65. doi: 10.21873/invivo.12941
2. Jung O, **Radenkovic M**, Stojanović S, et al. *In Vitro* and *In Vivo* Biocompatibility Analysis of a New Transparent Collagen-based Wound Membrane for Tissue Regeneration in Different Clinical Indications. *In Vivo*. 2020;34(5):2287-2295. doi:10.21873/invivo.12040

Радови у осталим часописима

1. Hautmann A, Kedilaya D, Stojanović S, **Radenković M**, Marx CK, Najman S, et al. Free-standing multilayer films as growth factor reservoirs for future wound dressing applications. *Biomaterials Advances*. 2022 Nov;142:213166. doi: 10.1016/j.bioadv.2022.213166

2. Najman S, Stojanović S, Živković J, Najdanović J, **Radenković M**, Vasiljević P, Ignjatović N. Applications of biomaterials in regenerative medicine and tissue engineering – concepts and perspective. in Contemporary Materials 2023;14(1). DOI 10.7251/COMEN2301001N

Рад у врхунском часопису националног значаја - M51:

1. Živković JM, Vukelić-Nikolić MĐ, Najdanović JG, Stojanović S, Vitorović JS, **Radenković MB**, Najman SJ. Bone tissue engineering based on bone marrow in blood clot loaded on mineral matrix carrier: experimental study in subcutaneous mice model. Acta medica Medianae 2017; 56(3): 5-11.

Рад у врхунском часопису националног значаја - M52:

2. **Radenković Stošić M**, Stojanović S, Tomić M, Živković J, Kovačević P, Najman S. Subcutaneous tissue response to the two implanted collagen-based membranes of different origin. Acta Medica Medianae 2024. doi:10.5633/amm.2024.0314, Accepted for publication, Retrieved May 23, 2024, from: https://publisher.medfak.ni.ac.rs/AMM_1/accepted/2023-3broj/celi_radovi/55.Milena%20Radenkovic%20Stosic.pdf

Саопштење са међународног скупа штампано у целини - M33:

1. S. Mitić, Ž. Mitić, S. Živanović, S. Stojanović, **M. Radenković**, S. Najman, D. Savić, M. Trajanović, *Characterization of Saccharomyces Cerevisiae Yeasts by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry*, Proceedings of the 27th International Conference Ecological Truth and Environmental Research (EcoTer'19), Bor lake, Serbia, 18 - 21 June 2019, pp. 450 – 455. ISBN 978-86-6305-097-6

2. **Radenković M**, Maksimović A. Usage of additives and bacteriocins in food industries. 16th International Eco-conference: SAFE FOOD, Novi Sad, Serbia, September 26-29, 2012, Proceedings, pages 569-574.

Саопштења са међународног скупа штампано у изводу – M34:

1. **Radenković Stošić M**, Stojanović S, Barbeck M, Najman S. Comparative analysis of subcutaneous tissue reaction to different collagen membranes with or without addition of blood,

The 21st Young Researchers' Conference: Material Science and Engineering, Belgrade, Serbia, November 29 - December 1, 2023, Program and the Book of Abstracts, page 12. <https://www.mrs-serbia.org.rs/index.php/book-of-abstracts-21yrc>

2. **Radenković M**, Stojanović S, Najman S. Analysis of Tissue Response to Collagen Membrane with and without Addition of Blood in a Mouse Subcutaneous Implantation Model, XVI International scientific conference "Contemporary Materials 2023", Banja Luka, Republic of Srpska, September 7-8, 2023, Programme and The Book of Abstracts, page 68. (*nagrada za najbolju poster prezentaciju)

3. Najdanović J, Najman S, Cvetković V, Stojanović S, Vukelić-Nikolić M, **Radenković M**, Živković J. Analysis of vascularization markers' expression in ectopic osteogenic constructs in mice. The Serbian Ceramic Society Conference »Advanced Ceramics and Application X«, Belgrade, September 26-27, 2022, Program and The Book of Abstracts, page 78.

4. Najman S, Živković J, Vukelić-Nikolić M, Najdanović J, Cvetković V, Vučković I, **Radenković M**, Stojanović S. The influence of blood components as additives to implants on their regenerative properties. The Serbian Ceramic Society Conference »Advanced Ceramics and Application X«, Belgrade, September 26-27, 2022, Program and The Book of Abstracts, page 88.

5. Stojanović S, AlKhoury H, **Radenković M**, Najman S, Groth T. Coating of bioceramic materials with hyaluronic acid using different techniques leads to different tissue response in vivo. The Serbian Ceramic Society Conference »Advanced Ceramics and Application X«, Belgrade, September 26-27, 2022, Program and The Book of Abstracts, page 89.

6. **Radenković M**, Stojanović S, Živković J, Cvetković V, Mitić Ž, Ghanaati Sh, Najman S. Subcutaneous tissue reaction to collagen-based membranes of different origin, The 17th Young Researchers' Conference: Material Science and Engineering, Belgrade, Serbia, December 5-7, 2018, Book of Abstracts, page 1.

7. Živković J, Stojanović S, **Radenković M**, Vukelić-Nikolić M, Najdanović J, Najman S. Collagen production and tissue infiltration in hydroxyapatite-based implants loaded with macrophages and blood clot. The Serbian Ceramic Society Conference »Advanced Ceramics and Application VIII«, Belgrade, September 23-25, 2019, Program and The Book of Abstracts, page 5

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

КОМПАРАТИВНА АНАЛИЗА ОДГОВОРА ТКИВА НА КОЛАГЕНСКЕ БИОМАТЕРИЈАЛЕ ПРИМЕЊЕНЕ НА РАЗЛИЧИТЕ НАЧИНЕ И У РАЗЛИЧИТИМ АНИМАЛНИМ МОДЕЛИМА ИМПЛАНТАЦИЈЕ

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 13.09.2024.

Потпис аутора дисертације:


Милена Б. Раденковић Стошић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**КОМПАРАТИВНА АНАЛИЗА ОДГОВОРА ТКИВА НА КОЛАГЕНСКЕ
БИОМАТЕРИЈАЛЕ ПРИМЕЊЕНЕ НА РАЗЛИЧИТЕ НАЧИНЕ И У РАЗЛИЧИТИМ
АНИМАЛНИМ МОДЕЛИМА ИМПЛАНТАЦИЈЕ**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 13.09.2024..

Потпис аутора дисертације:

Милена Раденковић Стошић
Милена Б. Раденковић Стошић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

КОМПАРАТИВНА АНАЛИЗА ОДГОВОРА ТКИВА НА КОЛАГЕНСКЕ БИОМАТЕРИЈАЛЕ ПРИМЕЊЕНЕ НА РАЗЛИЧИТЕ НАЧИНЕ И У РАЗЛИЧИТИМ АНИМАЛНИМ МОДЕЛИМА ИМПЛАНТАЦИЈЕ

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 13.09.2024.

Потпис аутора дисертације:


Милена Б. Раденковић Стошић