



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Ana Javor

**KOŠTANI MORFOGENETSKI PROTEINI U
REGENERACIJI KOSTI NA MODELU
SEGMENTALNOG DEFEKTA LAKATNE KOSTI
KUNIĆA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026



University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Ana Javor

**BONE MORPHOGENETIC PROTEINS FOR BONE
REGENERATION IN RABBIT ULNAR SEGMENTAL
DEFECT MODEL**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2026



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

ANA JAVOR

**KOŠTANI MORFOGENETSKI PROTEINI U
REGENERACIJI KOSTI NA MODELU
SEGMENTALNOG DEFEKTA LAKATNE KOSTI
KUNIĆA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:
izv. prof. dr. sc. Zoran Vrbanac
doc. dr. sc. Nikola Štoković

Zagreb, 2026



University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Ana Javor

**BONE MORPHOGENETIC PROTEINS FOR BONE
REGENERATION IN RABBIT ULNAR SEGMENTAL
DEFECT MODEL**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
Assoc. Prof. Zoran Vrbanac
Assist. Prof. Nikola Štoković

Zagreb, 2026



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

IZJAVA

Ja, Ana Javor, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima do onih navedenih u radu.

(potpis studenta)

Ova disertacija izrađena je u sklopu projekata Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu financiranog od strane Europskog fonda za regionalni razvoj (projekti „Reproduktivna i regenerativna medicina – istraživanje novih platformi i potencijala“, KK.01.1.1.01.0008“ i „Razvoj inovacija i translacijska istraživanja u reproduktivnoj i regenerativnoj medicini“, PK.1.1.10.0003) te NPOO projekta „Razvoj napredne terapije temeljene na rhBMP6 i bisfosfonatima – OsteoFusion“ (10106-25-2913).

Osteo Fusion

CERM

Znanstveni centar izvrsnosti za
reproduktivnu i regenerativnu medicinu



**EUROPSKI STRUKTURNI
I INVESTICIJSKI FONDOVI**



Operativni program
**KONKURENTNOST
I KOHEZIJA**



Europska unija
Zajedno do fondova EU

O MENTORIMA

izv. prof. dr. sc. Zoran Vrbanac

Zoran Vrbanac, dr. med. vet., zaposlen je u znanstveno-nastavnom zvanju izvanrednog profesora na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Nositelj je europske specijalističke titule Diplomate of the European College of Veterinary Sports Medicine and Rehabilitation (DECVSMR, Small Animals) te američke specijalističke titule Diplomate of the American College of Veterinary Sports Medicine and Rehabilitation (DACVSMR, Canine). Obnaša dužnost predsjednika European College of Veterinary Sports Medicine and Rehabilitation, međunarodnog specijalističkog tijela koje djeluje u okviru Europskog odbora veterinarskih specijalizacija (EBVS).

Stručno i znanstveno usavršavanje ostvarivao je u međunarodnim institucijama i kliničkim centrima specijaliziranim za veterinarsku sportsku medicinu, fizikalnu terapiju i rehabilitaciju. Područje njegova znanstvenog interesa obuhvaća dijagnostiku i liječenje poremećaja lokomotornog sustava, rehabilitaciju mišićno-koštanog i živčanog sustava, primjenu slikovnih dijagnostičkih metoda te evaluaciju učinkovitosti fizikalno-terapijskih i rehabilitacijskih postupaka.

Autor je i koautor brojnih znanstvenih i stručnih radova objavljenih u međunarodnim recenziranim časopisima te aktivno sudjeluje u znanstveno-istraživačkim i stručnim projektima iz područja veterinarske medicine. Autor je 38 radova objavljenih u časopisima indeksiranim u bazi *Scopus* te 75 priloga sa znanstvenih skupova objavljenih u zbornicima radova.

Do veljače 2026. godine njegovi su radovi citirani 1 008 puta (Google Scholar), uz h-indeks 13 i i10-indeks 15. Rezultate svojih istraživanja kontinuirano predstavlja na domaćim i međunarodnim znanstvenim i stručnim skupovima. Jedan je od osnivača Udruženja europske veterinarske fizikalne terapije i rehabilitacije (VEPRA). U nastavnom radu sudjeluje u izvođenju preddiplomskih, diplomskih i poslijediplomskih studijskih programa. Mentor je diplomskih i doktorskih radova te sudjeluje u razvoju nastavnih i obrazovnih programa u području veterinarske medicine.

Radovi: [CroRIS - Osobe](#)

doc. dr. sc. Nikola Štoković

Nikola Štoković, dr. med. zaposlen je kao docent na Katedri za anatomiju i kliničku anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te znanstveno djeluje u Laboratoriju za mineralizirana tkiva. Područja njegovog znanstvenog interesa su biologija koštanih morfogenetskih proteina i njihova primjena u tkivnom inženjerstvu, regeneracija koštanog tkiva te razvoj i anatomske varijacije kostiju lubanje.

U dosadašnjem radu vodio je prekliničke pokuse evaluacije sintetskih keramičkih čestica građenih od kalcijevog fosfata kao biomehanički otpornog matriksa dodanog osteoinduktivnom lijeku OSTEOGROW. Proveo je opsežna istraživanja na glodavcima (esej potkožne ugradnje implantata) i translatirao dobivene rezultate na modele posterolateralne spinalne fuzije (PLF) u kunića i ovaca. Navedene studije proveo je u sklopu projekata Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu „Razvoj inovacija i translacijska istraživanja u reproduktivnoj i regenerativnoj medicini“ (2024-2026) i „Reproduktivna i regenerativna medicina – istraživanje novih platformi i potencijala“ (2017-2023) te u sklopu Horizon 2020 projekta OSTEOproSPINE (2017-2023). U navedenim projektima je bio suvoditelj više radnih paketa a trenutno vodi i NPOO istraživački projekt „Razvoj napredne terapije za koštanu regeneraciju temeljene na rhBMP6 i bisfosfonatima - OsteoFusion“ (2025-2029). U dosadašnjem radu dao je i značajan doprinos istraživanju anatomske varijacije paranazalnih sinusa (sfenoidnog i frontalnog) te istraživanjima razvoja kostiju glave. Također, značajno je doprinio organizaciji, katalogizaciji i međunarodnoj prepoznatljivosti Zagrebačke zbirke lubanja koja se nalazi na Zavodu za anatomiju „Drago Perović“ za što je nagrađen nagradom za čuvanje baštine Medicinskog fakulteta.

Autor je 21 rada objavljenog u časopisima indeksiranim u Current Contentsu te 54 sažetaka prezentiranih na međunarodnim kongresima. Do veljače 2026. godine ovi su radovi citirani 578 puta (Google Scholar, h-indeks 14; i10 indeks 15). Za znanstvena i akademska postignuća do sada je nagrađen s više međunarodnih i domaćih nagrada. Održao je više pozvanih predavanja na međunarodnim kongresima o koštanim morfogenetskim proteinima i regenerativnoj medicini.

Radovi: [CroRIS - Osobe](#)

ZAHVALA

Na početku želim izraziti iskrenu i duboku zahvalnost svojim mentorima, izv. prof. dr. sc. Zoranu Vrbancu i doc. dr. sc. Nikoli Štokoviću, na stručnom vodstvu, nesebičnoj pomoći, vrijednim savjetima i kontinuiranoj podršci tijekom svih faza izrade ove disertacije. Njihovo vodstvo, razumijevanje i ohrabrenje značajno su doprinijeli tome da ovaj zahtjevan proces bude lakši i uspješno priveden kraju. Hvala Vam što ste vjerovali u mene!

Zahvaljujem kolegama sa Zavoda za rendgenologiju, ultrazvučnu dijagnostiku i fizikalnu terapiju na pomoći i podršci tijekom provedbe istraživanja i izrade ove disertacije, kao i na riječima ohrabrenja i bodrenju.

Najiskrenije zahvaljujem akademiku Slobodanu Vukičeviću, voditelju Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu, što me uključio u istraživanje i time omogućio izradu ove disertacije. Zahvaljujem djelatnicima Laboratorija za mineralizirana tkiva na podršci u provedbi ovoga istraživanja, a posebno dr. sc. Nataliji Ivanjko, mag. ing. biotechn., na velikoj pomoći u statističkoj obradi podataka i vrijednim savjetima.

Zahvaljujem projektnom timu Klinike za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju te voditelju projekta, akademiku Draženu Matičiću, na stručnom usmjeravanju i kontinuiranoj podršci, kao i izv. prof. dr. sc. Marku Pećini na izvođenju kirurških zahvata te obradi uzoraka.

Zahvaljujem Kim Korpes, dr. med. vet. i Aniti Kraljević, dr. med. vet., na podršci, razumijevanju i brojnim savjetima te na tome što su uvijek bile uz mene, kako kao kolegice tako i kao prijateljice.

Od srca zahvaljujem svojim prijateljima Luciji, Dijani, Petri, Dariji i Evi, na riječima ohrabrenja i prijateljstvu koje mi je tijekom ovog zahtjevnog razdoblja bilo velika snaga i motivacija, kao i svima ostalima koji su na bilo koji način pružili podršku tijekom izrade ove disertacije.

Hvala Vladimiru koji je bio uz mene i završnu fazu izrade ovoga rada učinio lakom.

I na kraju hvala mojoj obitelji koji su stijena i sigurnost moga života, ovaj doktorski rad posvećujem Vama!

SAŽETAK

KOŠTANI MORFOGENETSKI PROTEINI U REGENERACIJI KOSTI NA MODELU SEGMENTALNOG DEFEKTA LAKATNE KOSTI KUNIĆA

Segmentalni defekti dugih kostiju predstavljaju velik terapijski izazov u humanoj i veterinarskoj ortopediji jer nadilaze prirodni regeneracijski potencijal koštanog tkiva. Iako autologni koštani presadak predstavlja zlatni standard liječenja, njegova je primjena ograničena morbiditetom donorskog mjesta i ograničenom dostupnošću tkiva. Koštani morfogogenetski proteini imaju ključnu ulogu u regeneraciji kosti, a rekombinantni humani BMP6 (rhBMP6) pokazuje izražen osteoinduktivni potencijal zbog relativne rezistencije na inhibitor *noggin*.

Cilj istraživanja bio je ispitati učinkovitost osteoinduktivnog implantata koji sadrži rhBMP6 primijenjen u autolognom krvnom ugrušku, s dodatkom ili bez biomehanički otpornog materijala, u cijeljenju segmentalnog defekta lakatne kosti na modelu kunića. Također je analiziran utjecaj kemijskog sastava kalcij-fosfatnih keramičkih čestica (trikalcij-fosfat i bifazična keramika) te uspoređena vrijednost različitih radioloških metoda u procjeni cijeljenja.

U istraživanje su uključena 22 kunića s kirurški induciranim segmentalnim defektom lakatne kosti duljine 15 mm raspoređena u četiri pokusne i dvije kontrolne skupine. Cijeljenje je praćeno rendgenskim snimanjem *in vivo*, a završna evaluacija *ex vivo* provedena je rendgenom, CT-om, mikro-CT-om i histološkom analizom. Rezultati su pokazali da implantati koji sadrže rhBMP6 u kombinaciji s keramičkim česticama postižu značajno bolju regeneraciju kosti u odnosu na formulacije bez biomehaničke potpore i kontrolne skupine, uz pouzdano premoštenje defekta i organiziranu trabekularnu strukturu.

Zaključno, kombinacija rhBMP6, autolognog krvnog ugruška i kalcij-fosfatne keramike predstavlja učinkovitu i translacijski perspektivnu strategiju za liječenje kritičnih segmentalnih defekata dugih kostiju.

Ključne riječi: segmentalni defekt kosti; koštana regeneracija; osteoindukcija; koštani morfogogenetski proteini; rhBMP6; autologni krvni ugrušak; keramičke čestice; trikalcij-fosfat; bifazična keramika; rendgen; CT; mikro-CT; histološka analiza; regeneracija kosti; tkivno inženjerstvo.

EXTENDED ABSTRACT

BONE MORPHOGENETIC PROTEINS FOR BONE REGENERATION IN RABBIT ULNAR SEGMENTAL DEFECT MODEL

Introduction

Segmental bone defects of long bones represent one of the most challenging conditions in both human and veterinary orthopedics due to the limited intrinsic regenerative capacity of bone tissue. These defects most commonly arise as a consequence of trauma, tumor resection, infection, or congenital malformations and frequently exceed the threshold for spontaneous healing. In such cases, physiological bone repair mechanisms are insufficient, resulting in delayed union, non-union, or fibrous tissue formation.

Autologous bone grafting remains the clinical gold standard for the treatment of critical-size segmental defects, owing to its osteogenic, osteoinductive, and osteoconductive properties. However, its clinical application is associated with significant limitations, including donor site morbidity, limited availability of graft material, prolonged operative time, blood loss, and chronic pain. These drawbacks have stimulated extensive research into alternative regenerative strategies, particularly those based on osteoinductive biomolecules and tissue engineering approaches.

Bone morphogenetic proteins (BMPs), members of the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily, play a pivotal role in skeletal development and bone regeneration. Among them, recombinant human BMP6 (rhBMP6) has emerged as a particularly promising osteoinductive factor, demonstrating superior biological activity compared to BMP2 and BMP7. Importantly, BMP6 exhibits relative resistance to noggin, a major extracellular antagonist of BMP signaling, which may contribute to more effective and controlled osteogenesis at lower, physiologically relevant doses.

Recent advances have highlighted the importance of delivery systems and biomechanically supportive matrices in BMP-based therapies. Autologous blood coagulum (ABC) has been proposed as a biologically favorable BMP carrier due to its high protein-binding capacity, autologous origin, and minimal immunogenicity. However, in load-bearing or mechanically demanding environments such as segmental bone defects, the addition of a compression-resistant matrix (CRM) is required to preserve implant integrity and spatial stability during the regenerative process. Calcium phosphate-based ceramics, including

tricalcium phosphate (TCP) and biphasic calcium phosphate (BCP), are widely used for this purpose due to their biocompatibility, osteoconductivity, and resorption profiles.

Aim of the Study

Hypothesis

An osteoinductive device containing recombinant human bone morphogenetic protein 6 (rhBMP6), applied within an autologous blood coagulum combined with ceramic particles, will be superior to formulations without ceramic particles in the healing of a segmental ulnar bone defect in rabbits.

General Objective

To investigate the efficacy of different osteoinductive implants containing bone morphogenetic proteins, using a protein carrier with and without a biomechanically resistant material, in bone healing in a rabbit segmental ulnar defect model.

Specific Objectives

1. To compare the capabilities of different radiological methods (X-ray, CT, and micro-CT) in analyzing the outcomes of segmental bone defect healing.
2. To investigate the dynamics of segmental bone defect healing following the application of different osteoinductive therapies based on bone morphogenetic proteins.
3. To evaluate the effect of adding a biomechanically resistant material to an osteoinductive implant on the outcome of bone defect healing.
4. To investigate the effect of the chemical composition of ceramic particles used as a biomechanically resistant material on the outcome of segmental bone defect healing.

Materials and Methods

A total of 22 male New Zealand White rabbits (*lat. Oryctolagus cuniculus*), aged five months and weighing approximately 3 kg, were included in the study. A standardized critical-size segmental defect measuring 15 mm was surgically created in the diaphysis of the right ulna of each animal and stabilized using a fixation plate to simulate clinical conditions.

Animals were allocated into six experimental groups receiving different implant formulations:

- A) rhBMP6 in autologous blood coagulum combined with TCP ceramic particles
- B) rhBMP6 in autologous blood coagulum combined with BCP ceramic particles,
- C) rhBMP6 in autologous blood coagulum,
- D) rhBMP2 delivered on an absorbable collagen sponge,
- E) autologous blood coagulum with TCP (control),
- F) autologous blood coagulum with BCP (control).

In vivo radiographic examinations were performed at 4 and 8 weeks postoperatively to monitor the progression of bone healing. At 17 weeks, animals were euthanized and *ex vivo* analyses were conducted using conventional radiography, computed tomography (CT), and high-resolution microCT. Quantitative microCT analysis was used to assess bone volume, ceramic replacement material volume and trabecular microarchitecture parameters, including trabecular thickness, number, and separation.

Histological evaluation was performed on undecalcified bone sections using standard staining techniques to assess bone quality, osteointegration, and ceramic resorption.

Results

The results demonstrated that implants containing rhBMP6 combined with ceramic particles resulted in significantly enhanced bone regeneration compared to formulations without a compression resistant matrix and control groups. These groups exhibited more consistent defect bridging, increased bone volume, and well-organized trabecular architecture. Differences were observed between ceramic compositions. TCP-containing implants showed faster ceramic resorption and earlier replacement by newly formed bone, whereas BCP-containing implants provided prolonged structural support due to slower resorption, contributing to sustained mechanical stability. MicroCT proved to be the most sensitive and precise imaging modality for quantitative assessment of bone microstructure, enabling objective evaluation of trabecular parameters and residual ceramic material. Conventional radiography and CT provided reliable assessment of defect bridging and overall bone continuity but were less informative regarding microarchitectural details. Histological findings were compatible with imaging results, revealing advanced osteointegration, mature lamellar bone formation, and minimal inflammatory response in rhBMP6-treated groups.

Discussion

The findings of the study emphasize the pivotal role of biomechanically supportive matrices in the successful implementation of BMP-based bone regeneration strategies, particularly in the context of critical-size segmental defects. Recombinant human BMP6 (rhBMP6) delivered within an autologous blood coagulum demonstrated intrinsic osteoinductive potential, confirming its capacity to initiate *de novo* bone formation in the absence of additional scaffolding. However, the incorporation of calcium phosphate ceramics as a carrier material significantly augmented the regenerative outcomes. This enhancement can be attributed to the dual function of the ceramic matrix: providing mechanical stability to the defect site and serving as an osteoconductive scaffold that facilitates cellular infiltration, vascularization, and the orderly deposition of new bone tissue. Comparative analysis further revealed that rhBMP6/ceramics-based constructs consistently outperformed implants formulated with rhBMP2, underscoring the critical importance of careful BMP selection, and the consideration of protein-specific biological activity in the design of regenerative therapies. In this research, rhBMP2 on an absorbable collagen sponge demonstrated inferior regenerative performance compared with the rhBMP6/ceramics-based composite implants. Radiological, microCT, histological, and biomechanical analyses showed that healing was less consistent, with incomplete or delayed defect bridging, lower bone volume, and a less organized trabecular microarchitecture. The newly formed tissue in this group was more heterogeneous reflecting insufficient spatial stability within the defect. In contrast to the ceramic-reinforced rhBMP6 formulations, the collagen carrier lacked compression resistance, allowing collapse of the implant and loss of defect geometry, which compromised orderly bone formation. Consequently, rhBMP2/ACS exemplified the limitations of first-generation BMP therapies in critical-size segmental defects, where biological stimulation alone proved inadequate to achieve robust, structurally competent regeneration. Importantly, the rabbit ulnar segmental defect model employed in this study proved to be a highly reproducible and clinically relevant preclinical platform, allowing for rigorous evaluation of osteoinductive strategies under conditions that closely mimic human bone healing processes. These findings collectively highlight the necessity of integrating biomechanical support, osteoconductive scaffolding, and BMP selection to maximize the efficacy of bone regenerative interventions and provide a framework for the rational design of next generation osteoinductive implants. Notably, the ceramic particles used as control groups in this study, including tricalcium phosphate (TCP) and biphasic calcium phosphate (BCP), lacked intrinsic osteoinductive activity and were unable

to induce *de novo* bone formation in the absence of a biologically active osteogenic stimulus such as BMPs.

Conclusion

This study demonstrates that effective regeneration of critical-size segmental defects in long bones requires the synergistic integration of osteoinduction, osteoconduction, and biomechanical stability. The most successful outcomes were achieved using recombinant human BMP6 delivered in an autologous blood coagulum and reinforced with calcium phosphate ceramic particles. This composite consistently enabled reliable defect bridging and generated newly formed bone that closely resembled native tissue in morphology, microarchitecture, and biomechanical performance. In contrast, osteoinductive stimulation without adequate mechanical support resulted in delayed, disorganized, and mechanically inferior healing, underscoring that biological signaling alone is insufficient in load-bearing environments. Both tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate ceramics proved effective when combined with rhBMP6, with differences primarily in resorption dynamics and microstructural organization. Overall, the combination of rhBMP6, autologous blood coagulum, and biomechanically resistant ceramic material represents an optimal and translationally relevant strategy for the treatment of critical-size long-bone defects, providing a strong foundation for future clinical application in human and veterinary orthopedics.

Keywords: segmental bone defect; bone regeneration; osteoinduction; bone morphogenetic proteins; rhBMP6; autologous blood coagulum; ceramic particles; tricalcium phosphate; biphasic ceramic; X-ray; CT; micro-CT; histological analysis; bone regeneration; tissue engineering.

POPIS OZNAKA I KRATICA

3R – Zamjena, smanjenje i poboljšanje (engl. *Replacement, Reduction, Refinement*)

ABC – autologni krvni ugrušak (engl. *Autologous Blood Coagulum*)

ACS – absorptivna kolagena spužvica (engl. *Absorbable Collagen Sponge*)

AP – antero-posteriorna projekcija

BCP – bifazična keramika (engl. *Biphasic Calcium Phosphate*)

BMP – koštani morfogenetski proteini (engl. *Bone Morphogenetic Protein*)

BMP2 – koštani morfogenetski protein 2

BMP6 – koštani morfogenetski protein 6

BMP7 – koštani morfogenetski protein 7

CaP – kalcij fosfat (engl. *Calcium Phosphate*)

CRM – materijal otporan na kompresiju (engl. *Compression Resistant Matrix*)

CSD – segmentalni defekt (engl. *Critical Size Defect*)

CT – kompjuterizirana tomografija (engl. *Computed Tomography*)

FDA – *Food and Drug Administration*

GDF – faktor rasta i diferencijacije (engl. *Growth Differentiation Factor*)

HA – hidroksiapatit (engl. *Hydroxyapatite*)

LL – latero-lateralna projekcija

MRI – magnetska rezonanca (engl. *Magnetic Resonance Imaging*)

mikro-CT – mikro kompjuterizirana tomografija (engl. *Micro Computed Tomography*)

NHP – primati osim čovjeka (engl. *Non-human Primates*)

PCL – polikaprolakton (engl. *Polycaprolactone*)

PEG – polietilen glikol (engl. *Polyethylene Glycol*)

PGA – poliglikolna kiselina (engl. *Polyglycolic Acid*)

PLA – polilaktična kiselina (engl. *Polylactic Acid*)

PLGA – polilaktično-glikolna kiselina (engl. *Poly(lactic-co-glycolic acid)*)

PLF – posterolateralna fuzija (engl. *Posterolateral Spinal Fusion*)

PPF – polipropilen fumarat (engl. *Polypropylene Fumarate*)

RTG – rendgensko snimanje

TCP – trikalcij-fosfat (engl. *Tricalcium Phosphate*)

TGF- β – transformirajući faktor rasta beta (engl. *Transforming Growth Factor Beta*)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	3
2.1. Koštani morfogenetski proteini i njihovi nosači.....	3
2.1.1. Koštani morfogenetski proteini.....	3
2.1.2. Nosači koštanih morfogenetskih proteina	3
2.1.3. Osteogrow	4
2.1.4. Klinička primjena koštanih morfogenetskih proteina	6
2.2. Biomehanički otporni materijal	7
2.3. Segmentalni defekt	9
2.3.1. Humana medicina	9
2.3.2. Veterinarska medicina	10
2.4. Animalni modeli u razvoju lijekova za regeneraciju kosti	11
2.5. Radiološke metode u evaluaciji koštanog cijeljenja.....	12
2.5.1. Rendgensko snimanje.....	13
2.5.2. Kompjuterizirana tomografija	13
2.5.3. Mikro-CT	14
3. OBRAZLOŽENJE TEME	16
4. MATERIJALI I METODE.....	18
4.1. Plan istraživanja i pokusni dizajn	18
4.2. Pokusne životinje.....	21
4.3. Priprava implantata.....	21
4.4. Kirurški zahvat i kliničko praćenje	21
4.5. Metode evaluacije.....	23
4.5.1. Rendgenološko snimanje	23
4.5.2. Kompjuterizirana tomografija.....	24
4.5.3. Mikro-CT snimanje.....	24
4.5.4. Histologija.....	25
4.6. Statistička obrada podataka	26
5. REZULTATI.....	27
5.1. Rendgenološko snimanje.....	27
5.1.1. Vremenska točka snimanja 0. dan	27
5.1.2. Vremenska točka snimanja 4. tjedan	28
5.1.3. Vremenska točka snimanja 8. tjedan	29
5.1.4. Vremenska točka snimanja 17. tjedan	30
5.1.5. Evaluacija prema Cookovoj skali.....	31
5.2. Kompjuterizirana tomografija	32
5.2.1. Pokusna skupina A (rhBMP6/ABC/TCP)	33
5.2.2. Pokusna skupina B (rhBMP6/ABC/BCP).....	34
5.2.3. Pokusna skupina C (ABC/rhBMP6)	35
5.2.4. Pokusna skupina D (rhBMP2/ACS).....	36
5.2.5. Kontrolna skupina E (ABC/TCP)	37
5.2.6. Kontrolna skupina F (ABC/BCP)	38

5.3.	Mikro-CT snimanje	39
5.3.1.	Mikro-CT analiza	40
5.4.	Histologija	42
5.4.1.	Pokusna skupina A (rhBMP6/ABC/TCP)	42
5.4.2.	Pokusna skupina B (rhBMP6/ABC/BCP).....	43
5.4.3.	Pokusna skupina C (ABC/rhBMP6)	44
5.4.4.	Pokusna skupina D (rhBMP2/ACS).....	45
5.4.5.	Kontrolna skupina E (TCP/ABC)	47
5.4.6.	Kontrolna skupina F (BCP/ABC)	49
6.	RASPRAVA	51
7.	ZAKLJUČCI.....	60
8.	POPIS LITERATURE	62
9.	ŽIVOTOPIS S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA	78

1. UVOD

Regeneracija velikih koštanih defekata i dalje predstavlja jedno od ključnih neriješenih pitanja u ortopediji i regenerativnoj medicini. Iako kost posjeduje inherentnu sposobnost reparacije, taj potencijal postaje nedostatan u situacijama opsežnog gubitka tkiva, osobito kod segmentalnih defekata dugih kostiju. Takvi defekti, najčešće uzrokovani traumom, infekcijom ili onkološkom resekcijom, povezani su s produženim liječenjem, visokom stopom komplikacija i značajnim funkcionalnim opterećenjem za bolesnika. Standardni terapijski pristupi, uključujući autologne presatke, iako učinkoviti, ograničeni su dostupnošću tkiva i morbiditetom na donorskom mjestu. Time je otvoren prostor za razvoj biološki utemeljenih terapija koje nadilaze ograničenja konvencionalnih kirurških metoda (HERNIGOU i sur., 2014.).

U tom kontekstu, koštani morfogenetski proteini zauzimaju središnje mjesto kao snažni modulatori osteogeneze. Njihova sposobnost usmjeravanja diferencijacije mezenhimskih stanica pozicionirala ih je među najperspektivnije molekule u području koštane regeneracije. Međutim, iskustva s ranije uvedenim rekombinantnim koštanim proteinima pokazala su da visoka osteoinduktivnost ne jamči i kliničku prihvatljivost (KARIPIDOU i sur., 2025.). Nuspojave povezane s nekontroliranim otpuštanjem proteina, uključujući ektopičnu osifikaciju i izražene upalne reakcije, naglasile su važnost optimizacije doziranja, nosača i lokalne biodistribucije aktivne tvari. Time se fokus istraživanja pomaknuo s isključive biološke potentnosti prema uravnoteženju učinkovitosti i sigurnosti.

Razvoj formulacija temeljenih na rekombinantnom humanom BMP6 predstavlja pokušaj odgovora na navedene izazove. Biološka svojstva ovog proteina, uključujući otpornost na endogene antagoniste, upućuju na njegov potencijal u postizanju stabilnijeg osteogenog odgovora (VUKICEVIC i sur., 2020.). Kombinacija rhBMP6 s autolognim krvnim ugruškom kao nosačem omogućuje fiziološki mikrookoliš i potencijalno kontroliraniju kinetiku otpuštanja, dok integracija keramika osigurava mehaničku potporu nužnu za primjenu u biomehanički opterećenim segmentima skeleta. Dosadašnji pretklinički rezultati ukazuju na obećavajuću osteoinduktivnost ove formulacije, no njezina učinkovitost u modelu segmentalnog defekta, koji predstavlja jednu od zahtjevnijih indikacija, zahtijeva dodatnu potvrdu (STOKOVIC i sur., 2020. STOKOVIC i sur., 2022., STOKOVIC i sur., 2026.).

S obzirom na to da uspješnost regenerativne terapije ne ovisi isključivo o indukciji koštanog tkiva, već i o kvaliteti, arhitekturi i biomehaničkoj integraciji novonastale kosti, nužna

je primjena pouzdanih i kvantitativnih metoda evaluacije. Standardizirani animalni modeli segmentalnih defekata omogućuju translacijsku procjenu terapijskog učinka, dok suvremene slikovne tehnike, osobito mikrokompjuterizirana tomografija, osiguravaju objektivnu analizu trodimenzionalne mikrostrukture regeneriranog tkiva (PERIĆ i sur., 2015., STOKOVIC i sur., 2022.).

Polazeći od ograničenja postojećih terapijskih rješenja i sigurnosnih izazova ranije primijenjenih BMP-temeljenih lijekova, ovo istraživanje usmjereno je na sustavnu pretkliničku evaluaciju osteoinduktivne terapije temeljene na rhBMP6 u modelu segmentalnog defekta. Time se nastoji doprinijeti razvoju biološki i biomehanički optimiziranog terapijskog pristupa koji ima potencijal translacije u kliničku praksu humane i veterinarske medicine.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Koštani morfogenetski proteini i njihovi nosači

2.1.1. Koštani morfogenetski proteini

Koštani morfogenetski proteini (engl. *Bone Morphogenetic Proteins*, BMP) skupina su signalnih molekula koje imaju ključnu ulogu u različitim biološkim procesima, s primarnim naglaskom na razvoj i održavanje koštanog i hrskavičnog tkiva (STOKOVIC i sur., 2022.). Oni su podskup superobitelji proteina transformirajućeg čimbenika rasta-beta (eng. *Transforming Growth Factor- β* ; TGF- β). Koštani morfogenetski proteini prvobitno su istraživani zbog svoje sposobnosti induciranja stvaranja kosti i hrskavice u pokusnim studijama (BRAGDON i sur., 2011.).

Iako su u početku identificirani u kontekstu regeneracije koštanog tkiva, naknadna istraživanja pokazala su da sudjeluju u brojnim biološkim procesima te imaju važne uloge u različitim tkivima i organima (SAMPATH i REDDI, 2020.). Dr. Marshall Urist je 1965. godine prvi otkrio da demineralizirana kost može inducirati formiranje nove kosti kada se implantira u mišić. Ovo otkriće dovelo je do identifikacije specifičnih proteina odgovornih za ovaj proces, koji su nazvani koštani morfogenetski proteini (URIST, 1965.). Koštani morfogenetski proteini, mogu se, s obzirom na svoju primarnu ulogu i biološka svojstva, podijeliti u nekoliko skupina.. Izražena osteoinduktivna svojstva imaju proteini koji pripadaju u prvu skupinu (BMP2 i BMP4), drugu skupinu (BMP5, BMP6 i BMP7) i treću skupinu (BMP9 i BMP10) dok proteini iz skupine GDF5, GDF6 i GDF7 ne induciraju stvaranje kosti, već stvaranje hrskavičnog tkiva (CHEN i sur., 2004.; MIYAZONO i sur., 2010.). S druge strane, BMP3 djeluje kao inhibitor stvaranja koštanog tkiva.

2.1.2. Nosači koštanih morfogenetskih proteina

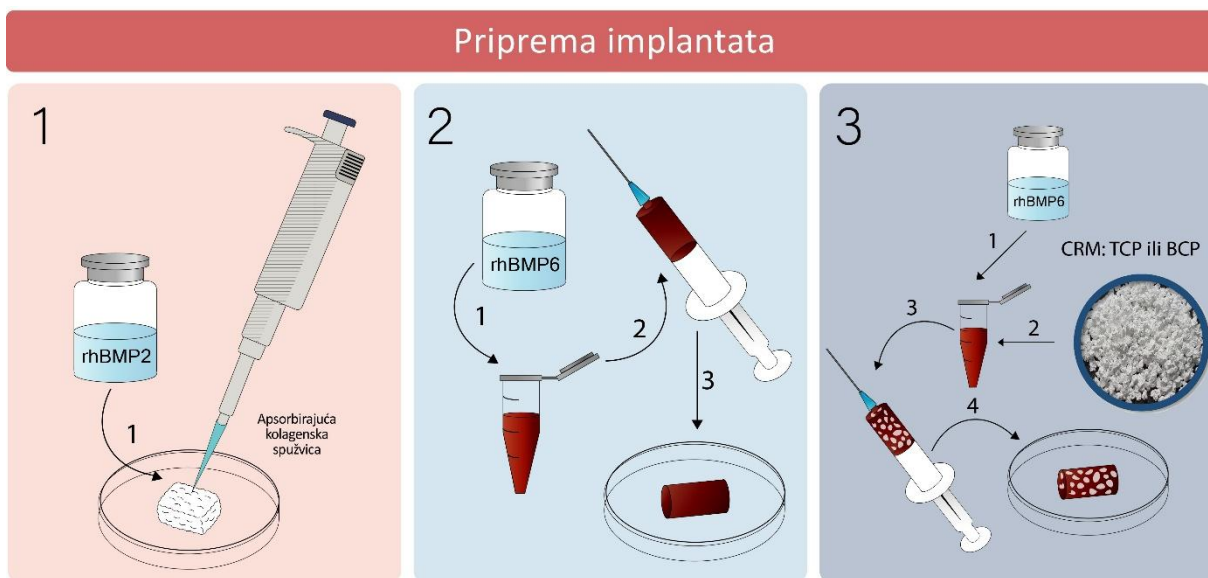
Nosači koštanih morfogenetskih proteina dijele se u četiri skupine: prirodni polimeri, sintetski polimeri, anorganski materijali, te njihove kombinacije. U skupinu prirodnih polimera pripada kolagen, koji je najčešće korišten nosač BMP-a u znanstvenim istraživanjima te u kliničkoj primjeni, primjerice kao sastavni dio lijeka InfuseTM (SEEHERMAN i WOZNEY, 2005.) (Slika 1). Osim kolagena, u skupinu prirodnih polimera spadaju i hijaluronska kiselina, želatina, fibrin, kitozan, alginat te svilu (EL BIALY i sur., 2017.). U skupinu sintetskih polimera pripadaju: polilaktična kiselina (engl. *Polylactic Acid*, PLA), poliglikolna kiselina (engl. *Polyglycolic Acid*, PGA), polilaktično-glikolna kiselina (engl. *Poly (lactic-co-glycolic Acid)*, PLGA), polietilen glikol (engl. *Polyethylene Glycol*, PEG), polikaprolakton (engl. *Polycaprolactone*, PCL), polipropilen fumarat (engl. *Polypropylene Fumarate*, PPF) te blok ko-

polimeri. Treća skupina nosača koštanih morfogogenetskih proteina su anorganski materijali poput kalcijevih ortofosfata (keramika i cement), kalcijeva sulfata (cement) i biostakla. Ipak, najčešće primjenjivani nosači pripadaju četvrtoj skupini koju čine kombinacije prethodno navedenih nosača pri čemu se najčešće koriste kombinacije polimera s anorganskim materijalima (ŠTOKOVIĆ, 2022.).

2.1.3. Osteogrow

Osteogrow je novi lijek za regeneraciju kosti koji se sastoji od rekombinantnog humanog koštanog morfogogenetskog proteina 6 (rhBMP6) i autolognog krvnog ugruška (engl. *Autologous Blood Coagulum*; ABC) kao nosača (VUKICEVIC i sur., 2020.) (Slika 1). Važno je istaknuti kako su nedavna istraživanja pokazala superiornost BMP6 u odnosu na BMP2 i BMP7 zbog relativne rezistencije na *noggin*, izvanstanični antagonist koštanih morfogogenetskih proteina (BAE i sur., 2011.). Autologni krvni ugrušak je nosač koji zbog velikog broja proteina plazme čvrsto veže BMP, a s obzirom da je riječ o autolognom nosaču, na mjestu aplikacije izaziva minimalnu upalnu reakciju i ne nosi rizik od prijenosa bolesti (GRGUREVIĆ i VUKIČEVIĆ, 2018., CHIARI i sur., 2020.). Osteogrow je opsežno istražen u pretkliničkim studijama na životinjskim modelima u štakora, kunića i ovaca gdje je potvrđena sigurnost i učinkovitost njegove primjene (VUKICEVIC i sur., 2020.; GRGUREVIC i sur., 2020.). Kako bi se lijek Osteogrow mogao primjenjivati u indikacijama gdje su prisutne kompresivne sile nužno je dodavanje biomehanički otpornog materijala (engl. *Compression Resistant Matrix*; CRM) radi poboljšanja biomehaničkih svojstava implantata. Na samom početku pretkliničkih istraživanja kao CRM je korišten koštani alograft te je formulacija lijeka s alograftom (Osteogrow-A) uspješno testirana na modelima posterolateralne spinalne fuzije (engl. *Posterolateral Spinal Fusion*; PLF) u kunića i ovaca (VUKICEVIC i sur., 2020.; GRGUREVIC i sur., 2020.). Ipak, primjenu alografta prate rizici, poput imunogenosti i rizika prijenosa virusa, te se zbog toga ne smatra idealnim biomehanički otpornim materijalom. Zbog navedenih razloga započela je potraga za alternativnim CRM-om te je razvijen Osteogrow-C, osteoinduktivni lijek koji se sastoji od rhBMP6, autolognog krvnog ugruška sa sintetskom keramikom građenom od kalcijeva fosfata kao CRM-om (VUKICEVIC i sur., 2014.; VUKICEVIC i sur., 2020., ŠTOKOVIĆ i sur., 2024) (Slika 1). Keramičke čestice se po veličini mogu podijeliti na male (74–420 μm), srednje (500–1700 μm) i velike (1000–4000 μm) čestice dok se po kemijskom sastavu dijele na trikalcij-fosfat (engl. *Tricalcium Phosphate*; TCP), hidroksiapatit (engl. *Hydroxyapatite*; HA) i dvofaznu keramiku (engl. *Biphasic Calcium Phosphate*; BCP), koja sadrži TCP i HA u različitim omjerima (ŠTOKOVIĆ i sur., 2020.). U

istraživanjima na modelu potkožne ugradnje u štakora je evaluiran utjecaj veličine i kemijskog sastava keramičkih čestica na osteogenezu te je dokazano kako količina i mikroarhitektura novostvorene kosti ovise o veličini keramičkih čestica dok kemijski sastav čestica determinira brzinu resorpcije čestica nakon ugradnje Osteogrow-C implantata (STOKOVIC i sur., 2020.). Također, u dosadašnjim prekliničkim istraživanjima je dokazana efikasnost primjene lijeka Osteogrow-C u modelima PLF-a u kunića i ovaca (STOKOVIC i sur., 2020. STOKOVIC i sur., 2022., STOKOVIC i sur., 2026.). Prethodno navedeni rezultati sugeriraju kako bi Osteogrow-C mogao biti efikasno terapijsko rješenje i za liječenje segmentalnih defekata dugih kostiju te je zbog toga potrebno provesti prekliničku evaluaciju Osteogrow-C u odgovarajućem animalnom modelu.



Slika 1: Shematski prikaz postupka pripreme različitih osteoinduktivnih implantata, uključujući pripremu implantata koji se sastoji od rhBMP2 primijenjenog na kolagenu spužvicu (1), te implantata koji se sastoje od rhBMP6 u autolognom krvnom ugrušku bez (2) i sa sintetskim keramičkim česticama (TCP ili BCP) (3). Prilagođeno i preuzeto uz dozvolu iz: *Regeneration of a Rabbit Segmental Defect with a New Bone Therapy: Autologous Blood Coagulum with Bone Morphogenetic Protein 6 and Synthetic Ceramics.*

2.1.4. Klinička primjena koštanih morfogenetskih proteina

U kliničkoj primjeni do sada su se koristila dva osteoinduktivna lijeka temeljena na koštanim morfogenetskim proteinima (BMP2 i BMP7) dostavljenim na goveđem kolagenu kao nosaču.

2.1.4.1. Infuse Bone Graft

Infuse Bone Graft je osteoinduktivni lijek koji se sastoji od rhBMP2 na goveđoj kolagenoj spužvici kao nosaču. Infuse je osteoinduktivni medicinski preparat koji se koristi najčešće u spinalnim fuzijama i drugim ortopedskim zahvatima. BMP2 je vrlo učinkovit u poticanju stvaranja nove kosti, što može dovesti do bržeg i potpunijeg zarastanja u usporedbi s tradicionalnim metodama poput koštanih transplantata. Upotreba Infuse-a može biti povezana s nekoliko nuspojava, uključujući oticanje, bol, upalu i prisutnost heterotopičnih osifikacija (SCHULTZ, 2008., IVANJKO i sur., 2023.). Zbog navedenih komplikacija Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*; FDA) u lipnju 2008. godine izdala je upozorenja o rizicima vezanim za upotrebu lijeka Infuse, posebice kada se koristi izvan odobrenih indikacija. Ovo upozorenje se prvenstveno odnosilo na upotrebu lijeka Infuse u vratnoj kralježnici zbog brojnih prijavljenih komplikacija, uključujući oticanje mekih tkiva, što može dovesti do problema s disanjem, gutanjem i oštećenjem živaca (KARIPIDOU i sur., 2025.). Pretpostavlja se da te komplikacije potječu od nekontroliranog oslobađanja velikih količina rhBMP2 koje značajno premašuju fiziološke razine (COTTRILL i sur., 2023.).

2.1.4.2. Osigraft

Osigraft je osteoinduktivni lijek koji se sastoji od rhBMP7 u kombinaciji s goveđim koštanim kolagenom kao nosačem (OP1 - Putty). Osigraft sadrži koštani morfogenetski protein 7 (BMP7) te se koristio u raznim ortopedskim i stomatološkim zahvatima. Međutim, njegova je uporaba povezana s komplikacijama kao što su heterotopične osifikacije, alergijske reakcije, kompresija živaca, rizik od infekcije, lokalna upala i odgođeno cijeljenje ili nezarastanje. Osim toga, Osigraft je bio kontraindiciran u bolesnika s aktivnim infekcijama na mjestu liječenja, kod trudnica, osoba s preosjetljivošću na BMP7, pacijenata s aktivnim zloćudnim bolestima, kod sustavnih poremećaja koji utječu na cijeljenje kosti te kod djece ili adolescenata (CALORI i sur., 2015.). Dodatni sigurnosni problemi pojavili su se kod specifičnih oblika primjene. Osigraft je prvobitno bio odobren za određene kirurške indikacije, no pokazalo se da njegova primjena u nekim slučajevima nije bila sigurna (LEACH i BITTAR, 2009.). Osigraft je povučen iz kliničke primjene zbog sumnje u sigurnost njegove primjene. Glavni razlog za povlačenje ili

ograničenje njegove upotrebe bio je niz ozbiljnih nuspojava i komplikacija povezanih s njegovom primjenom, uključujući povećan rizik od neželjenih reakcija poput ozbiljnih upala, infekcija, heterotopične osifikacije, te edema ili oštećenja živaca (DELAWI i sur., 2016.).

2.2. Biomehanički otporni materijal

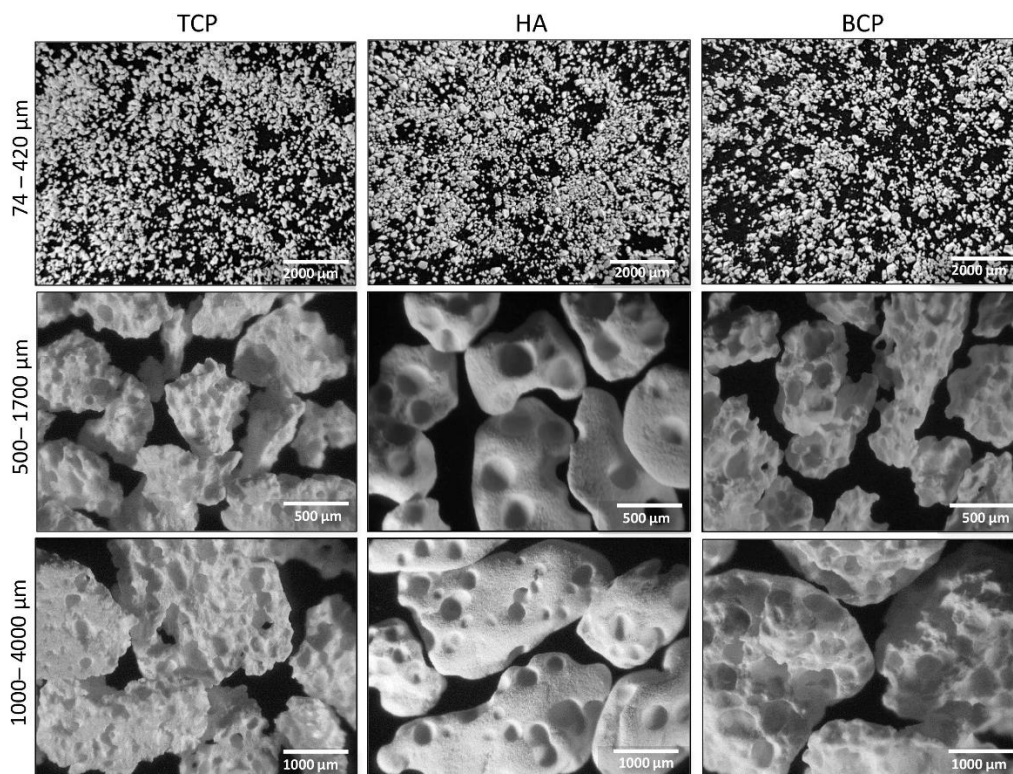
Kako bi se osteoinduktivni implantati mogli primjenjivati u indikacijama gdje su prisutne kompresivne sile potreban je dodatak biomehanički otpornog materijala. Do sada su razvijene brojne biokompatibilne tvari koje poboljšavaju biomehanička svojstva te sprječavaju kompresiju ili pomak osteoinduktivnog implantanta (STOKOVIC i sur., 2020., AHN i sur., 2022.).

Uspješnost biomehanički otpornog materijala ovisi o nizu karakteristika koje osiguravaju njihovu funkcionalnost, sigurnost i dugotrajnost. Neke od njih su: biokompatibilnost, optimalna biomehanička svojstva, sposobnost integracije s okolnim tkivima, kemijska stabilnost i optimizacija površinske topografije (STOKOVIC i sur., 2022.). Optimalan biokompatibilni materijal mora biti u potpunosti inertan prema okolnom tkivu, odnosno ne smije uzrokovati različite biološke i imunološke reakcije kao što su opći citotoksični učinak, aktivacija neutrofila, formiranje granulacijskog i fibroznog tkiva, proizvodnja antitijela, odgovori imunoloških stanica, akutna preosjetljivost tj. anafilaksa, odgođena preosjetljivost, mutageni odgovori, genotoksičnost te reproduktivna toksičnost (WILLIAMS, 2008.).

U indikaciji segmentalnog defekta postoji nekoliko opisanih i primjenjivih biomehanički otpornih materijala. Koštani alograft posjeduje vrlo dobra biomehanička svojstva jer se radi o istovjetnom tkivu (BETZ, 2002.). Alografti su ključni u mnogim kirurškim zahvatima zbog njihove sposobnosti da podrže regeneraciju tkiva iako postoje određeni nedostaci povezanih s potencijalnim prijenosom virusa i povećanim rizikom od razvoja infekcije (HABIBOVIC i GROOT, 2007.). Zbog prethodno navedenih nedostataka, javila se potreba za razvojem sintetskog materijala koji je u potpunosti biokompatibilan te ima optimalna biomehanička svojstva za kliničku primjenu. Sintetske keramike građene od kalcijevih ortofosfata predstavljaju biokompatibilne materijale sa širokom primjenom u medicini. Najčešće korišteni su trikalcij-fosfat (TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) i hidroksiapatit (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$), čija se najveća razlika očituje u različitoj resorptivnosti u živom organizmu, pri čemu se TCP relativno brzo resorbira, dok je HA otporan na resorpciju. Kako bi se postigla željena dugovječnost u organizmu, razvijen je koncept bifazične keramike, koja uključuje i TCP i HA

u različitim omjerima, ovisno o potrebnoj dugovječnosti nakon implantacije (STOKOVIC i sur., 2021.).

Sintetske keramike se koriste kao nosači koštanih morfogenetskih proteina, te su testirane u različitim modelima, uključujući ektopičnu osteogenezu kod miševa i štakora, posterolateralnu spinalnu fuziju kod kunića i ovaca, te modele koštanih defekata (STOKOVIC i sur., 2021., IVANJKO i sur., 2023.). Osim toga, keramike se koriste kao dodatak prirodnim i sintetskim polimerima radi poboljšanja biomehaničkih svojstava nosača. Istraživanja su pokazala ekvivalentnost TCP-a i HA-a u poticanju stvaranja kosti nakon ugradnje s rekombinantnim BMP-om (SULAIMAN i sur., 2013.). Velika prednost keramika je njihova raznolikost u veličinama i oblicima, što omogućuje prilagodbu specifičnim potrebama. Specifična površinska topografija čestica doprinosi poboljšanju osteokonduktivnih svojstava (Slika 2).



Slika 2. Prikaz čestica TCP, HA i BCP u tri raspona veličine (74–420 μm, 500–1700 μm i 1000–4000 μm), s razlikama u morfologiji i površinskoj topografiji relevantnima za osteokonduktivna svojstva. Prilagođeno i preuzeto iz: *Autologous bone graft substitute containing rhBMP6 within autologous blood coagulum and synthetic ceramics of different particle size determines the quantity and structural pattern of bone formed in a rat subcutaneous assay.*

2.3. Segmentalni defekt

2.3.1. Humana medicina

Koncept koštanog defekta kritične veličine (engl. *Critical Size Defect*, CSD) razvijen je prije više od četvrt stoljeća s ciljem standardizacije pristupa istraživanju materijala za poticanje regeneracije kosti. Inicijalno je koncept bio usmjeren na identifikaciju minimalnih defekata koji ne bi spontano zacijelili tijekom prirodnog životnog vijeka životinje (SCHEMITSCH, 2017.). U tom kontekstu, cijeljenje je bilo definirano kao nedostatak formiranja kosti, potencijalno rezultirajući stvaranjem fibroznog tkiva na okrajcima kosti (WILDEMANN i sur., 2021.). Proširivanjem razumijevanja cijeljenja kosti, koncept CSD-a kasnije je redefiniran kako bi obuhvatio sve defekte koji pokazuju manje od 10% regeneracije kosti unutar jedne godine (HOLLINGER i KLEINSCHMIDT, 1990.). Ovaj prag odražavao je pretpostavku da bi nedostatak regeneracije tijekom jedne godine implicirao nedostatak regenerativnog potencijala kostiju tijekom životnog vijeka životinje, te se takvi defekti smatrali relevantnim za CSD kategorizaciju. Zbog ograničenog životnog vijeka eksperimentalnih životinja, CSD koncept nedavno je revidiran kako bi se fokusirao na minimalne veličine defekta koji ne bi spontano zacijelili bez intervencije unutar određenog vremenskog okvira (COOPER i sur., 2010.). Segmentalni defekti dugih cjevastih kostiju predstavljaju veliki izazov u ortopediji jer fiziološki mehanizmi cijeljenja kosti nisu dostatni za potpunu koštanu regeneraciju (KEATING i sur., 2005., WILDEMANN i sur., 2021.). Autologni koštani presadak (autograft) trenutno predstavlja zlatni standard za liječenje segmentalnih defekata te se za defekte duljine do 5 cm najčešće koristi autograft crijevne ili goljenične kosti (DUMIC-CULE i sur., 2015., DAHLT i sur., 2021.). Opisana metoda, iako učinkovita, ima brojne nedostatke koji uključuju stvaranje nove kirurške rane, veći gubitak krvi i kroničnu bol na mjestu uzimanja presadaka (HERNIGOU i sur., 2014.). Zbog navedenih nedostataka postojećeg zlatnog standarda javila se potreba za razvojem učinkovitijih terapijskih pristupa za liječenje navedene indikacije, pri čemu metode regenerativne medicine predstavljaju potencijalno poboljšanje trenutnih protokola.

Segmentalni defekt u humanoj medicini kod odraslih pacijenata definiran je kao gubitak koštane makrostrukture u opsegu većem od 50% ili duljine veće od 2 cm. Nastanak segmentalnih defekata najčešće je posljedica traume, infekcije, resekcije tumora i kongenitalnih defekata. Cijeljenje kritičnih segmentalnih defekata varira ovisno o dobi pacijenta, cjelokupnom zdravlju i veličini defekta (NAUTH i sur., 2011.; DAHLT i sur., 2021.). Tijekom posljednjih 10-ak godina pojavile su se nove tehnike i strategije, uključujući i primjenu koštanih

morfofenetskih proteina, dajući nove perspektive efektivnijeg liječenja. Intramedularni uređaji za produljenje, bioaktivne membrane, osteoinduktivni proteini i tkivni inženjering nove su metode koje imaju prednosti u odnosu na trenutni zlatni standard (LASANIANOS i sur., 2010., DURDEVIC i sur., 2020.).

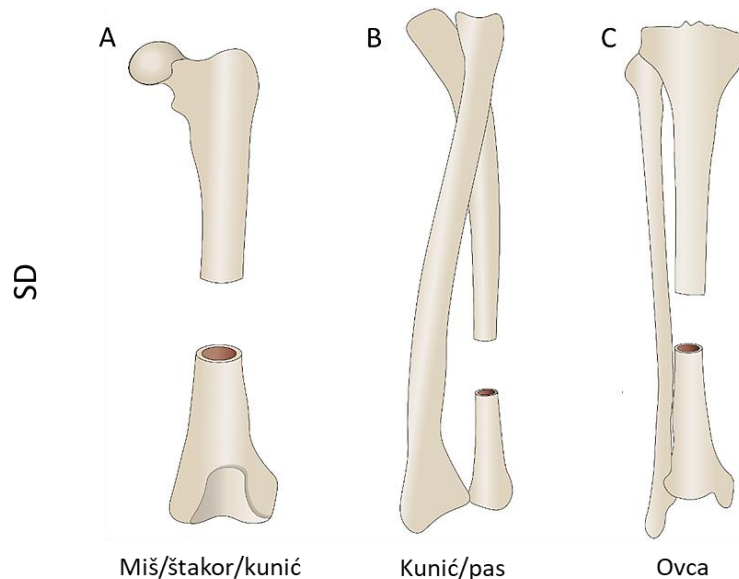
2.3.2. Veterinarska medicina

U veterinarskoj medicini, za razliku od humane, liječenje segmentalnih defekata primjenom koštanih autografta i osteoinduktivnih proteina ne izvodi se rutinski. Primjena prethodno navedenih metoda najčešće se provodi u eksperimentalne svrhe ili kao posljednja opcija ukoliko alternativni zahvat uključuje amputaciju ekstremiteta ili nepovoljan ishod liječenja. Najčešća ograničenja u izvođenju zahvata uključuju težu dostupnost lijekova i/ili kirurških implantata i visoku cijenu operativnog zahvata. Postoji nekoliko opisanih slučajeva u kojima se postiglo uspješno cijeljenje segmentalnog defekta (DOREA i sur., 2005., TOOMBS i WALLACE, 1985.). U kontekstu veterinarske medicine, dokumentiran je primjer operativnog zahvata za sanaciju segmentalnog defekta bedrene kosti u kojemu se koristio cilindrični mrežasti kavez izrađen od titana, komplementiran spongioznim koštanim transplantatom. Primjenom spomenute metode uspješno je rehabilitiran segmentalni defekt bedrene kosti duljine i 71 mm (SHANI i SEGEAL, 2010.). U veterinarskoj medicini koštani morfofenetski proteini korišteni su u kliničkom slučaju psa s multifragmentarnim prijelomom nadlaktične kosti nastalim kao posljedica nastrijelne rane. Prijelom se nalazio u distalnoj trećini dijafize nadlaktične kosti te je uključivao defekt koštane makrostrukture u opsegu od jedne trećine ukupne duljine kosti. S obzirom na neuspjeh postizanja koštanog cijeljenja nakon prvog kirurškog zahvata primjenom konvencionalnih metoda, a kako bi se izbjegla nužnost amputacije, u revizijskom kirurškom postupku upotrijebljen je vanjski fiksator uz implantaciju koštanog morfofenetskog proteina 6 na nosaču autolognom krvnom ugrušku obogaćenim dodatkom biomehanički otpornog materijala trikalcij-fosfata u koštani defekt. Cijeljenje je bilo uspješno, a formacija koštanog kalusa potvrđena je radiološkim metodama 2 mjeseca nakon provedenog kirurškog zahvata (PECIN i sur., 2021.).

2.4. Animalni modeli u razvoju lijekova za regeneraciju kosti

U istraživanjima novih terapija za regeneraciju kosti i segmentalnih defekata su, kroz posljednjih nekoliko desetljeća, korišteni brojni animalni modeli uvažavajući etička načela i 3R pravilo (engl. *Replacement* (zamjena), *Reduction* (smanjenje) i *Refinement* (poboljšanje)). Animalni modeli mogu se kategorizirati na osnovi vrste životinja, testne indikacije te stupnja pretkliničkog istraživanja (GRIMM i sur., 2023.). Stupanj pretkliničkog istraživanja može se podijeliti na početno, srednje i napredno istraživanje. Stupanj razvoja korištene životinjske vrste najčešće proporcionalno prati stupanj pretkliničkog razvoja. Tako se, primjerice, za istraživanja početnog stadija najčešće koriste modeli glodavaca, za srednje napredna testiranja najčešće se koriste modeli kunića, dok se u završnoj fazi pretkliničkog istraživanja koriste psi, ovce i primati (engl. *Non-human Primates*, NHP) (PERIĆ i sur., 2015., STOKOVIC i sur., 2022.).

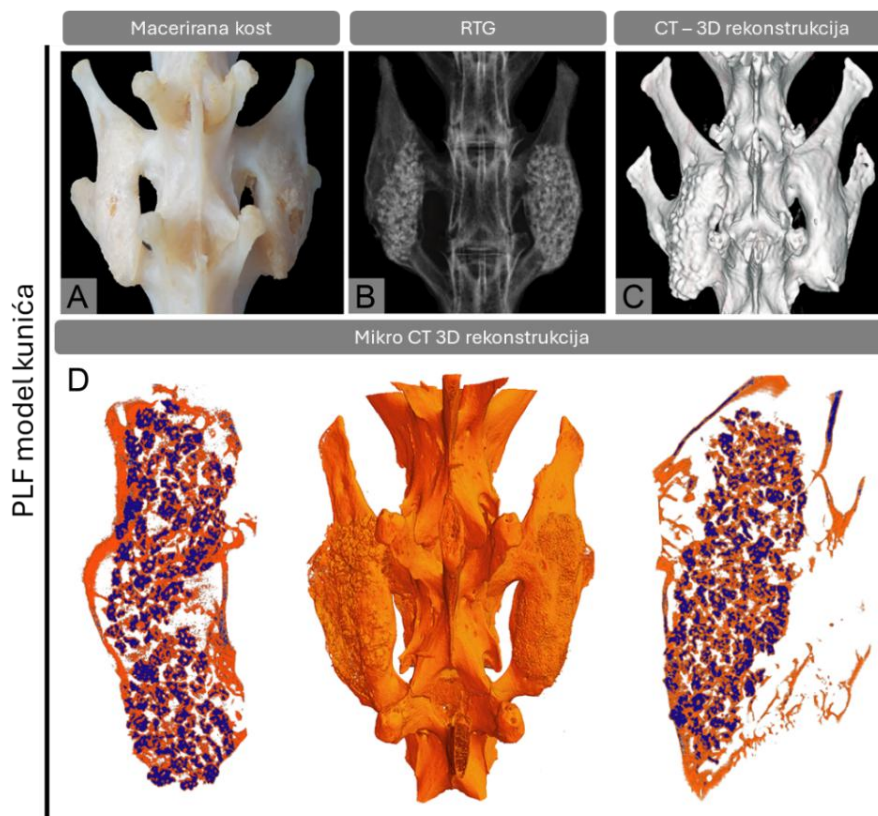
Segmentalni defekt lakatne kosti kod kunića često se koristi kao pokusni animalni model za istraživanje novih metoda liječenja koštanih defekata (Slika 3). Indukcija defekta se postiže kirurškim putem u sterilnim uvjetima. Prednosti modela uključuju sličnost s ljudskom fiziologijom, kontrolirane uvjete eksperimenata i brzo cijeljenje kostiju. Mane uključuju razlike u veličini kosti i specifične fiziološke razlike između kunića i ljudi (MILLS i sur., 2012.).



Slika 3. Shematski prikaz eksperimentalnih segmentalnih koštanih defekata: (A) femoralni, (B) ulnarni (ili radijalni) i (C) tibijalni defekt, koji se koriste u animalnim modelima za istraživanje regeneracije kosti i procjenu učinkovitosti novih terapijskih pristupa. Prilagođeno i preuzeto uz dozvolu iz: *Bone morphogenetic proteins, carriers, and animal models in the development of novel bone regenerative therapies*.

2.5. Radiološke metode u evaluaciji koštanog cijeljenja

Slikovna dijagnostika igra ključnu ulogu u procjeni cijeljenja kosti, pružajući neophodne informacije za eksperimentalne i kliničke slučajeve. Različite metode omogućuju vizualizaciju koštane strukture i praćenje progresije zacjeljivanja. Rendgenske snimke, kao osnovna metoda, nude brzu procjenu prijeloma i formiranja koštanog kalusa. Kompjuterizirana tomografija (engl. *Computed Tomography*; CT) pruža detaljnu analizu složenih prijeloma, dok magnetska rezonancija (engl. *Magnetic Resonance Imaging*; MRI) omogućava uvid u meka tkiva. Nuklearna medicina i ultrazvuk također doprinose evaluaciji, pružajući specifične informacije o metabolizmu kosti i vaskularizaciji. Sve ove metode zajedno omogućuju sveobuhvatno praćenje cijeljenja (MORSHED, 2014.). U eksperimentalne svrhe često najprecizniju metodu predstavlja mikrokompjuterizirana tomografija (engl. *Micro Computed Tomography*; mikro-CT) koja omogućuje visokorezolucijsko snimanje unutarnje strukture objekata na mikrometarskoj razini te se često koristi za analizu malih uzoraka u znanstvenim istraživanjima (Slika 4) (O'NEILL i sur., 2012.).



Slika 4. Usporedni prikaz primjenom različitih slikovnih dijagnostičkih metoda: (A) macerirana kost, (B) rendgenska snimka (RTG), (C) CT rekonstrukcija, (D) mikro-CT 3D rekonstrukcija. Prilagođeno i preuzeto uz dozvolu iz: *Diagnostic Imaging of the Skeletal System: Overview of Applications in Human and Veterinary Medicine*.

2.5.1. Rendgensko snimanje

Rendgenska tehnologija temelji se na korištenju rendgenskih zraka, vrste elektromagnetskog zračenja s kratkim valnim duljinama, koje mogu prodrijeti kroz tijelo. Kada prolaze kroz tkiva, rendgenske zrake se apsorbiraju različito ovisno o gustoći materijala, omogućujući vizualizaciju unutarnjih struktura. Wilhelm Conrad Röntgen otkrio je rendgenske zrake 1895. godine (ROENTGEN, 1895.). Njegovo otkriće omogućilo je revolucionaran uvid u unutarnje strukture tijela bez potrebe za kirurškim zahvatima. Prva medicinska primjena dogodila se ubrzo nakon otkrića, a nedugo nakon toga postaje neizostavan dio različitih vrsta znanstvenih istraživanja. Prednosti rendgena uključuju brzu izvedbu, dostupnost i nisku cijenu te dobru vizualizaciju koštane makrostrukture (JAVOR i sur., 2025.). Nedostatci rendgena uključuju izloženost zračenju koja, iako niska, kumulativno može biti štetna. Klinički nedostaci uključuju ograničenu vizualizaciju mekih tkiva te efekt superpozicije, odnosno projekcijsko preklapanje više anatomskih struktura u dvodimenzionalnoj rendgenskoj slici, zbog čega prostorno odvojeni koštani elementi mogu biti projicirani na isto mjesto. Nadalje, rendgenska dijagnostika pokazuje nižu preciznost u otkrivanju manjih fraktura i ranih faza koštanih promjena (RUSSO, 2017.).

2.5.2. Kompjuterizirana tomografija

Kompjuterizirana tomografija koristi rendgenske zrake za stvaranje detaljnih presjeka unutarnjih struktura. Kombinacija rendgenskih snimaka iz različitih kutova omogućuje računalno generiranje trodimenzionalnih rekonstrukcija. CT je razvijen 1970-ih godina i predstavlja veliki napredak u slikovnoj dijagnostici i vrlo brzo je pronašao svoje mjesto u svakodnevnom kliničkom radu. CT skeniranje omogućuje izradu preciznih trodimenzionalnih presjeka organa, kostiju i mekih tkiva, što olakšava dijagnosticiranje različitih stanja kao što su tumori, infekcije ili traume. Osim visoke rezolucije, CT je relativno brza i efikasna metoda slikovne dijagnostike, pružajući jasne rezultate u relativno kratkom vremenu. To je posebno važno u hitnim situacijama kao što su traume i akutni medicinski slučajevi (JAVOR i sur., 2025.). Još jedna prednost CT-a je njegova sposobnost snimanje iz više kutova, što omogućuje detaljno trodimenzionalno mapiranje kompleksnih anatomskih struktura. Za razliku od nekih drugih slikovnih metoda CT može pružiti informacije o gustoći i strukturi tkiva. Jedan od glavnih nedostataka CT-a je izloženost pacijenta ionizirajućem zračenju. Osim toga, visoka razlučivost slika koju pruža CT može biti ograničena u vizualizaciji određenih mekih tkiva, kao što su mozak, živčani sustavi ili organi sličnih gustoća. Najveća prednost u procjeni koštanog cijeljenja je izbjegavanje efekta superpozicije, tj. vizualizacija anatomskih struktura u tri

dimenzije. Nadalje, uvelike je olakšana procjena formiranja kalusa zbog preciznijih informacija o gustoći i strukturi tkiva (CHOPLIN i sur., 2019.). U kontekstu veterinarske medicine, glavni nedostatak u odnosu na konvencionalno rendgenološko snimanje je potreba da životinje budu u potpunoj anesteziji za ovaj dijagnostički postupak što samu dijagnostiku čini nešto invazivnijom (WILLEMS i sur., 2022.).

2.5.3. Mikro-CT

Mikro-CT (mikrokomputerizirana tomografija) predstavlja naprednu tehniku slikovne dijagnostike koja koristi rendgenske zrake za stvaranje iznimno detaljnih trodimenzionalnih prikaza unutarnje strukture tkiva na mikrometarskoj skali. Glavna prednost mikro-CT-a leži u njegovoj iznimno visokoj prostornoj rezoluciji, koja višestruko nadmašuje mogućnosti klasičnih kliničkih CT uređaja, omogućujući vizualizaciju fine mikroarhitekture mineraliziranih tkiva, osobito trabekularne i kortikalne kosti (CHOPLIN i sur., 2019.). Takva razlučivost omogućuje preciznu kvantifikaciju parametara kao što su volumen kosti, debljina trabekula, njihov broj, razmak između trabekula te stupanj mineralizacije, što je ključno za objektivnu procjenu kvalitete novostvorene kosti (JAVOR i sur., 2025.).

Glavni nedostatak mikro-CT pretrage predstavlja ograničenje dimenzija uzorka, zbog čega se ova metoda primarno primjenjuje u eksperimentalnim i pretkliničkim istraživanjima na manjim životinjskim modelima ili na izdvojenim uzorcima. Osim toga, izloženost rendgenskom zračenju, iako relativno niska, može predstavljati problem za osjetljive biološke uzorke te ograničiti mogućnost ponovljenih *in vivo* snimanja tijekom duljih vremenskih razdoblja (RITMAN, 2011.).

U kontekstu evaluacije cijeljenja kosti, mikro-CT ima iznimnu vrijednost jer omogućuje izravno i trodimenzionalno (3D) prikazivanje strukture novostvorene kosti bez potrebe za destruktivnom obradom uzorka. Ova metoda omogućuje objektivno, brzo i visoko reproducibilno mjerenje trodimenzionalne trabekularne arhitekture, separacije trabekula, povezanosti koštane mreže te integriteta kortikalne kosti u automatiziranom analitičkom sustavu. Budući da je nedestruktivna za koštanu makrostrukturu, mikro-CT omogućuje provedbu višestrukih analiza na istom uzorku, uključujući naknadna biomehanička ispitivanja i histološku obradu, čime se osigurava sveobuhvatna i komplementarna procjena procesa koštane regeneracije (JIANG i sur., 2005.).

Zbog svega navedenog možemo zaključiti kako radiološke metode imaju ključnu ulogu u praćenju cijeljenja koštanih defekata i evaluaciji različitih terapijskih strategija za postizanje koštane regeneracije. Svrha ove disertacije je primjenom prethodno opisanih radioloških metoda evaluirati sigurnost i efikasnost novog terapijskog rješenja za koštanu regeneraciju koji se sastoji od rhBMP6 u autolognom krvnom ugrušku s keramičkim česticama na modelu segmentalnog defekta kod kunića. Na navedenom modelu istraživane su razne formulacije osteoinduktivnih terapija uz primjenu različitih nosača i doza koštanih morfogenetskih proteina (YAMAMOTO i sur., 2006.; BAE i sur., 2011., FUJITA i sur., 2012.; SUN-WOONG i sur., 2012.; YAMAMOTO i sur., 2015.; GRGUREVIC i sur., 2019.; HUANG i sur., 2021.). Uzimajući u obzir ključnu ulogu osteoinduktivnih čimbenika i osteokonduktivnih nosača u procesu regeneracije kosti, pretpostavlja se da kombinacija koštanih morfogenetskih proteina s odgovarajućom strukturnom potporom može značajno unaprijediti cijeljenje kritičnih segmentalnih defekata.

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Koštani morfogogenetski proteini u autolognom krvnom ugrušku predstavljaju inovativan pristup koji omogućuje poticanje osteogene diferencijacije stanica na mjestu segmentalnog defekta. Međutim, jedan od važnih izazova u razvoju takvih osteoinduktivnih implantata je osigurati odgovarajuću biomehaničku potporu tijekom procesa regeneracije kosti. U tom kontekstu, keramične čestice, osobito kalcij-fosfatne keramike, koriste se kao osteokonduktivni i biomehanički otporni materijali koji mogu poboljšati stabilnost implantata i osigurati privremeni strukturni okvir za stvaranje nove kosti. Kemijski sastav i mikrostruktura keramičkih čestica mogu značajno utjecati na njihovu resorpciju, interakciju s tkivom te na konačni ishod regeneracije.

Procjena cijeljenja kosti zahtijeva pouzdane slikovne metode. Konvencionalna rendgenološka evaluacija i kompjuterizirana tomografija široko su primjenjivane u kliničkoj praksi, dok mikro-CT omogućuje detaljnu trodimenzionalnu analizu mikroarhitekture novostvorene kosti i predstavlja važan alat u prekliničkim istraživanjima.

Očekivani znanstveni doprinos ovog istraživanja ogleda se u nekoliko aspekata. Istraživanje će omogućiti bolju procjenu učinkovitosti osteoinduktivnog lijeka koji sadrži rhBMP6 u kombinaciji s različitim komponentama implantata u modelu segmentalnog defekta kosti. Rezultati će pružiti nove spoznaje o ulozi keramičkih čestica i njihovog kemijskog sastava u poboljšanju biomehaničke stabilnosti i osteogene regeneracije. Usporedna analiza radioloških metoda doprinijet će optimizaciji slikovnih pristupa u procjeni cijeljenja kosti u eksperimentalnim modelima. Dobiveni rezultati mogu imati značajan translacijski potencijal te pridonijeti razvoju novih terapijskih strategija u ortopediji, traumatologiji i regenerativnoj medicini.

HIPOTEZA

Osteoinduktivni lijek koji sadrži rekombinantni humani koštani morfogenetski protein 6 (rhBMP6) primijenjen u autolognom krvnom ugrušku s česticama keramike biti će superiorniji u odnosu na formulacije lijeka bez keramičkih čestica u cijeljenju segmentalnog defekta lakatne kosti u kunića.

CILJEVI

OPĆI CILJ: Istražiti efikasnost različitih osteoinduktivnih implantata koji sadrže koštane morfogenetske proteine, nosač proteina s i bez biomehanički otpornog materijala u cijeljenju kosti u modelu segmentalnog defekta lakatne kosti u kunića.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Usporediti mogućnosti različitih radioloških metoda (rendgen, CT i mikro-CT) u analizi ishoda cijeljenja segmentalnog defekta kosti.
2. Istražiti dinamiku cijeljenja segmentalnog defekta kosti primjenom različitih osteoinduktivnih terapija temeljenih na koštanim morfogenetskim proteinima.
3. Istražiti utjecaj dodatka biomehanički otpornog materijala u osteoinduktivni implantat na ishod cijeljenja defekta kosti.
4. Istražiti utjecaj kemijskog sastava keramičkih čestica primijenjenih kao biomehanički otporni materijal na ishod cijeljenja segmentalnog defekta.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Plan istraživanja i pokusni dizajn

U ovom istraživanju, koristeći pohranjene uzorke iz pokusa na modelu segmentalnog defekta lakatne kosti u kunića (lat. *Oryctolagus cuniculus*), evaluirano je cijeljenje kosti pomoću osteoinduktivnih implantata koji sadrže rekombinantni humani koštani morfogogenetski protein 6 (rhBMP6) u autolognom krvnom ugrušku sa sintetskom keramikom građenom od kalcijeva fosfata (engl. *Calcium Phosphate*; CaP) kao CRM-om i uspoređeno s cijeljenjem kosti nakon ugradnje osteoinduktivnih implantata bez CRM-a odnosno implantata koji sadrže rhBMP6 u autolognom krvnom ugrušku i rhBMP2 na kolagenskoj spužvici (engl. *Absorbable Collagen Sponge*; ACS). U istraživanju je evaluirana jedna veličina čestice (sve testirane čestice su bile u rangu od 1000 do 1700 μm) i dva različita sastava CaP keramike: trikalcij-fosfat i bifazična keramika s omjerom trikalcij-fosfata i hidroksiapatita 40/60. Također, u istraživanju su korištene 2 kontrolne skupine koje sadržavaju samo keramičke čestice u autolognom krvnom ugrušku bez BMP-a.

Sumarno, u istraživanju su korištene slijedeće formulacije implantata raspoređenih u 6 pokusnih skupina:

Skupina A: osteoinduktivni implantat koji sadržava 100 μg rekombinantnog humanog koštanog morfogogenetskog proteina 6 (rhBMP6) u autolognom krvnom ugrušku (ABC; 1 mL) kao nosaču uz dodatak 200 mg keramičkih čestica građenih od trikalcij-fosfata (TCP; veličina čestica 1000-1700 μm) kao biomehanički otpornog materijala.

Skupina B: osteoinduktivni implantat koji sadržava 100 μg rekombinantnog humanog koštanog morfogogenetskog proteina 6 (rhBMP6) u autolognom krvnom ugrušku (ABC; 1 mL) kao nosaču uz dodatak 200 mg keramičkih čestica građenih od bifazične keramike (BCP; TCP/HA 40/60; veličina čestica 1000-1700 μm) kao biomehanički otpornog materijala.

Skupina C: osteoinduktivni implantat koji sadržava 100 μg rekombinantnog humanog koštanog morfogogenetskog proteina 6 (rhBMP6) u autolognom krvnom ugrušku (ABC; 1 mL) kao nosaču.

Skupina D: osteoinduktivni implantat koji sadržava 100 μg rekombinantnog humanog koštanog morfogogenetskog proteina 2 (rhBMP2) na kolagenskoj spužvici (ACS) kao nosaču.

Skupina E: kontrolna skupina sadržava autologni krvni ugrušak (ABC; 1 mL) uz dodatak 200 mg keramičkih čestica građenih od trikalcij-fosfata (TCP; veličina čestica 1000-1700 μm) kao biomehanički otpornog materijala.

Skupina F: kontrolna skupina sadržava autologni krvni ugrušak (ABC; 1 mL) uz dodatak 200 mg keramičkih čestica građenih od bifazične keramike (BCP; TCP/HA 40/60; veličina čestica 1000-1700 μm) kao biomehanički otpornog materijala.

Nakon kirurškog zahvata i ugradnje implantata na mjesto segmentalnog defekta, pokusne životinje su praćene pomoću *in vivo* rendgenskih snimanja 4 i 8 tjedana nakon operacije. Na kraju pokusa, 17 tjedana nakon operacije, uzorci su analizirani rendgenom, CT-om i mikro-CT. Također, nakon snimanja radiološkim metodama, izdvojene lakatne kosti kunića su podvrgnute histološkoj obradi radi analize mikroarhitekture novostvorenog koštanog tkiva. Broj implantata u pokusnim skupinama je određen na osnovi varijabilnosti naših prethodnih eksperimenata te literaturnim preporukama za provođenje pokusa u ovom modelu te iznosi 4-5 implantata po pokusnoj skupini. Budući da se na temelju literaturnih podataka u kontrolnim skupinama ne očekuje uspješno premoštenje, broj implantata u tim skupinama je bio minimalan radi poštivanja 3R načela. U Tablici 1. prikazan je pokusni dizajn a u nastavku su detaljno opisani svi dijelovi istraživanja.

Tablica 1. Pokusni dizajn

	Opis pokusnih skupina	n	0. dan	4. tjedan	8. tjedan	17. tjedan
A	ABC + TCP + rhBMP6	5	<i>In vivo</i> RTG	<i>In vivo</i> RTG	<i>In vivo</i> RTG	<i>Ex vivo</i> RTG, mikro-CT i CT
B	ABC + BCP + rhBMP6	5	<i>In vivo</i> RTG	<i>In vivo</i> RTG	<i>In vivo</i> RTG	<i>Ex vivo</i> RTG, mikro-CT i CT
C	ABC + rhBMP6	4	<i>In vivo</i> RTG	<i>In vivo</i> RTG	<i>In vivo</i> RTG	<i>Ex vivo</i> RTG, mikro-CT i CT
D	ACS + rhBMP2	4	<i>In vivo</i> RTG	<i>In vivo</i> RTG	<i>In vivo</i> RTG	<i>Ex vivo</i> RTG, mikro-CT i CT
	Opis kontrolnih skupina					
E	ABC + TCP	2	<i>In vivo</i> RTG	<i>In vivo</i> RTG	<i>In vivo</i> RTG	<i>Ex vivo</i> RTG, mikro-CT i CT
F	ABC + BCP	2	<i>In vivo</i> RTG	<i>In vivo</i> RTG	<i>In vivo</i> RTG	<i>Ex vivo</i> RTG, mikro-CT i CT

4.2. Pokusne životinje

U pokusu su korištena 22 laboratorijska kunića (lat. *Oryctolagus cuniculus*) soja New Zealand porijeklom iz Charles River laboratorija (Francuska). Korišteni su mužjaci, starosti 5 mjeseci i tjelesne mase oko 3 kg. Kunići su bili smješteni u standardne kaveze za kuniće s okolišnim obogaćenjem u konvencionalnim laboratorijskim uvjetima (temperatura 18–24 °C, relativna vlažnost 50–70%, razina buke 60 dB i osvjetljenje 12 sati dnevno) u registriranoj nastambi za životinje Laboratorija za mineralizirana tkiva (Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu). U sklopu ranije odobrenog projekta temeljem zahtjeva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu uz prethodno odobrenje Etičkih povjerenstava Veterinarskog i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu izdano je pozitivno mišljenje za odobrenje projekta „Nove formulacije BMP6 za liječenje segmentalnog defekta kosti“ u sklopu projekta Reproductivna i regenerativna medicina – istraživanje novih platformi i potencijala (EP 332/2021). Etičko povjerenstvo Veterinarskog fakulteta izdalo je Suglasnost o etičkoj prihvatljivosti za istraživanje uzoraka (Kl. 640-01/23-02/06, Ur. br. 251-61-01/139-23-18).

4.3. Priprava implantata

U skupinama A-C krv se izvadila iz uške kunića u plastičnu tubu u kojoj se nalazio otopljeni rhBMP6 te se nakon toga krv navukla u praznu injekciju (grupa C) ili injekciju u kojoj su se nalazile keramičke čestice građene od TCP-a (grupa A) ili BCP-a (grupa B). Nakon što je krv koagulirala, a neposredno prije ugradnje, implantat se izvio iz injekcije i kirurški aplicirao u prethodno pripremljeni segmentalni defekt lakatne kosti. Skupina D: Otopina rhBMP2 se nanijela na kolagensku spužvicu te se nakon 15 minuta natapanja spužvica kirurški aplicirala u pripremljeni defekt. Skupine E-F: krv se izvadila iz uške kunića u plastičnu tubu te se nakon toga krv navukla u injekciju u kojoj su se nalazile keramičke čestice građene od TCP-a (grupa E) ili BCP (grupa F) i ostavila da koagulira.

4.4. Kirurški zahvat i kliničko praćenje

Svi zahvati na životinjama u sklopu istraživanja bili su obavljani na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu uz primjenu odgovarajućih protokola anestezije i analgezije. Premedikacija se provodila u skladu s tjelesnom masom svake pojedine jedinice koristeći i.m. primjenu kombinacija ketamina u dozi od 30mg/kg, ksilazina u dozi 3,5 mg/kg i butorfanola u dozi 0,1 mg/kg. Nakon premedikacije, održavanje anestezije vršilo se inhalacijom 2-3% izoflurana u kombinaciji sa zrakom. Operacija je izvedena u sterilnim uvjetima kirurške sale te su životinje bile prekrivene sterilnom

kirurškom prekrivkom uz vizualizaciju kirurškog polja gdje je napravljen bočni rez duljine cca. 2,5 cm kroz kožu, potkožje, fasciju i mišićno tkivo kako bi se prikazala dijafiza lakatne kosti. Na središnjem dijelu dijafize lakatne kosti napravljen je segmentalni defekt duljine 15 mm u koji su dodani implantati sukladno pokusnom dizajnu. Kako bi se simulirali klinički uvjeti i radi stabilizacije defekta korištena je kirurška pločica. Na svakoj životinji operiran je desni prsni ud. Životinjama je tijekom postoperativnog praćenja snimljen RTG prednjeg desnog uda *in vivo* 4 i 8 tjedana nakon operacije u svrhu evaluacije procesa cijeljenja. Također, snimanje je obavljeno kako bi se odredilo trajanje pokusa prije žrtvovanja životinja. Životinje je svakodnevno pregledavao veterinar radi praćenja kliničkog stanja i prisutnosti potencijalnih komplikacija.

Pokusne životinje su na kraju pokusa eutanazirane na način da su primarno sedirane intramuskularnom primjenom kombinacije ketamina (Narketan, Vetoquinol, Belp Bern, Švicarska) u dozi 20 mg/kg i ksilazina (Xylapan, Vetoquinol, Belp Bern, Švicarska) u dozi 3 mg/kg nakon čega je intravenski primijenjen preparat T-61 (1ml/kg). Nakon radioloških snimanja i uzorkovanja lakatne i palčane kosti, životinje su neškodljivo uklonjene. Uzorci lakatne kosti su na kraju pokusa fiksirani u 10% formalinu te su arhivirani u 23% otopini etanola na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Na lakatnim kostima s kirurškim pločicama snimljen je *ex vivo* rendgen i mikro-CT. Nakon te dvije pretrage uslijedilo je skidanje kirurških pločica pomoću kirurške pile i kliješta. Nakon skidanja kirurških pločica uzorci su snimljeni rendgenom, CT i mikro-CT-om te je nakon toga dio uzoraka histološki obrađen nedekalcificiran a ostatak nakon dekalifikacije.

4.5. Metode evaluacije

4.5.1. Rendgenološko snimanje

Lakatne kosti su snimljene rendgenološkim uređajem (Siemens Multix Fusion, Njemačka) u standardnim projekcijama (LL: latero-lateralna projekcija; AP: antero-posteriorna projekcija) u Zavodu za rendgenologiju, ultrazvučnu dijagnostiku i fizikalnu terapiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Evaluacija cijeljenja napravljena je tijekom pokusa koristeći RTG snimanje lakatnih i palčanih kosti u standardnim projekcijama (DUMIC-CULE i sur., 2015.). Svi uzorci analizirani su i gradirani primjenom Cookove skale za procjenu uspješnosti koštanog cijeljenja. Radiološka procjena koštanog cijeljenja predstavlja ključan dio evaluacije uspješnosti pokusnih i kliničkih zahvata na kostima, jer omogućuje neinvazivno praćenje dinamike cijeljenja kroz vrijeme. Kako bi se smanjila subjektivnost interpretacije rendgenskih snimaka, razvijeni su standardizirani sustavi bodovanja koji kvantificiraju stupanj formiranja kalusa i uspostave kontinuiteta kortikalne kosti. Primjenom validiranih skala moguće je uspoređivati rezultate između različitih vremenskih točaka, jedinki i terapijskih pristupa te statistički analizirati tijek cijeljenja. Preliminarni rezultati analizirani su primjenom REBORNE skale, pri čemu je utvrđeno da je njezina pouzdanost suboptimalna zbog djelomično ograničene vizualizacije korteksa uzrokovane prisutnošću kirurške pločice. Budući da se REBORNE skala temelji na procjeni kortikalnog premošćenja i stupnja remodelacije, izrazito je ovisna o kvaliteti i projekciji rendgenoloških snimaka. Prisutnost kirurških implantata, poput pločica i vijaka, može djelomično ili potpuno onemogućiti prikaz korteksa, čime se smanjuju pouzdanost i reproducibilnost procjene (GOMEZ-BARRENA i sur., 2020.). Zbog toga je u ovom istraživanju korištena Cookova skala za procjenu cijeljenja koštanog defekta. Cookova skala (Tablica 2) predstavlja standardizirani sustav radiološke procjene stupnja koštanog cijeljenja koji se temelji na kvalitativnoj procjeni cijeljenja i kontinuiteta novonastale kosti unutar defekta. Obuhvaća raspon vrijednosti od 0 do 6, pri čemu niži stupnjevi označuju odsutnost promjena ili rane znakove mineralizacije, dok viši stupnjevi ukazuju na postupno premoštenje kortikalnih kostiju i formiranje homogeno organizirane nove kosti. Procjena se temelji na vidljivosti kalcifikacija, ujednačenosti intenziteta kosti te kontinuitetu kortikalne kosti na jednoj ili više strana defekta, čime se omogućuje praćenje progresije cijeljenja od početne faze stvaranja kalusa do potpune koštane rekonstrukcije i remodeliranja (COOK i sur., 1994.).

Tablica 2. Cookova skala za radiološku procjenu koštanog cijeljenja

Stupanj	Opis
0	Nema promjena u odnosu na neposredni postoperativni izgled.
1	Prisustvo tragova sjena intenziteta kosti unutar defekta.
2	Flokulentne sjene kosti s mrljama kalcifikacija.
3	Defekt je premošten u barem jednoj točki s materijalom neujednačene radiogustoće.
4	Defekt je premošten na medijalnoj i lateralnoj kortikalnoj kosti s materijalom ujednačene radiogustoće, uz vidljive završetke kortikalne kosti.
5	Kao stupanj 3, ali najmanje jedan od četiri korteksa premošten je uniformnom novom kosti.
6	Defekt je potpuno premošten jednoličnom novom kosti, bez vidljivih završetaka kortikalne kosti.

4.5.2. Kompjuterizirana tomografija

Nakon uklanjanja kirurške pločice s lakatne kosti uzorci su bili snimljeni CT uređajem SOMATOM go.Now (Siemens AG, Njemačka) u Zavodu za rendgenologiju, ultrazvučnu dijagnostiku i fizikalnu terapiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi analize stupnja cijeljenja segmentalnog defekta lakatne kosti. Pločice su uklonjene kako bi se izbjeglo stvaranje artefakata zbog prisutnosti metala (GJESTEBY i sur., 2016.). CT snimanje provedeno je prema protokolu: 130 kV, 100 mAs, pitch (pomak stola tijekom jedne rotacije podijeljen s debljinom sloja) 0,8 te debljina presjeka 0,60 mm. Na dobivenim CT presjecima analizirana je struktura kosti i postojanje eventualnih heterotopičnih osifikacija. Izrađene su 3D rekonstrukcije u svrhu vizualizacije koštanog kalusa te detekcije potencijalnih komplikaciju poput heterotopičnih osifikacija.

4.5.3. Mikro-CT snimanje

Mikro-CT uređaji omogućavaju puno veću rezoluciju snimanja u odnosu na konvencionalne CT uređaje. Zbog toga su radi analize mikrostrukture novostvorene kosti uzorci snimljeni mikro-CT uređajem SkyScan 1076 (Bruker, Massachusetts, SAD) u Laboratoriju za mineralizirana tkiva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rezolucija snimanja je podešena na 18 µm jer se u dosadašnjim pokusima ta rezolucija pokazala optimalnom za analizu koštanog tkiva (GRGUREVIC i sur., 2020.). Također, radi boljeg prikaza koštanog tkiva

korišten je aluminijski filter debljine 0,5 mm. Nakon završetka snimanja, dobivene snimke su rekonstruirane pomoću programa NRecon (Bruker, Belgija) a cjelokupna mikro-CT analiza je napravljena korištenjem programa CTAn (Bruker, Belgija). Pomoću mikro-CT analize određeni su volumen i trabekularni parametri (debljina trabekula, broj trabekula, separacija trabekula) novostvorene kosti te volumen neresorbiranih keramičkih čestica.

4.5.4. Histologija

Neposredno nakon uzorkovanja uzorci su pohranjeni u 4%-tnu otopinu formalina radi fiksacije. Nakon fiksacije tkiva uzorci su histološki obrađeni. Dio uzoraka procesiran je nedekalcificirano (2 uzorka po pokusnim skupinama i 1 uzorak po kontrolnoj skupini) a preparati su izrađeni u laboratoriju Ratliff Histology Consultants (Franklin, Tennessee, USA) prema standardnom protokolu (IVANJKO i sur., 2023., STOKOVIC i sur., 2025., STOKOVIC i sur., 2026.). Preostali uzorci su podvrgnuti procesu dekalifikacije i histološkoj obradi u Laboratoriju za mineralizirana tkiva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci koji se procesiraju nedekalcificirani su prvo dehidrirani pomoću stupnjevanih otopina etilnog alkohola (70%, 80%, 95% i 100%) i automatiziranog sustava za obradu tkiva (ASP300S, Leica Biosystems, Buffalo Grove, Illinois, SAD). Nakon toga, uzorci su uklopljeni u rezin te su pomoću automatiziranog mikrotoma (SM2500, Leica Biosystems, Buffalo Grove, Illinois, SAD) narezani histološki rezovi debljine 5 μm , koji su se zatim fiksirali na mikroskopska stakalca (GOLDSCHLAGER, i sur., 2010.). Histološki rezovi su deplastificirani u sklopu pripreme za histološka bojenja. Uzorci koji su bili obrađeni dekalifikacijom su stavljeni 20 dana u otopinu za dekalifikaciju (14% EDTA u 4% otopini formalina). Nakon procesa dekalifikacije, uzorci su uklopljeni u parafin, te su mikrotomom narezani histološki rezovi debljine 5-6 μm . Histološki rezovi su obojani standardnim bojenjima koja se primjenjuju za analizu koštanog tkiva (Goldner, hematoksilin-eozin i Von Kossa) (SCHNEIDER, 2021., RENTSCH i sur., 2014.). Histološki preparati su snimljeni pomoću programa cellDimensions (Olympus, Japan) u kombinaciji s mikroskopom Olympus BX53 (Olympus, Japan). Na histološkim preparatima analizirana je oseointegracija novostvorene s nativnom kosti, mikroarhitektura novostvorene kosti kao i stupanj resorpcije sintetske keramike (IVANJKO i sur., 2023.). Mikroskopiranje i analiza histoloških preparata provedeno je u Laboratoriju za mineralizirana tkiva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4.6. Statistička obrada podataka

Broj uzoraka u pokusnim skupinama određen je snagom testa od 80% (G-power program), te na osnovi literaturnih smjernica i varijabilnosti rezultata prethodnih pokusa u navedenom modelu. Normalnost raspodjele podataka testirana je adekvatnim testom (Kolmogorov – Smirnov test). U slučaju normalne distribucije primijenjena je jednostrana ili dvostrana analiza varijance (ovisno o pokusu) uz odgovarajući *post-hoc* test. Prilikom ne - Gaussove raspodjele, primijenili su se neparametrijski testovi (Kruskal – Wallis test) uz odgovarajući *post-hoc* test (Mann - Whitney U - test). Dobiveni rezultati su se prikazali kao prosječna vrijednost +/- standardna devijacija (Gaussova raspodjela) ili kao medijan s interkvartilnim rasponima (ne – Gaussova raspodjela). Značajnima su se smatrale P vrijednosti manje od 0.05.

5. REZULTATI

5.1. Rendgenološko snimanje

Rendgenološko snimanje lakatnih kostiju provodilo se u četiri vremenske točke: 0.dan, 4. tjedan, i 8. tjedan *in vivo*, te 17. tjedan *ex vivo*.

5.1.1. Vremenska točka snimanja 0. dan

Na laterolateralnoj projekciji podlaktice kunića *in vivo* vizualizirao se oštro ograničeni koštani defekt duljine 15 milimetara u proksimalnoj trećini dijafize lakatne kosti (Slika 5). Na lateralnoj margini kortikalne lakatne kosti je bila vidljiva sjena intenziteta metala koja odgovara kirurškoj pločici učvršćenju s dva kortikalna vijka proksimalno i dva kortikalna vijka distalno od segmentalnog defekta. Primarna svrha rendgenskog snimanja 0. dan bila je provjera pozicije implantata. U uzorcima koji sadrže keramiku (rhBMP6/ABC/TCP, rhBMP6/ABC/BCP, ABC/TCP i ABC/BCP) u segmentalnom defektu vizualizirale su se milimetarske čestice intenziteta sjene jače od sjene kosti (keramičke čestice).



Slika 5. Laterolateralne projekcije podlaktice kunića *in vivo* 0. dan sa segmentalnim koštanim defektom duljine 15 mm u proksimalnoj trećini dijafize lakatne kosti, stabiliziranim pločicom i vijcima. Na slici su prikazane pokusne životinje tretirane implantatima koji su sadržavali rhBMP6/ABC/BCP odnosno rhBMP6/ABC.

5.1.2. Vremenska točka snimanja 4. tjedan

Na laterolateralnoj projekciji podlaktice kunića *in vivo* vizualizirao se segmentalni koštani defekt duljine 15 milimetara u proksimalnoj trećini dijafize lakatne kosti. U uzorcima pokusnih skupina (rhBMP6/ABC, rhBMP2/ACS, rhBMP6/ABC/TCP i rhBMP6/ABC/BCP) bila je vidljiva formacija koštanog tkiva unutar segmentalnog defekta različite distribucije i radiodenziteta (Slika 6). U uzorcima koji su sadržavali keramiku (rhBMP6/ABC/TCP i rhBMP6/ABC/BCP) bila je vidljiva sjena intenziteta kosti integrirana između keramičkih čestica (Slika 6). Novostvorena kost u uzorcima koji su sadržavali rhBMP6/rhBMP2 na odgovarajućem nosaču (rhBMP6/ABC, rhBMP2/ACS) bila je trabekularnog izgleda. U kontrolnim skupinama (ABC/TCP i ABC/BCP) nije bilo značajnog premoštenja kortikalne niti trabekularne kosti (Slika 6). Evaluacijom prema Cookovoj skali u četvrtom tjednu nakon implantacije rezultati su pokazali značajno bolje rezultate u životinja tretiranih rhBMP6/ABC implantatima uz dodatak sintetičke keramike u usporedbi s onima tretiranim samo s rhBMP6/ABC (Slika 9). Konkretno, Osteogrow-C implantati omogućili su premošćivanje defekta, iako bez potpune obnove kortikalne kosti. S druge strane, kontrolne skupine koje su se sastojale od uzoraka bez BMP-a (ABC/TCP i ABC/BCP) nisu pokazale značajne promjene u odnosu na 0. dan.



Slika 6. Laterolateralne projekcije podlaktice kunića *in vivo* 4. tjedan sa segmentalnim koštanim defektom duljine 15 mm u proksimalnoj trećini dijafize lakatne kosti, stabiliziranim pločicom i vijcima. Pokusne životinje su tretirane implantatima koji su sadržavali rhBMP6/ABC/BCP, rhBMP6/ABC/TCP, rhBMP6/ABC, rhBMP2/ACS, ABC/BCP i ABC/TCP.

5.1.3. Vremenska točka snimanja 8. tjedan

Na laterolateralnoj projekciji podlaktice kunića u osmom tjednu *in vivo* u segmentalnim defektima lakatne kosti kunića koji su pripadali pokusnim skupinama (rhBMP6/ABC, rhBMP2/ACS, rhBMP6/ABC/TCP i rhBMP6/ABC/BCP) bila je vidljiva sjena intenziteta kosti u području defekta različitog radiodenziteta (Slika 7). Bilo je vidljivo početno stvaranje kortikalne kosti u pokusnim uzorcima koji su sadržavali keramiku (rhBMP6/ABC/TCP i rhBMP6/ABC/BCP), dok se u uzorcima koji su sadržavali rhBMP6/rhBMP2 na odgovarajućem nosaču (rhBMP6/ABC, rhBMP2/ACS) vizualizirala sjena intenziteta kosti isključivo u području medularnog kanala te je bila trabekularnog izgleda. U kontrolnim uzorcima nije bilo značajnog stvaranja koštanog tkiva u segmentalnom defektu (Slika 7). Osam tjedana nakon implantacije, evaluacijom prema Cookovoj skali (Slika 9), kortikalna kost bila je značajno obnovljena u životinja tretiranih s obje Osteogrow-C formulacije. S druge strane, uzorci s rhBMP6/ABC i rhBMP2/ACS omogućili su premošćivanje defekta, ali bez potpune obnove kortikalne kosti. Defekti tretirani implantatima bez BMP-a (ABC/TCP i ABC/BCP) nisu postigli premošćivanje defekta, iako je zabilježeno povećanje radiodenziteta u odnosu na postoperativno stanje.



Slika 7. Laterolateralne projekcije podlaktice kunića *in vivo* 8. tjedan sa segmentalnim koštanim defektom duljine 15 mm u proksimalnoj trećini dijafize lakatne kosti, stabiliziranim pločicom i vijcima. Pokusne životinje su tretirane implantatima koji su sadržavali rhBMP6/ABC/BCP, rhBMP6/ABC/TCP, rhBMP6/ABC, rhBMP2/ACS, ABC/BCP i ABC/TCP.

5.1.4. Vremenska točka snimanja 17. tjedan

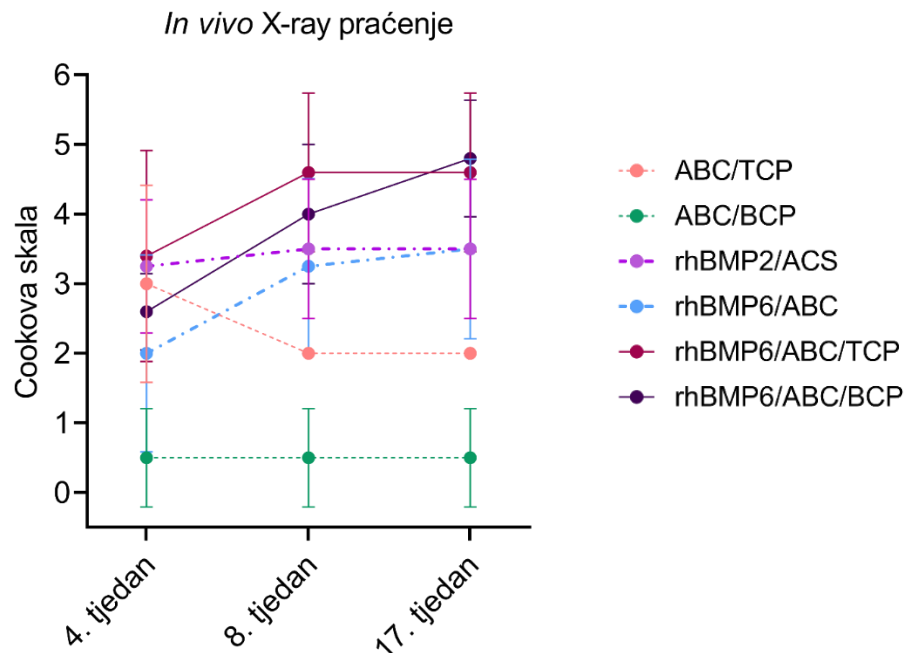
Na laterolateralnim projekcijama podlaktica kunića u sedamnaestom tjednu *ex vivo* u segmentalnom defektu pokusnih skupina (rhBMP6/ABC, rhBMP2/ACS, rhBMP6/ABC/TCP i rhBMP6/ABC/BCP) bilo je vidljivo popunjavanje segmentalnog defekta lakatne kosti sjenom intenziteta kosti gotovo homogenog izgleda (Slika 8). Kortikalne kosti su bile prisutne i kontinuirane. U uzorcima koji su sadržavali trikalcij-fosfatne keramičke čestice bila je zamjetna djelomična resorpcija istih (rhBMP6/ABC/TCP i ABC/TCP). U kontrolnim uzorcima (ABC/TCP i ABC/BCP) nije bilo značajnog stvaranja koštanog tkiva. Evaluacijom prema Cookovoj skali sedamnaest tjedana nakon operacije, defekti tretirani Osteogrow-C formulacijama pokazali su potpuno premošćivanje segmentalnog defekta. Nadalje, primjena rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC rezultirala je zadovoljavajućom obnovom kortikalne kosti. S druge strane, životinje koje su pripadale kontrolnim skupinama (ABC/TCP i ABC/BCP) nisu postigle zarastanje segmentalnih defekata.



Slika 8. Laterolateralne projekcije podlaktice kunića *ex vivo* 17. tjedan sa segmentalnim koštanim defektom duljine 15 mm u proksimalnoj trećini dijafize lakatne kosti, stabiliziranim pločicom i vijcima. Pokusne životinje su tretirane implantatima koji su sadržavali rhBMP6/ABC/BCP, rhBMP6/ABC/TCP, rhBMP6/ABC, rhBMP2/ACS, ABC/BCP i ABC/TCP.

5.1.5. Evaluacija prema Cookovoj skali

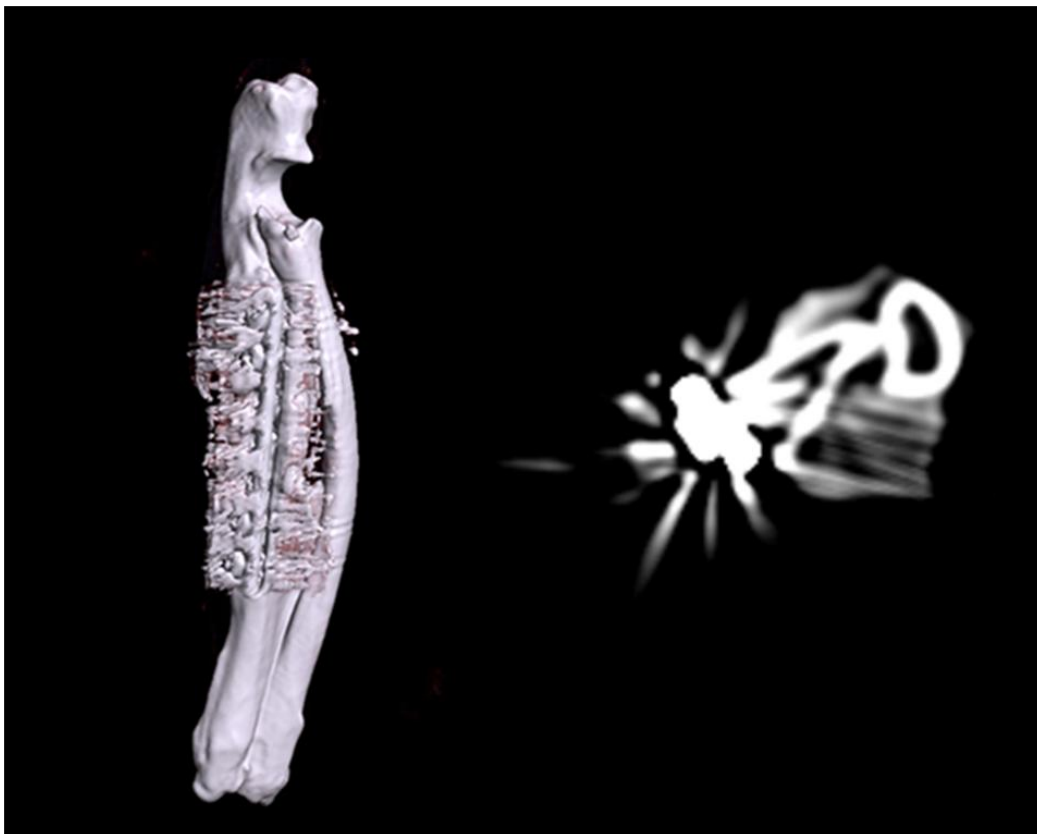
Sumarno, evaluacija prema Cookovoj skali pokazala je vremenski ovisno poboljšanje cijeljenja u skupinama tretiranim Osteogrow-C formulacijama. Već u četvrtom tjednu uočen je trend boljeg premošćivanja defekta u skupinama s dodatkom sintetičke keramike u odnosu na rhBMP6/ABC bez keramike, dok kontrolne skupine bez BMP-a nisu pokazale značajan napredak cijeljenja. Nakon osam tjedana zabilježena je izraženija obnova kortikalne kosti u Osteogrow-C skupinama, dok su rhBMP6/ABC i rhBMP2/ACS omogućili premošćivanje defekta bez potpune kortikalne restitucije. U sedamnaestom tjednu Osteogrow-C formulacije postigle su potpuno premošćivanje segmentalnog defekta, uz bolje rezultate u odnosu na ostale pokusne skupine, dok u kontrolnim skupinama nije došlo do zadovoljavajućeg zarastanja.



Slika 9. Grafički prikaz praćenja pokusnih skupina po vremenskim točkama po Cookovoj skali. Raspodjela RTG ocjene regeneracije prema Cookovoj skali (1-6) kroz vremenske intervale.

5.2. Kompjuterizirana tomografija

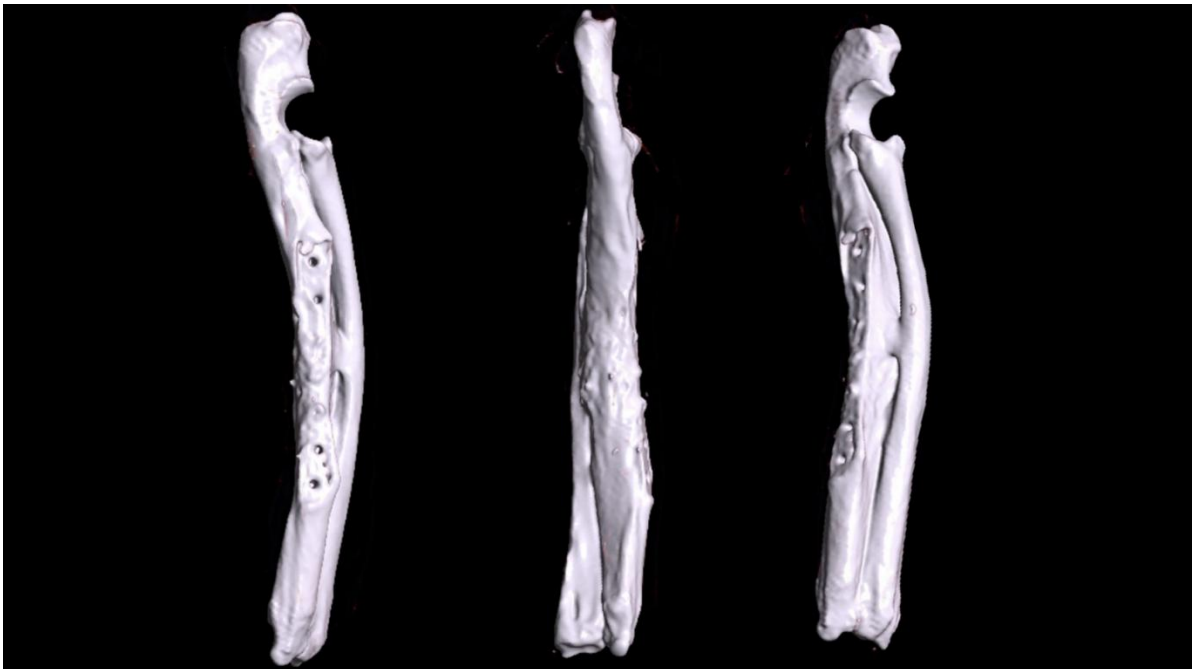
CT snimanje provedeno je na uzorcima lakatnih i palčanih kostiju *ex vivo*, prije i nakon uklanjanja kirurške pločice i kortikalnih vijaka. Kvaliteta snimaka i 3D rekonstrukcija bila je značajno poboljšana nakon uklanjanja metalnih implantata. Prisutnost metala uzrokovala je stvaranje opsežnih artefakata na snimkama. Nakon uklanjanja kirurških pločica i kortikalnih vijaka, CT snimke izoliranih lakatnih i palčanih kostiju su revidirane, a trodimenzionalne rekonstrukcije evaluirane. Artefakt uzrokovan metalnom pločicom u CT dijagnostici odnosio se na greške ili smetnje koje su se javljale u prikazu slike zbog prisutnosti metalnih objekata odnosno kirurške fiksacijske pločice. Artefakt se prikazivao u vidu svijetlih traka ili linija na slici, koje su se protezale od pločice prema okolnom području. Na slici 10 prikazan je artefakt uzrokovan metalnom kirurškom pločicom i kortikalnim vijcima na trodimenzionalnoj CT rekonstrukciji. Metalna pločica stvara radijalne (zrakaste) artefakte koji onemogućuju pouzdanu procjenu cijeljenja segmentalnog koštanog defekta.



Slika 10. Trodimenzionalna rekonstrukcija CT snimke uzorka kosti u koji je ugrađena kirurška osteosintezna pločica s vijcima. Prisutnost metalnog implantata uzrokuje izražene radiološke artefakte koji značajno narušavaju kvalitetu prikaza okolnih anatomskih struktura.

5.2.1. Pokusna skupina A (rhBMP6/ABC/TCP)

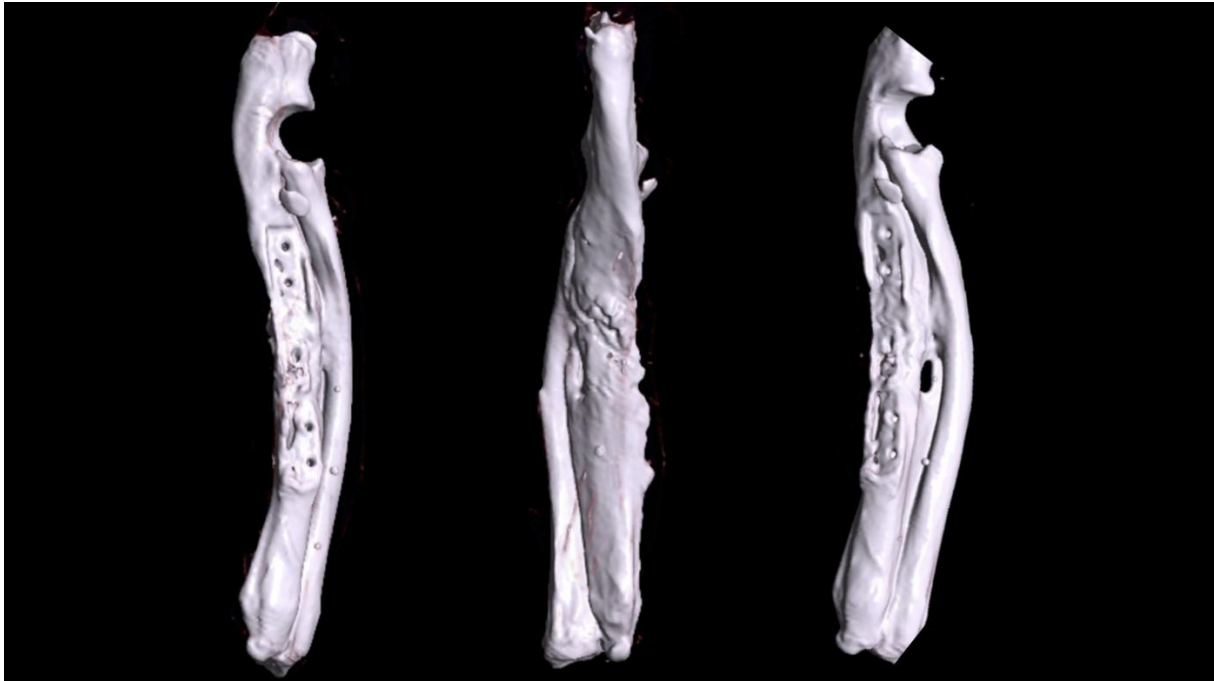
U segmentalnom defektu bilo je vidljivo potpuno koštano premoštenje u svim uzorcima, s kortikalnim kostima pravilnih margina (Slika 11). Detaljna vizualizacija unutar segmentalnog defekta otkrila je prisutnost sitnih, nepravilnih, okruglastih čestica promjera u milimetrima, koje su bile raspoređene difuzno unutar regenerirane kosti. Ove čestice histološki i radiološki odgovarale su implantiranoj keramici (TCP). Osim toga, u nekim područjima bila je moguće uočiti razliku u gustoći i radiopacitetu između novonastale koštane mase i očuvanih keramičkih struktura, što je omogućilo diferencijaciju između regeneriranog tkiva i implantiranog materijala. Trodimenzionalni prikazi također su prikazali kontinuitet korteksa kroz većinu segmenta, s diskretnim lokalnim zadebljanjima i nepravilnostima u strukturi koje su korelirale s prisutnošću keramičkih čestica.



Slika 11. Trodimenzionalni prikaz lakatne i palčane kosti u pokusnoj skupini A (rhBMP6/ABC/TCP) pokazivao je potpuno koštano premoštenje defekta s kontinuiranim kortikalnim konturama. Unutar regenerirane koštane mase bile su vidljive brojne sitne, difuzno raspoređene okruglaste čestice koje su odgovarale neresorbiranim keramičkim česticama.

5.2.2. Pokusna skupina B (rhBMP6/ABC/BCP)

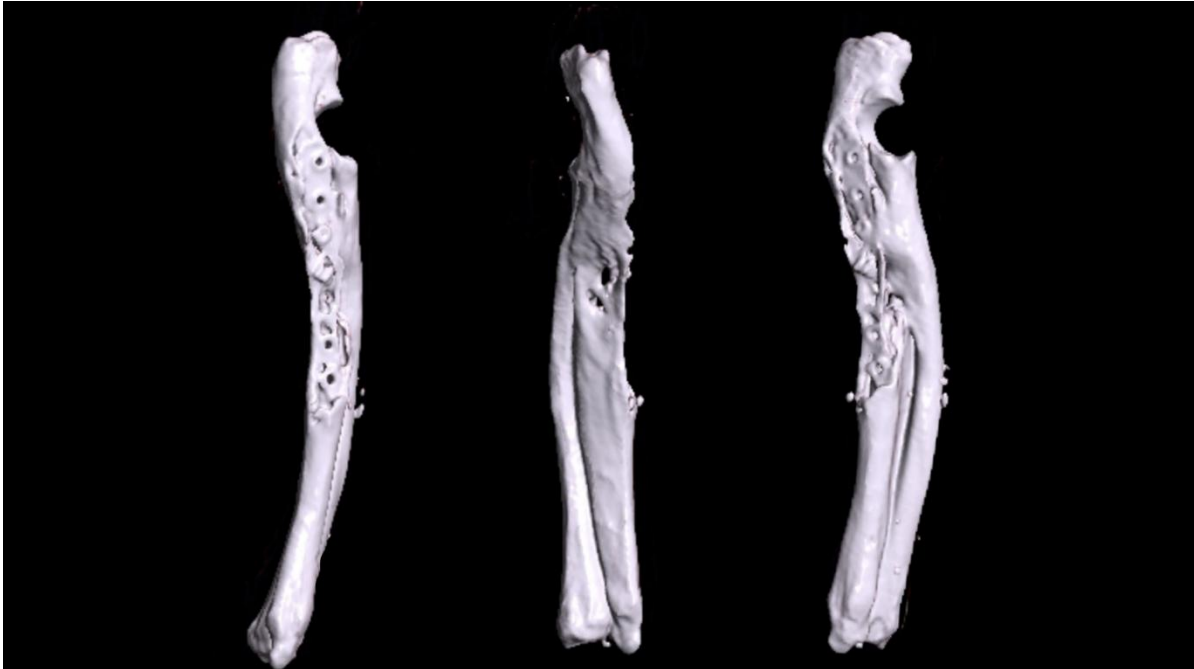
U segmentalnom defektu uočavalo se potpuno koštano premoštenje u svim analiziranim uzorcima. Kortikalna kost je bila očuvana i imala je pravilne margine, bez vidljivih znakova resorpcije ili fragilnosti (Slika 12). U nekim dijelovima zacijeljenog segmentalnog defekta, osobito u središnjim područjima, bile su prisutne nepravilne, okruglaste milimetarske čestice koje su odgovarale implantiranoj keramici (BCP). Te čestice bile su razmjerno raspoređene, djelomično integrirane u okolno koštano tkivo i bile su vidljive kao fragmenti unutar novonastale kosti. Kontinuitet kortikalne kosti bio je potpun duž cijele dužine zacijeljenog segmentalnog defekta, bez znakova destrukcije ili nepravilne mineralizacije. Na 3D rekonstrukcijama jasno se vidjela pravilna simetrija kortikalne kosti (Slika 12). Osim toga, uočavala se homogena gustoća mineralizacije duž cijelog premoštenog segmenta, a rubni dijelovi kosti pokazivali su uredan prijelaz između nativne i nove kosti.



Slika 12. Trodimenzionalni prikaz lakatne i palčane kosti u pokusnoj skupini B (rhBMP6/ABC/BCP) pokazivao je potpuno koštano premoštenje defekta s očuvanim, glatkim kortikalnim konturama. Unutar regenerirane kosti bile su vidljive okruglaste milimetarske čestice koje su odgovarale neresorbiranim keramičkim česticama.

5.2.3. Pokusna skupina C (ABC/rhBMP6)

Analiza uzoraka pokazala je potpuno koštano premoštenje segmentalnog defekta u skupini tretiranoj s rhBMP6/ABC (Osteogrow), uz restauraciju kortikalnih slojeva i uspostavu kontinuiteta s okolnom nativnom kosti (Slika 13). Trodimenzionalna rekonstrukcija potvrdila je regeneraciju defekta s uspostavom strukturnog i funkcionalnog kontinuiteta kosti (Slika 13). Valja istaknuti i kako u jednom uzorku nije došlo do potpunog cijeljenja defekta što korelira s djelomično nepravilno ugrađenom implantatu u toj životinji.



Slika 13. Trodimenzionalni prikaz lakatne i palčane kosti u pokusnoj skupini C (rhBMP6/ABC) pokazivao je potpuno koštano premoštenje segmentalnog defekta uz očuvan kontinuitet regenerirane kosti.

5.2.4. Pokusna skupina D (rhBMP2/ACS)

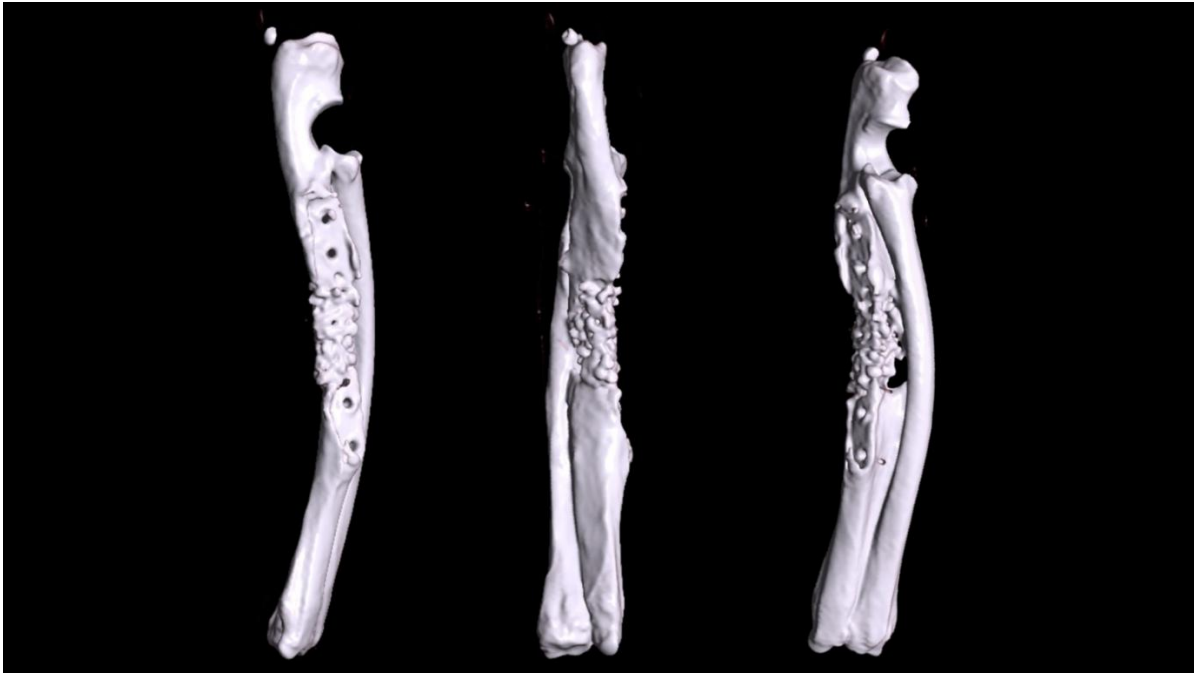
U segmentalni defekt bila je implantirana kombinacija goveđe kolagenske spužvice (ACS) i rekombinantnog ljudskog koštanog morfogenetskog proteina 2 (rhBMP2). Analizom 3D rekonstrukcija uzoraka uočeno je potpuno koštano premoštenje segmentalnog defekta (Slika 14). Regenerirana koštana struktura pokazivala je homogenost u kontinuitetu i integritetu, no valja istaknuti i kako je na jednom uzorku bila vidljiva gotovo potpuna koštana povezanost lakatne i palčane kosti duž cijele duljine segmentalnog defekta.



Slika 14. Trodimenzionalni prikaz lakatne i palčane kosti u pokusnoj skupini D (rhBMP2/ACS) pokazivao je potpuno koštano premoštenje segmentalnog defekta uz očuvan kontinuitet regenerirane kosti.

5.2.5. Kontrolna skupina E (ABC/TCP)

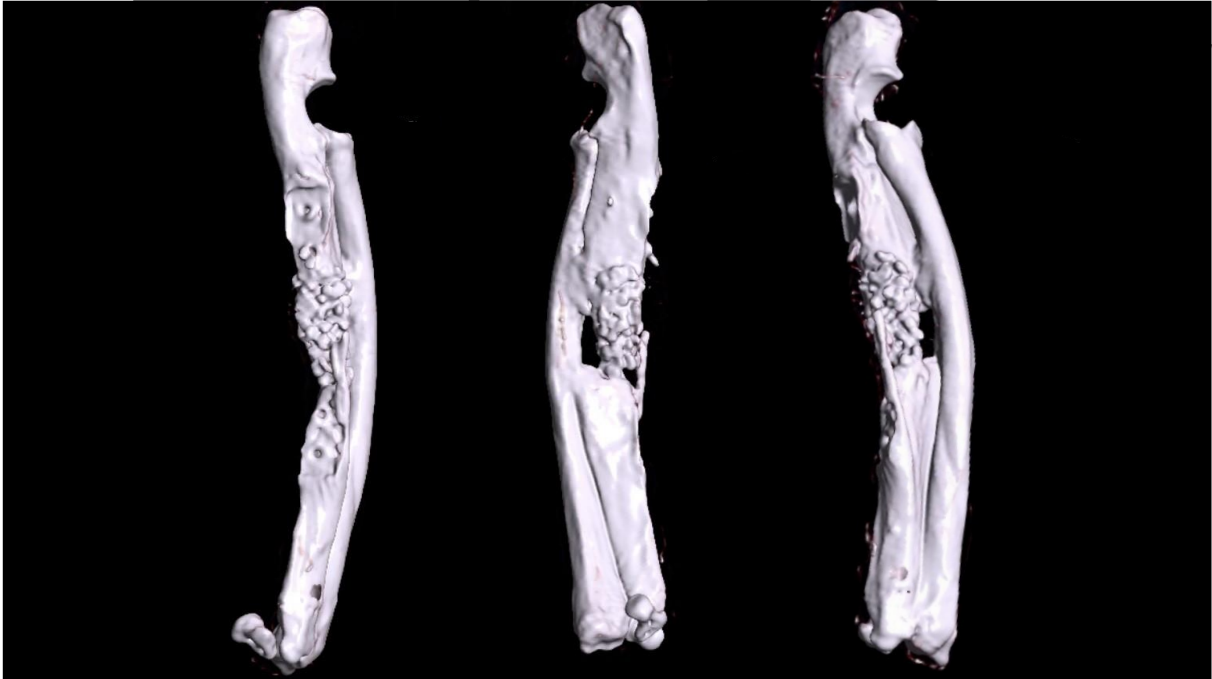
U segmentalnom defektu bile su vidljive nepravilne, okruglaste milimetarske čestice koje su odgovarale implantiranoj keramici. Defekt se i dalje vizualizirao, a kortikalne kosti nisu bile kontinuirane u području segmentalnog defekta (Slika 15). Zaobljenost rubova native kosti sugerirao je završetak aktivne osteogene faze te trajnu prisutnost segmentalnog defekta.



Slika 15. Trodimenzionalni prikaz lakatne i palčane kosti u kontrolnoj skupini E (ABC/TCP) prikazuje segmentalni defekt bez znakova koštanog premoštenja. U segmentalnom defektu bile su vidljive okruglaste čestice koje odgovaraju keramičkim česticama.

5.2.6. Kontrolna skupina F (ABC/BCP)

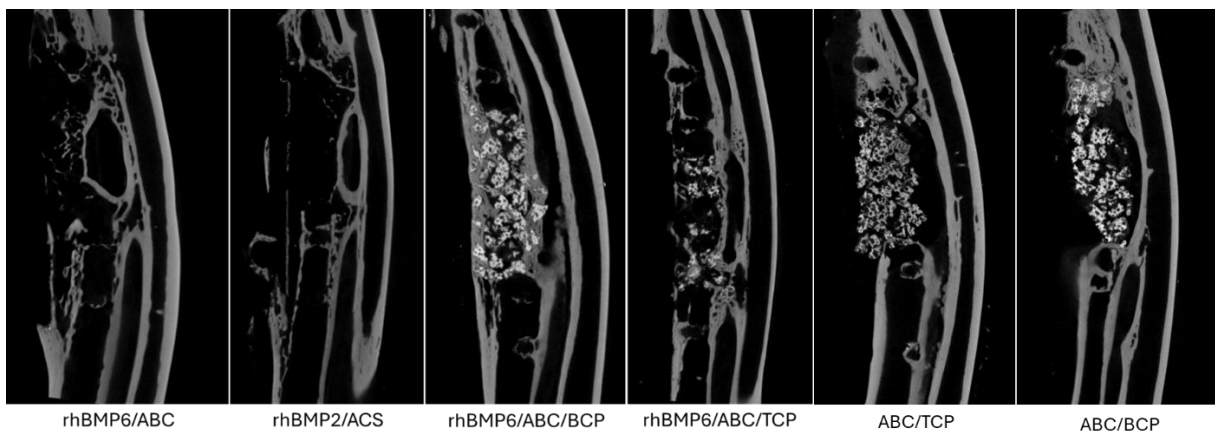
U segmentalnom defektu bile su vidljive nepravilne, okruglaste milimetarske čestice koje su odgovarale implantiranoj keramici. Defekt se i dalje vizualizirao, a kortikalna kost nije bila kontinuirana u području segmentalnog defekta (Slika 16). Zaobljenost rubova native kosti sugerirao je završetak aktivne osteogene faze te trajnu prisutnost segmentalnog defekta.



Slika 16. Trodimenzionalni prikaz lakatne i palčane kosti u kontrolnoj skupini F (ABC/BCP) prikazuje segmentalni defekt bez znakova koštanog premoštenja. U segmentalnom defektu bile su vidljive okruglaste čestice koje odgovaraju keramičkim česticama (BCP).

5.3. Mikro-CT snimanje

Rezultati analize cijeljenja segmentalnog defekta korištenjem mikro-CT snimaka bili su u skladu s nalazima dobivenima rendgenskom analizom te su pokazali jasne razlike u stupnju cijeljenja koštanog defekta između ispitivanih skupina. U skupinama liječenim formulacijama Osteogrow-C koje su sadržavale TCP i BCP keramiku utvrđeno je potpuno cijeljenje koštanog defekta uz obnovu kortikalnih kontura i uspostavu kontinuiteta kosti. Novostvorena kost ispunjavala je područje defekta, a morfologija rekonstruirane kosti upućivala je na uspješnu regeneraciju. U skupinama liječenim pomoću rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC također je zabilježeno izraženo cijeljenje defekta s gotovo potpunom obnovom korteksa i značajnim ispunjenjem defekta novostvorenom kosti. Suprotno tome, u skupinama liječenim ABC/TCP i ABC/BCP zabilježeno je tek sporadično stvaranje nove kosti unutar defekta, bez obnove kortikalnih struktura i bez uspostave kontinuiteta koštanog tkiva. Defekti u tim skupinama nisu pokazivali znakove potpunog cijeljenja.

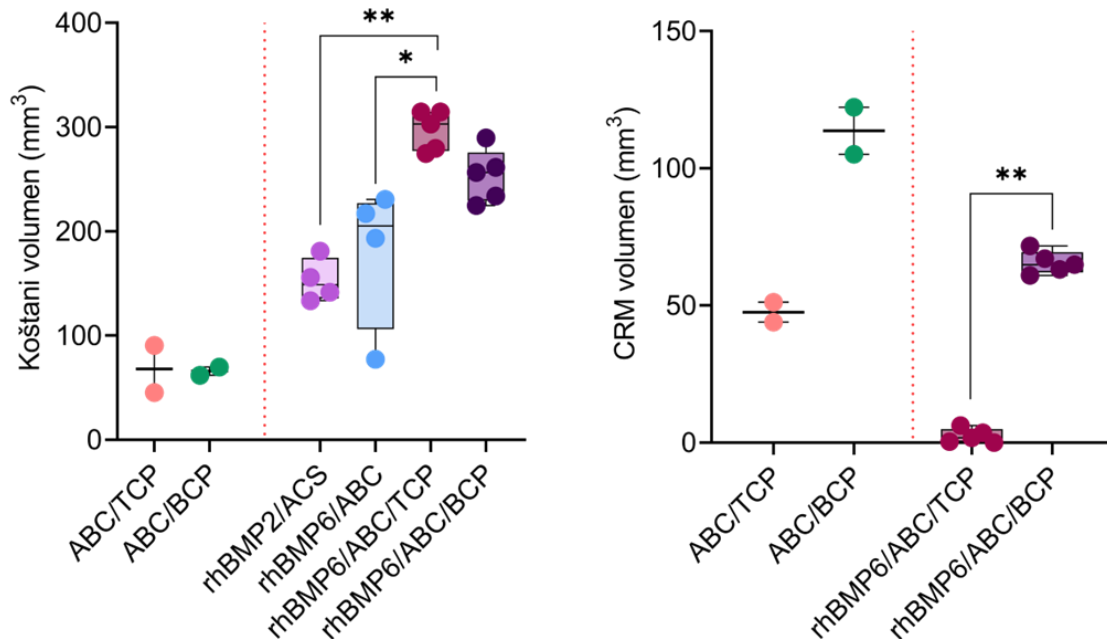


Slika 17. Sagitalni mikro-CT presjeci prikazuju razlike u koštanom volumenu i stupnju resorpcije keramike između ispitivanih formulacija. Formulacije rhBMP6/ABC i rhBMP2/ACS pokazuju manji koštani volumen u usporedbi rhBMP6/ABC/BCP i rhBMP6/ABC/TCP. Pokusna skupina rhBMP6/ABC/BCP i kontrolna skupina ABC/BCP pokazuje veći udio neresorbiranih keramičkih čestica u odnosu na pokusnu skupinu rhBMP6/ABC/TCP i kontrolnu skupinu ABC/TCP.

5.3.1. Mikro-CT analiza

Koštani volumen određen je pomoću mikro-CT analize u pokusnim i kontrolnim skupinama (Slika 18). U pokusnim skupinama najviše vrijednosti bile su zabilježene u skupini rhBMP6/ABC/TCP, koja je pokazala statistički značajno veći koštani volumen u usporedbi sa skupinom rhBMP2/ACS ($p < 0,01$) te sa skupinom rhBMP6/ABC ($p < 0,05$). Kontrolne skupine pokazale su niske vrijednosti bez statistički značajnih razlika među njima, što je potvrdilo limitiranu osteogenezu.

U pokusnim skupinama, rhBMP6/ABC/BCP imao je statistički značajno veći CRM volumen u usporedbi s rhBMP6/ABC/TCP ($p < 0,01$). Vrsta keramičkih čestica imala je izraženiji utjecaj na zadržavanje volumena materijala u uvjetima prisutnosti osteoinduktivnog čimbenika rhBMP6. Volumen keramičkih čestica unutar kontrolnih skupina (ABC/BCP i ABC/TCP) nije pokazao statistički značajnu razliku, iako je u skupini ABC/BCP bio zabilježen trend viših vrijednosti u odnosu na ABC/TCP.

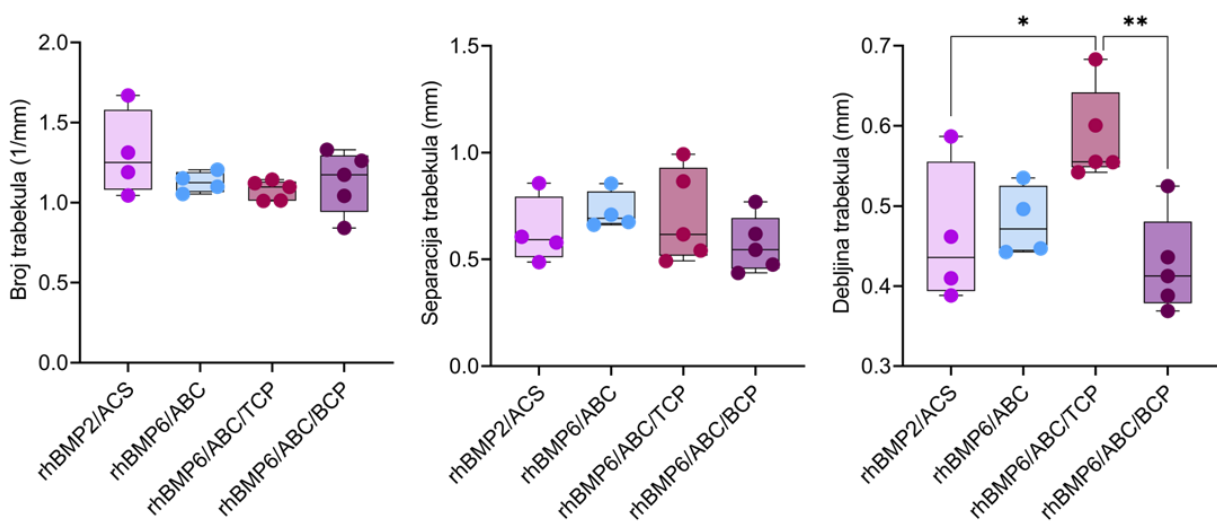


Slika 18. Grafički prikaz raspodjele vrijednosti koštanog volumena i CRM volumena u pokusnim i kontrolnim skupinama.

Broj trabekula nije pokazao statistički značajne razlike između pokusnih skupina (Slika 19). Skupina rhBMP2/ACS pokazala je najviše medijalne vrijednosti te širi raspon rezultata, što upućuje na veću interindividualnu varijabilnost. Skupine rhBMP6/ABC i rhBMP6/ABC/TCP imale su niže i relativno ujednačene vrijednosti, s uskim intervalom raspona i minimalnim odstupanjima. Skupina rhBMP6/ABC/BCP pokazala je intermedijarne vrijednosti uz umjerenu varijabilnost.

Separacija trabekula nije pokazala statistički značajne razlike među pokusnim skupinama (Slika 19). Analiza distribucije vrijednosti ukazuje na određene trendove među skupinama. Skupina rhBMP6/ABC/TCP pokazala je tendenciju viših vrijednosti separacije trabekula uz najveću disperziju rezultata. Skupine rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC/BCP imale su intermedijarne vrijednosti s umjerenom varijabilnošću. Najujednačenija raspodjela vrijednosti zabilježena je u skupini rhBMP6/ABC, koja je pokazala najuži raspon rezultata.

Analiza debljine trabekula pokazala je razlike između pokusnih skupina (Slika 19). Najviše vrijednosti debljine trabekula zabilježene su u skupini rhBMP6/ABC/TCP. Analiza je pokazala da je debljina trabekula bila značajno veća u skupini rhBMP6/ABC/TCP u usporedbi sa skupinom rhBMP2/ACS ($p < 0,05$) te u usporedbi sa skupinom rhBMP6/ABC/BCP ($p < 0,01$). Između ostalih pokusnih skupina nisu utvrđene statistički značajne razlike. Distribucija vrijednosti unutar skupina pokazala je umjerenu varijabilnost, pri čemu su rhBMP2/ACS i rhBMP6/ABC/BCP skupine imale niže medijalne vrijednosti debljine trabekula, dok je skupina rhBMP6/ABC pokazala intermedijarne rezultate.

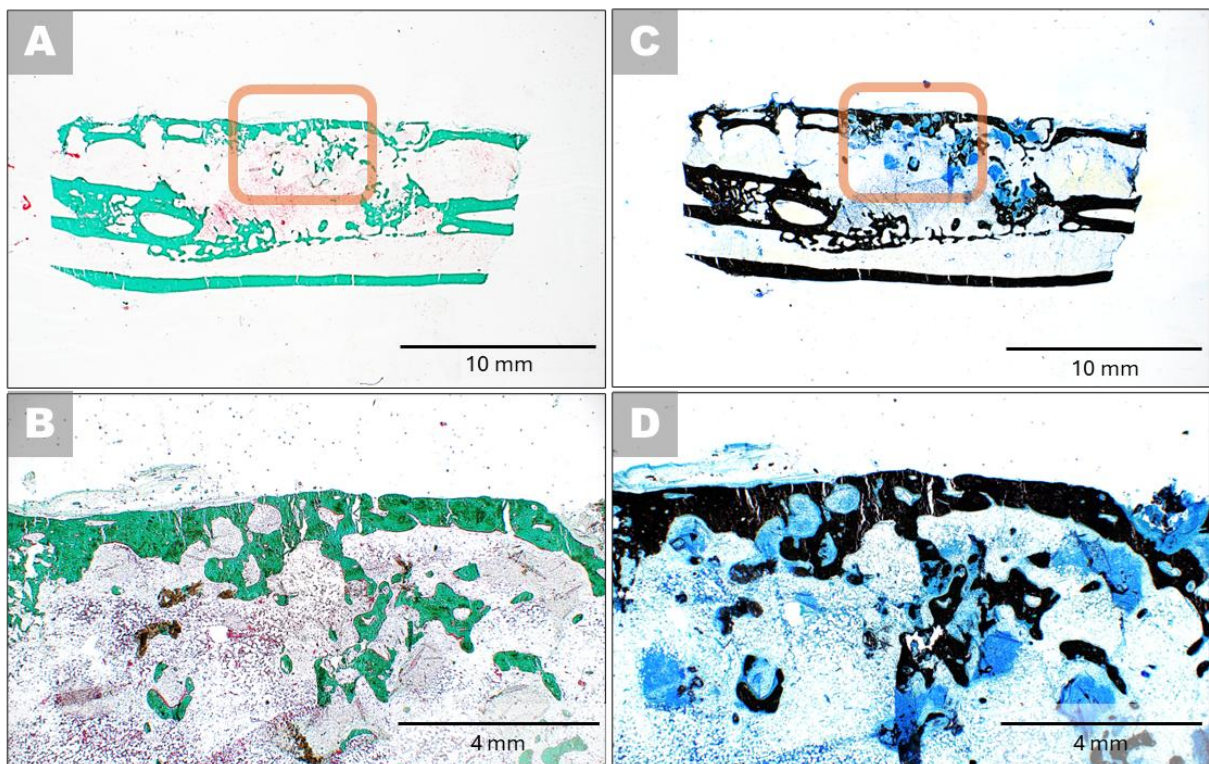


Slika 19. Grafički prikaz raspodjele vrijednosti broja, debljine i separacije trabekula pokusnih skupina.

5.4. Histologija

5.4.1. Pokusna skupina A (rhBMP6/ABC/TCP)

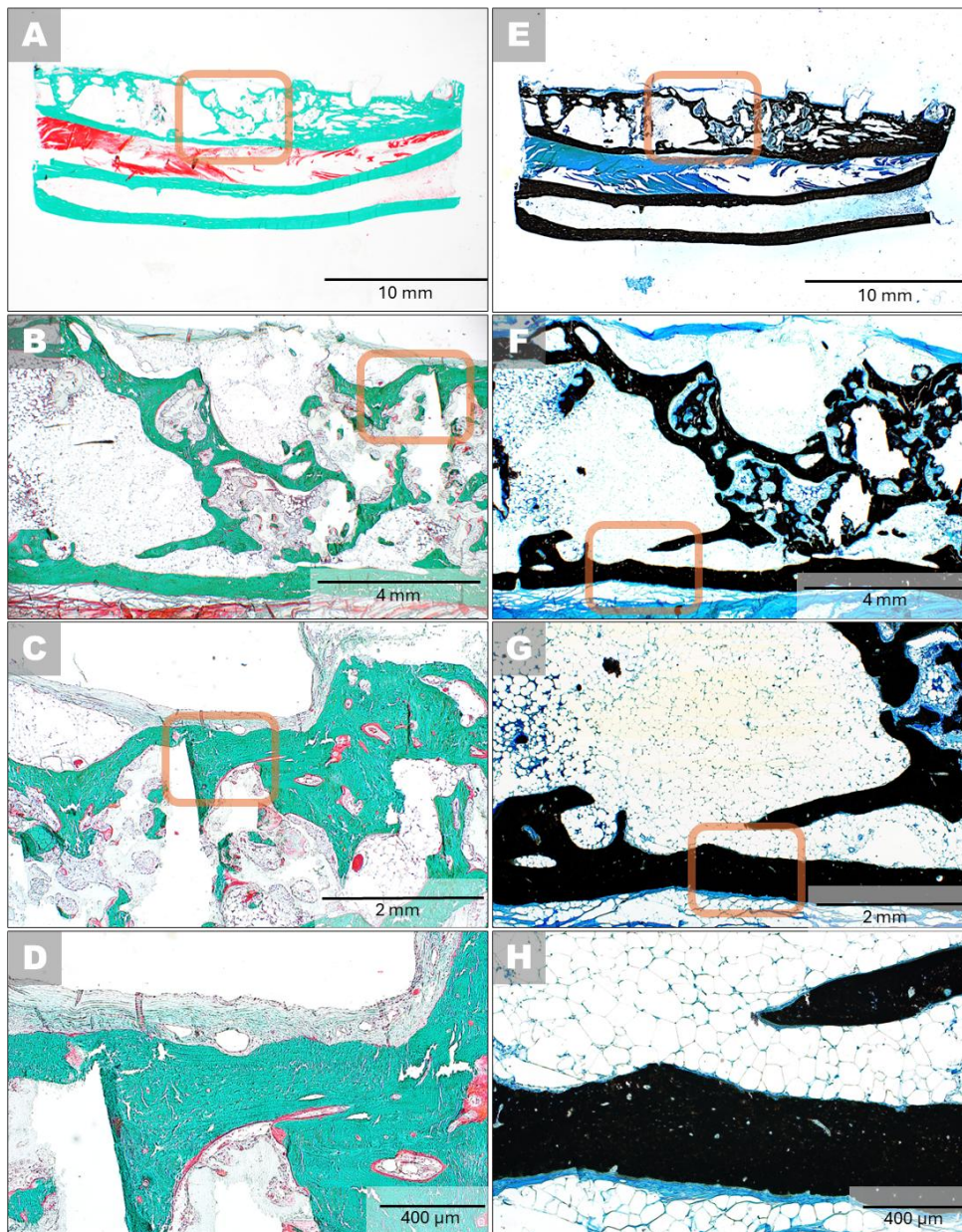
U uzorcima koji su sadržavali rekombinantni humani koštani morfogenetski protein 6 na nosaču autolognog krvnog ugruška uz dodatak trikalcij-fosfata bilo je vidljivo potpuno cijeljenje korteksa u području segmentalnog defekta u proksimalnoj trećini dijafize lakatne kosti, uz izraženo stvaranje kosti između lakatne i palčane kosti (Slika 20). U meduli je bio vidljiv veći broj keramičkih čestica (TCP). Oko i unutar keramičkih čestica vizualizirali su se otočići koštanog tkiva. Korteks je bio kontinuiran, a unutar medule bila je vidljiva umjereni trabekularizacija kosti (Slika 20).



Slika 20. Histološki preparati segmentalnog defekta lakatne kosti kunića tretiranog pomoću rhBMP6/ABC/TCP obojeni su metodama po Goldneru (A, B) i po Von Kossi (C, D). Na preparatima obojenima po Goldneru (A, B) prikazano je područje defekta s novonastalim koštanim tkivom i integracijom implantata, dok preparati obojeni po Von Kossi (C, D) naglašavaju mineralizirane strukture unutar istog područja defekta.

5.4.2. Pokusna skupina B (rhBMP6/ABC/BCP)

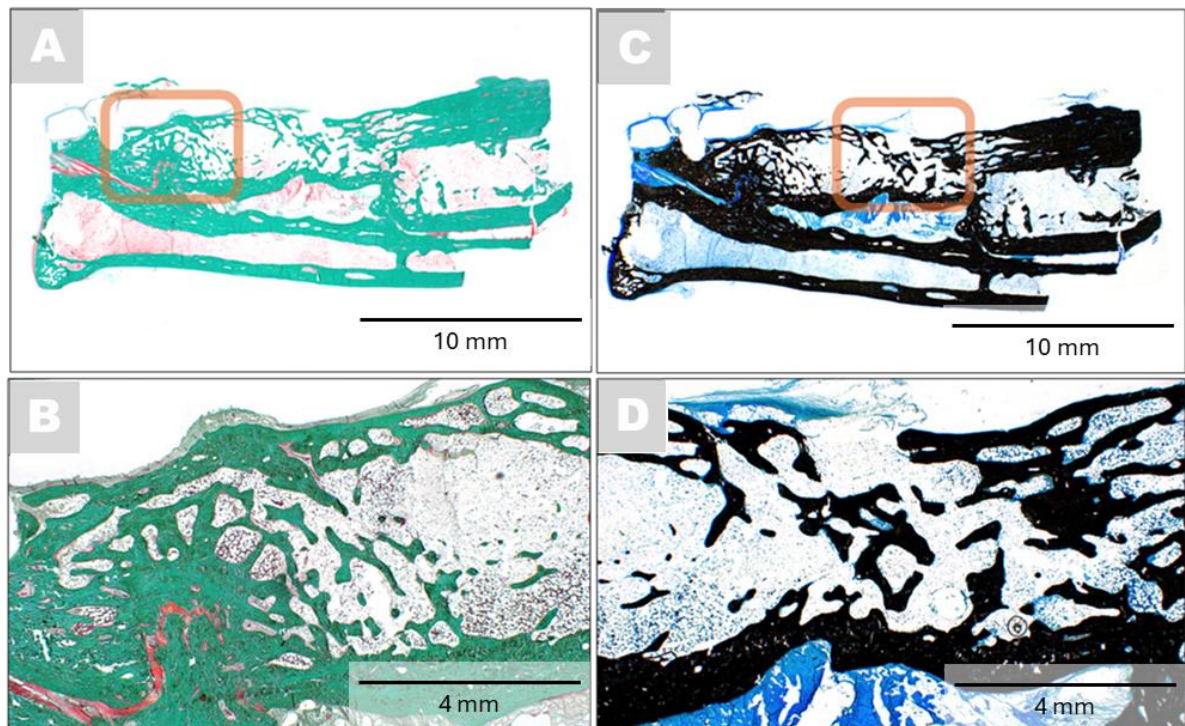
U uzorcima koji su sadržavali rekombinantni humani koštani morfogenetski protein 6 na nosaču autolognog krvnog ugruška uz dodatak bifazične keramike bilo je vidljivo potpuno cijeljenje korteksa u području segmentalnog defekta u proksimalnoj trećini dijafize lakatne kosti (Slika 21). Na lateralnom korteksu bio je vidljiv manji defekt koji je bio posljedica uklanjanja kirurške pločice. Korteks je bio kontinuiran i uniforman, a cijeljenje je bilo potpuno. Bio je vidljiv vrlo mali udio rezidualnih keramičkih čestica (BCP). Koštano tkivo bilo je obojano zelenom bojom (Goldner) i crnom bojom (Van Kossa) (Slika 21).



Slika 21. Prikazani su histološki presjeci segmentalnog defekta lakatne kosti kunića tretiranog pomoću rhBMP6/ABC/BCP s prijelazom iz native u novostvorenu kost. Preparati A - D obojeni su po Goldneru, a E - H po Von Kossi.

5.4.3. Pokusna skupina C (ABC/rhBMP6)

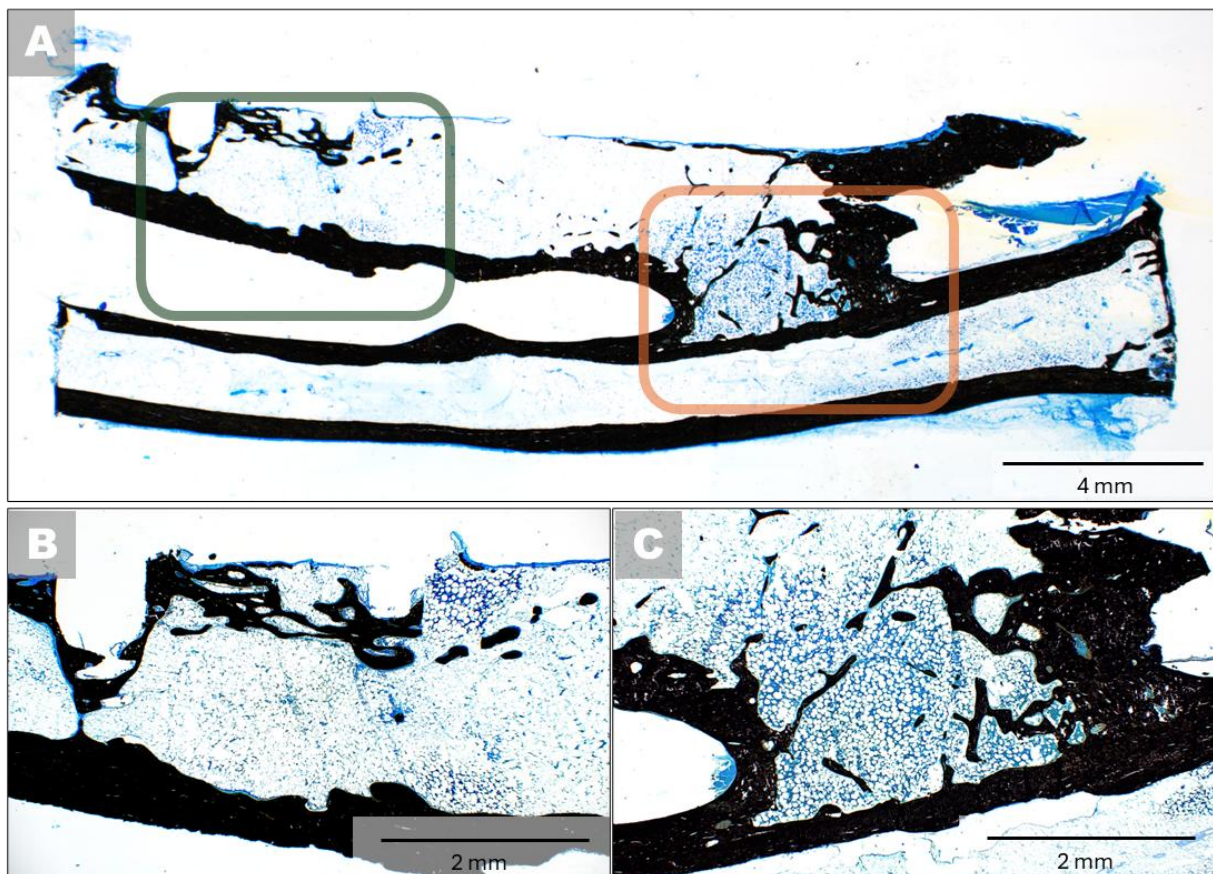
Histološki rezovi obojeni po Goldneru prikazivali su u području segmentalnog defekta izraženo stvaranje koštanog tkiva koje je kontinuirano premošćivalo defekt (Slika 22). Dominirala je obilna trabekularna mreža nezrele kosti (zelena boja), s izraženim osteoidnim zonama i aktivnim koštanim remodeliranjem. Bile su prisutne široke koštane grede s međusobno povezanom spongioznom arhitekturom. Uzorci obojeni po Van Kossi (C-D) pri odgovarajućim povećanjima potvrdili su opsežnu mineralizaciju novonastalog koštanog tkiva. Crno obojena područja mineralizirane kosti formirala su kontinuirani most preko defekta, s dobro razvijenom trabekularnom strukturom i progresivnim prijelazom prema zrelijoj lamelarnoj kosti (Slika 22). Uočavao se smanjeni udio nemineraliziranog tkiva i izražena konsolidacija defekta, što je ukazivalo na učinkovitu osteoinduktivnu aktivnost ABC/rhBMP6 terapije.



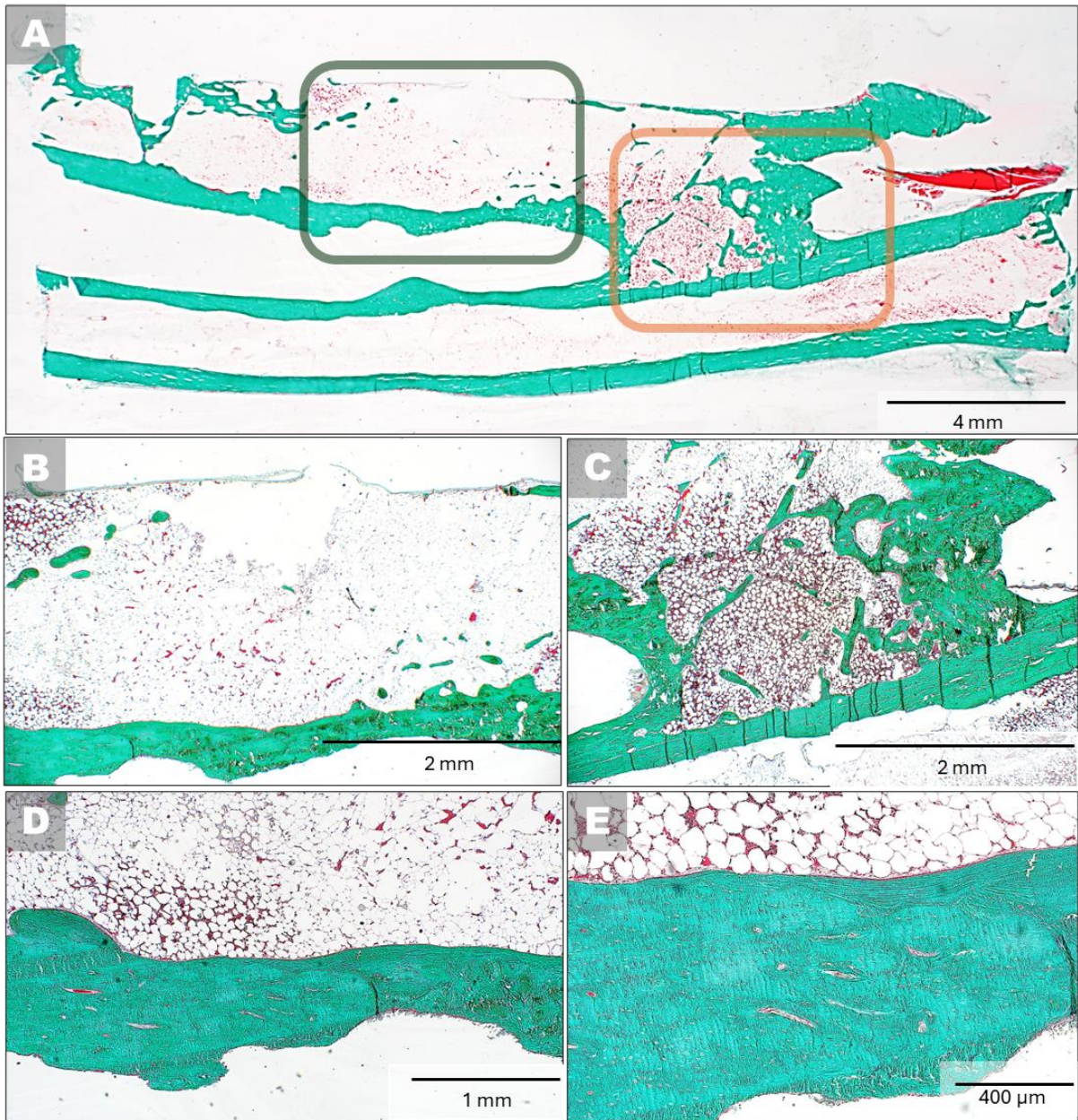
Slika 22. Histološki prikaz područja segmentalnog defekta lakatne kosti kunića tretiranog s rhBMP6/ABC. Histološki preparati su obojeni po Goldneru (A, B) odnosno Von Kossi (C, D).

5.4.4. Pokusna skupina D (rhBMP2/ACS)

U uzorcima koji su sadržavali rekombinantni humani koštani morfogenetski protein 2 na nosaču goveđe kolagenske spužvice bilo je vidljivo potpuno cijeljenje korteksa u području segmentalnog defekta u proksimalnoj trećini dijafize lakatne kosti (Slike 23 i 24). Na histološkim presjecima bio je vidljiv jednostrani korteks. Lateralni korteks nije bio prisutan zbog odlomljenja tijekom uklanjanja pločice. Na slikama je vidljiv primjer heterotopične osifikacije između lakatne i palčane kosti. Na svim uzorcima bili su vidljivi defekti od kortikalnih vijaka proksimalno i distalno od segmentalnog defekta, koji su bili okruženi novostvorenim koštanim tkivom. Kontinuitet korteksa bio je potpun, mjestimično nešto tanji u odnosu na nativnu kost.



Slika 23. Histološki prikaz područja segmentalnog defekta lakatne kosti kunića tretiranog s rhBMP2/ACS. Na slici A prikazan je pregledni prikaz preparata, dok slike B i C predstavljaju veća povećanja označenih regija; na B su vidljivi defekti kortikalnih vijaka, a na C koštano premoštenje lakatne i palčane kosti kao znak heterotopične osifikacije.

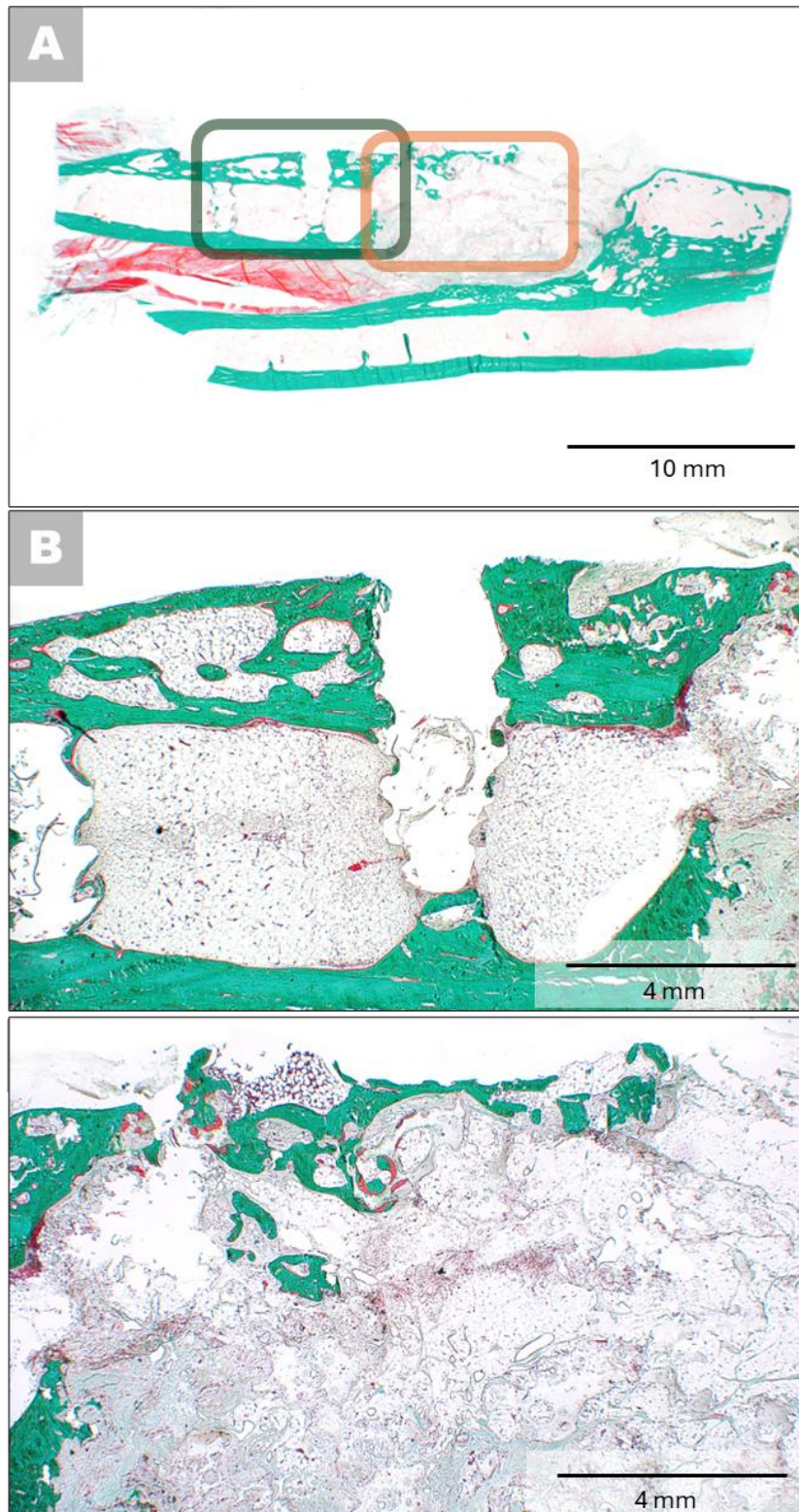


Slika 24. Histološki preparati uzorka rhBMP2/ACS bojani po Goldneru prikazuju segmentalni defekt s jednostrano formiranim novostvorenim korteksom (B) te područje koštanog premoštenja između lakatne i palčane kosti s heterotopičnom osifikacijom (C). U većim povećanjima jasno je vidljiv dobro organiziran novostvoreni korteks (D, E).

5.4.5. Kontrolna skupina E (TCP/ABC)

Histološki preparati lakatne kosti uzorka tretiranog s TCP/ABC obojani po Goldneru prikazali su segmentalni defekt bez značajnih znakova cijeljenja (Slika 25). U području defekta prevladavalo je nemineralizirano fibrovaskularno tkivo, uz izostanak stvaranja novog koštanog tkiva i bez vidljivog premoščivanja defekta novonastalom kosti. Mineralizirana kost bila je očuvana prvenstveno na rubovima defekta, gdje su bili prisutni tek ograničeni i lokalizirani znakovi osteoiduktivnog odgovora.

Na većim povećanjima uočena je neorganizirana struktura tkiva sa sporadičnim područjima osteoidne formacije, ali bez razvoja zrele trabekularne arhitekture. Središnji dio defekta ostao je ispunjen vezivnim tkivom s oskudnom mineralizacijom, što je ukazivalo na izostanak učinkovite osteointegracije i ograničenu osteokonduktivnu aktivnost implantiranog materijala. Nisu uočeni izraženi znakovi upalne reakcije, što je sugeriralo zadovoljavajuću biokompatibilnost materijala, ali istodobno i nedovoljnu osteoidukciju potrebnu za uspješnu regeneraciju kosti.

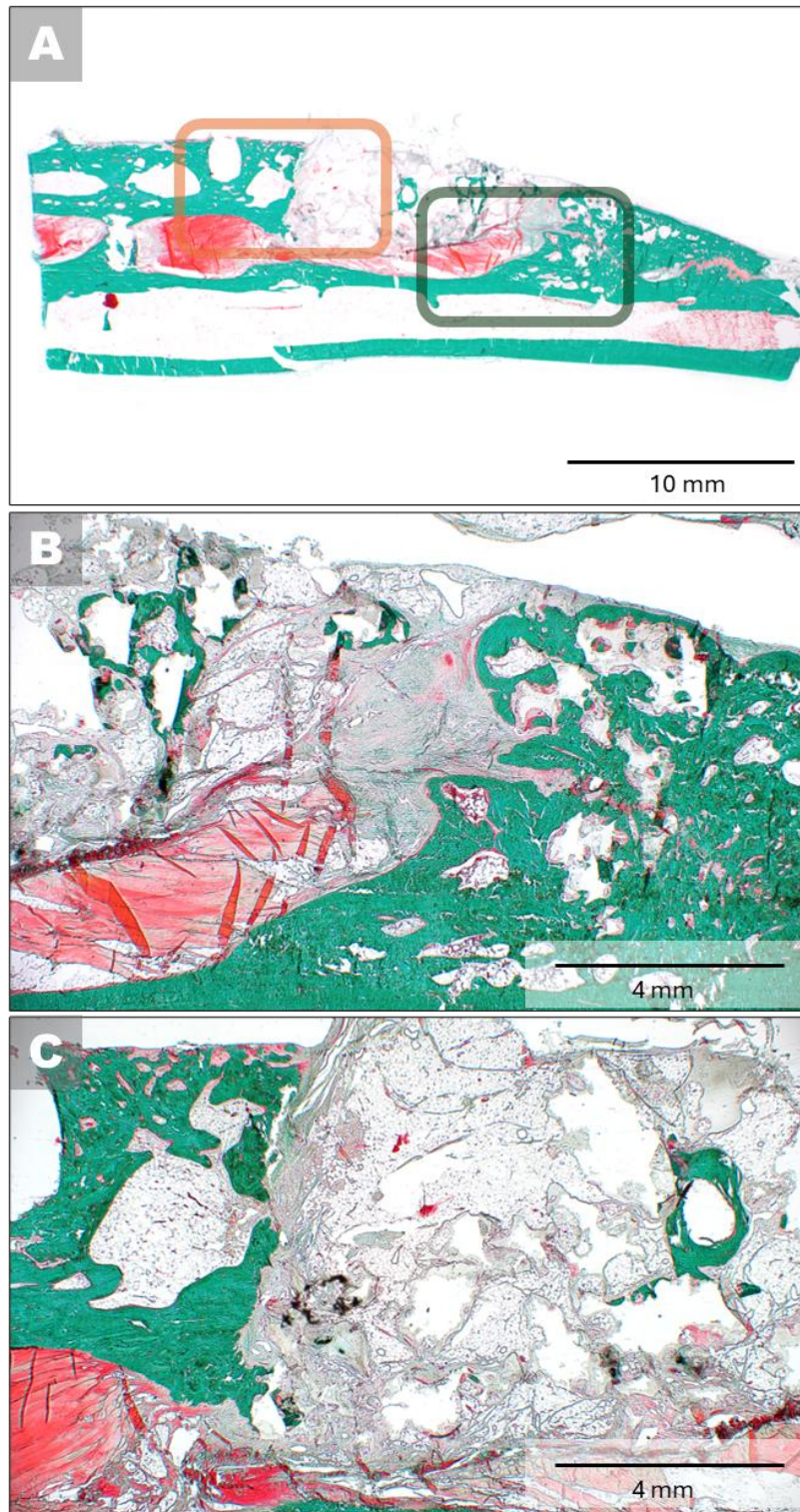


Slika 25. Histološki preparati lakatne kosti uzorka tretiranog s TCP/ABC obojanih po Goldneru prikazuju segmentalni defekt bez značajnih znakova cijeljenja (A). Prikazan je defekt u kortikalnoj kosti posljedično kortikalnom vijku (B). Vidljivi su minimalni znakovi cijeljenja periferno u području kortikalne kosti (C).

5.4.6. Kontrolna skupina F (BCP/ABC)

Histološki preparati uzorka BCP/ABC bojani po Goldneru prikazali su segmentalni defekt bez značajnih znakova cijeljenja (Slika 26). U području defekta dominiralo je vezivno tkivo uz ograničenu prisutnost novostvorene mineralizirane kosti, koja je bila vidljiva periferno uz rubove defekta. Novostvorena kost pojavljivala se sporadično i uglavnom je bila lokalizirana uz rubne dijelove defekta, bez jasnog premošćivanja središnjeg područja.

Između čestica keramike prevladavalo je fibrovaskularno tkivo, bez izražene upalne reakcije ili formiranja fibrozne kapsule, što je upućivalo na zadovoljavajuću biokompatibilnost materijala. Međutim, ograničen izravan kontakt između keramike i novonastale kosti te izostanak značajnije trabekularne organizacije sugerirali su slabiju osteokonduktivnu aktivnost i izostanak koštane regeneracije u promatranom vremenskom razdoblju.



Slika 26. Histološki preparati uzorka tretiranog s BCP/ABC obojan po Goldneru prikazuju segmentalni defekt lakatne kosti bez značajnih znakova cijeljenja (A). U području defekta dominira vezivno tkivo uz ograničenu prisutnost novostvorene mineralizirane kosti, koja je vidljiva periferno uz rubove defekta. Na slikama B i C uočava se prisutnost čestica keramike okruženih vezivnim tkivom.

6. RASPRAVA

Traumatske ozljede muskuloskeletnog sustava predstavljaju jedno od najvećih opterećenja zdravstvenih sustava u svijetu, odmah nakon kardiovaskularnih bolesti, pri čemu se znatan udio troškova odnosi na liječenje prijeloma kostiju (VUKICEVIC i sur., 2014.). Godišnje se bilježe milijuni prijeloma, od kojih značajan postotak pokazuje odgođeno ili poremećeno cijeljenje, uz posljedične kliničke komplikacije. Očekivani porast broja prijeloma, povezan sa starenjem populacije, dodatno naglašava potrebu za unaprjeđenjem terapijskih pristupa. Suvremeni ortopedski zahvati temelje se na razumijevanju molekularnih mehanizama koštane regeneracije, što predstavlja ključnu osnovu za razvoj novih bioloških strategija liječenja u slučajevima neuspješne fiziološke reparacije.

Koštani morfogenetski proteini predstavljaju ključne regulatorne molekule u procesu osteogeneze i regeneracije koštanog tkiva (VUKICEVIC i sur., 2009.). Ovi faktori rasta, koji pripadaju obitelji transformirajućih čimbenika rasta beta (TGF- β) igraju ključnu ulogu u diferencijaciji mezenhimalnih matičnih stanica u osteoblaste te potiču formiranje novog koštanog tkiva. Zbog svojih osteoinduktivnih svojstava, koštani morfogenetski proteini se intenzivno istražuju u različitim pokusnim modelima s ciljem procjene njihove učinkovitosti i sigurnosti u kliničkoj primjeni (KIM i sur., 2025.; YADAV i sur., 2025.; REICHERT i sur., 2009.; YAMAMOTO i sur., 2006.; BAE i sur., 2011.; FUJITA i sur., 2012.; YAMAMOTO i sur., 2015.; GRGUREVIC i sur., 2019.; HUANG i sur., 2021.). S ciljem procjene i međusobne usporedbe različitih formulacija koštanih morfogenetskih proteina, nosača i biomehanički otpornog materijala proveden je pokus u svrhu izrade ove disertacije.

Pokusni modeli omogućuju detaljno proučavanje mehanizama djelovanja BMP-a u različitim indikacijama, uključujući liječenje segmentalnih koštanih defekata, spinalnih fuzija, ortopedske rekonstrukcije i dentalnu implantologiju. Njihova primjena u pokusnim uvjetima doprinosi razumijevanju optimalnih doza, načina dostave i interakcije s biomaterijalima, što je ključno za translaciju u kliničku praksu (MONT i sur., 2004.; SANDHU i KHAN 2002.; STOKOVIC i sur., 2021.; REICHERT i sur., 2009.). U ovoj disertaciji korišten je model segmentalnog defekta lakatne kosti kunića u cilju intermedijarne evaluacije osteoinduktivnog materijala za regeneraciju koštanog tkiva. Segmentalni defekt u kunića može se izvoditi na lakatnoj, palčanoj i bedrenoj kosti. Prednosti lakatne i palčane kosti u odnosu na bedrenu je što model ne zahtjeva vanjski fiksator (STOKOVIC i sur., 2021.; BODDE i sur., 2008.). Formulacija lijeka Osteogrow-C do sada je istražena u indikaciji posterolateralne spinalne

fuzije gdje su rezultati pokazali uspješno cijeljenje u navedenim indikacijama, kao i sigurnost primjene (IVANJKO i sur., 2023.).

Kroz zadnjih nekoliko desetljeća provedena su brojna istraživanja u procjeni cijeljena segmentalnog defekta nakon implantacije raznih formulacija koštanih morfogenetskih proteina. Defekti lakatne kosti veličinom variraju od 15 mm (BAE i sur., 2011.; GRGUREVIĆ i sur., 2019.; STOKOVIC i sur., 2025.) do 2 cm (YAMAMOTO i sur., 2006.; FUJITA i sur., 2012.; YAMAMOTO i sur., 2015.; HUANG i sur., 2021. VUKICEVIC i sur., 2019.). Kritičnim segmentalnim defektom smatraju se svi defekti kod kojih fiziološkim procesima ne bi došlo do cijeljenja (DAHLT i sur., 2021.). Za segmentalni defekt palčane kosti također je prihvaćena duljina od 15 mm (LUCA i sur., 2011.; HOU i sur., 2012.; KIM i sur., 2014.). Lakatna i palčana kost kunića anatomski su specifične jer su djelomično spojene membranoznim tkivom i dijele funkcionalno opterećenje prednje noge. Segmentalni defekti se najčešće induciraju na dijafizalnim dijelovima ovih kostiju, pri čemu defekt lakatne kosti može biti stabiliziran neovisno, dok defekt palčane kosti ponekad zahtjeva dodatnu fiksaciju kako bi se očuvala stabilnost ekstremiteta. Ključna razlika između ovih modela leži u biomehaničkoj ulozi; lakatna kost služi kao potporna kost koja može cijeliti i bez potpune rekonstrukcije, dok defekt na palčanoj kosti značajnije utječe na funkciju prednje noge i zahtijeva bržu i potpuniju regeneraciju (BODDE i sur., 2008.). S druge strane, značajne razlike se ogledaju u njihovoj funkcionalnoj opterećenosti i obliku: lakatna kost, koja je više izložena kompresijskim silama, može zahtijevati drugačiji pristup stabilizaciji defekta u odnosu na palčanu kost koja je osjetljivija na rotacijske sile. Te razlike u biomehanici te u lokalnoj anatomiji definiraju specifične izazove pri modeliranju i evaluaciji terapijskih intervencija (MILLS i SIMPSON, 2012.). U našem pokusu na segmentalnom defektu lakatne kosti kunića primijenjen je defekt duljine 15 mm u proksimalnoj trećini dijafize. S obzirom da je model segmentalnog defekta duljine 15 mm višestruko potvrđen nije bilo potrebe za dokazivanjem neuspješnog cijeljenja bez intervencije (LEI i sur., 2025.).

U područje defekta ugrađena je kirurška pločica učvršćena kortikalnim vijcima. Iako segmentalni model lakatne kosti ne zahtjeva kiruršku stabilizaciju, pločica je implantirana u svrhu replikacije kliničkih modela te eventualne interakcije koštanih morfogenetskih proteina, nosača ili sintetske keramike s kirurškim metalom (ZHU i sur., 2022.). Titanijeve legure su najčešće korišteni metalni materijali za ortopedske implantate zbog svoje visoke čvrstoće, otpornosti na koroziju i biološke inertnosti. Međutim, upravo ta inertnost smanjuje njihovu biološku aktivnost, što otežava integraciju s koštanim tkivom. Kao rezultat, može doći do

formiranja praznine između implantata i kosti, što povećava rizik od neuspjeha koštane regeneracije (SUL i sur., 2002.; GEETHA i sur., 2009.; LI i sur., 2021.). U provedenom pokusu nije zamijećena signifikantna interakcija niti jedne formulacije lijeka s implantiranom kirurškom pločicom. Brzina cijeljenja približna je do sada opisanim rezultatima s i bez vanjske kirurške stabilizacije. U dostupnoj literaturi se opisuje i potencijalni sinergistički učinak titanijskih legura i endogenih koštanih morfogenetskih proteina (BIAO i sur., 2017.).

Tijekom pokusa, osnovna metoda praćenja cijeljenja segmentalnog defekta lakatne kosti kunića s implantacijom različitih formulacija osteoinduktivnih lijekova bila je rendgenska dijagnostika u standardnim projekcijama. Rendgenska dijagnostika ima brojne prednosti u praćenju cijeljenja kosti, ali i određene nedostatke. Prednosti uključuju široku dostupnost, relativno nisku cijenu i mogućnost procjene položaja koštanih ulomaka, formiranja kalusa te potencijalnih komplikacija poput heterotopičnih osifikacija i malpozicije (JAVOR i sur., 2025.). Također, rendgen omogućuje serijsko praćenje napretka cijeljenja bez invazivnih postupaka. Međutim, njegova glavna mana je ograničena sposobnost prikaza ranih faza cijeljenja, posebno mekih tkiva i početnog stvaranja osteoida, zbog čega može biti potrebno primijeniti dodatne slikovne metode, poput CT-a ili MR-a. Također, kvaliteta snimke ovisi o kutu i tehnici izvođenja, a višestruko izlaganje zračenju može biti štetno, osobito kod ugroženih skupina (CHOPLIN i sur., 2019., MOZA i sur., 2024.).

U ovom istraživanju preliminarna procjena cijeljenja kosti inicijalno je provedena primjenom REBORNE skale, pri čemu je utvrđeno da je njezina pouzdanost bila ograničena u slučajevima prisutnosti kirurške pločice. Kao što je prethodno navedeno, REBORNE skala primarno se temelji na procjeni kortikalnog premošćenja i remodelacije, zbog čega je izrazito ovisna o jasnoj vizualizaciji pojedinih korteksa na radiografskim snimkama. Prisutnost keramike i kirurške pločice uzrokovala je djelomičnu opstrukciju kontura kortikalne kosti, čime je otežana objektivna evaluacija te smanjena reproducibilnost procjene (GOMEZ-BARRENA i sur., 2020.).

Zbog navedenih ograničenja u daljnjoj analizi odabrana je Cook-ova skala, koja nije usmjerena isključivo na procjenu korteksa, već omogućuje evaluaciju cjelokupne kosti i procesa regeneracije unutar defekta. Takav pristup manje ovisi o potpunoj vizualizaciji pojedinih kortikalnih rubova te je stoga prikladniji za postoperativnu procjenu cijeljenja u prisutnosti keramičkih čestica i metalnih kirurških pločica (COOK i sur., 1994.).

U provedenom istraživanju rendgensko snimanje provodilo se 0. dan, tj. po samom završetku operativnog zahvata u svrhu provjere pozicije kirurške pločice i implantata. Pozicija svih implantata u pokusu je bila zadovoljavajuća. Sljedeća točka u kojoj je provedeno snimanje bila je 4. tjedan *in vivo*. U ovoj fazi zamjetne su incipijentne promjene u vidu cijeljenja kosti. Iako je poznato da rendgensko snimanje u ranim fazama ne daje najpreciznije rezultate, u ovoj fazi pokusa već je zamjetno raslojavanje skupina u procjeni cijeljena po Cookovoj skali (SCHWARZENBERG i sur., 2020.). Tako su uzorci s dodatkom trikacijfosfata (rhBMP6/ABC/TCP) s već u ranoj fazi pokusa pokazuju superiorne znakove cijeljenja (prosječna ocjena 3,4) u odnosu na uzorke bez sintetske keramike (rhBMP6/ABC - prosječna ocjena 2). Postoje brojna istraživanja koja dokazuju, no i opovrgavaju osteoinduktivna svojstva TCP-a (KNABE i sur., 2019.; OKADA i sur., 2016.; DAMLAR i sur., 2015.; CHENG i sur., 2025.; GARCIA i sur., 2025.). S obzirom da se u ovome pokusu TCP pokazao kao superiorna keramika u odnosu na BCP u ranoj fazi pokusa, rezultati sugeriraju prisutnost određene osteoinduktivne aktivnosti od strane samih čestica sintetske keramike ili superiornu osteokonduktivnost. Trikalcij-fosfat primarno pokazuje osteokonduktivna svojstva, djelujući kao trodimenzionalni nosač za urastanje novostvorene kosti. Iako se tradicionalno ne smatra osteoinduktivnim materijalom, određene visoko porozne TCP keramike mogu pokazivati ograničenu materijalom posredovanu osteoinduktivnost, vjerojatno putem adsorpcije endogenih faktora rasta. Ipak, u vremenskom periodu provođenja ovog istraživanja TCP samostalno (kontrolna skupina ABC/TCP) nije uspio postići potpuno cijeljenje segmentalnog defekta od 15 mm što sugerira da za indikaciju segmentalnog defekta duge cjevaste kosti potencijalna osteoinduktivna svojstva ove sintetske keramike nisu dostatna da bi uzrokovala cijeljenje. Cijeljenje uzoraka rhBMP6/ABC/TCP i rhBMP6/ABC/BCP brže je i uspješnije zbog rezistencije na kompresivne sile te posljedično tomu dolazi do bolje distribucije osteoinduktivnog lijeka u segmentalnom defektu te ranijim rendgenološkim znakovima cijeljenja kosti (STOKOVIC i sur., 2020.). U indikacijama s izraženim kompresivnim silama preporučuje se dodatak materijala rezistentnih na kompresivne sile kako bi se osigurali optimalni uvjeti cijeljenja. Postoje mnogobrojne opisane metode učvršćivanja segmentalnog defekta, poput bioaktivnog stakla, uz prethodno navedene formulacije korištene u pokusu (SHIBAHARA i sur., 2023., CANNIO i sur., 2021.). Budući da 4. tjedan cijeljenja predstavlja početnu fazu formiranja tvrdog (koštanog), a ujedno i rendgenološki vidljivog kalusa, moguće je pretpostaviti da je sami koštani segmentalni defekt značajnije ispunjen hrskavičnim tkivom te je stabilniji nego što sama rendgenska snimka prikazuje (TURUNEN i sur., 2014.). Zbog poštivanja 3R principa u ovoj fazi pokusa nije provedeno žrtvovanje životinja (VERDERIO i

sur., 2023.). Uzorci s dodatkom bifazične keramike (rhBMP6/ABC/BCP) u ovoj fazi pokusa pokazali su nešto nižu prosječnu vrijednost u odnosu na uzorke s dodatkom TCP-a (rhBMP6/ABC/TCP - 3,4 / rhBMP6/ABC/BCP - 2,3). S obzirom da dodatak sintetske keramike značajno otežava interpretaciju u ranoj fazi cijeljena nije moguće sa sigurnošću potvrditi objektivnost ove komparacije sintetske keramike u ranoj fazi gdje je primarna vizualizacija novostvorene kosti u meduli, a ne korteksu. Za idealne uvjete interpretacije potreban je razvoj modificirane skale za procjenu liječenja segmentalnog defekta kosti koja će u obzir uzeti i prisutnost radiodenziteta posljedično prisutnosti keramike. Dosadašnja istraživanja pokazuju približno sličnu uspješnost obiju formulacija uz blagu superiornost TCP-a (OGOSE i sur., 2005.). Bez obzira na konfliktne literaturne podatke o uspješnosti RTG-a u ranoj fazi procjene cijeljenja, u svrhu logitudinalnog praćenja u ovom pokusu, RTG se pokazao kao zadovoljavajući modalitet slikovne dijagnostike za procjenu cijeljenja. U interpretaciji uzoraka s dodatkom sintetske keramike u ranoj fazi pokusa otežana je objektivna procjena cijeljenja po Cookovoj skali jer su čestice sintetske keramike sličnog intenziteta sjene intenzitetu sjene kosti.

Sljedeća vremenska točka rendgenološke procjene cijeljenja lakatne kosti je bila u 8. tjednu. U ovoj fazi očekuje se napredna faza formiranja tvrdog (koštanog) kalusa i početak remodeliranja (LITTLE i SCHINDELER, 2007.). Koštana makrostruktura postaje vidljivija zbog progresivne mineralizacije. U ovoj fazi po Cookovoj skali uzorci s dodatkom trikalcij-fosfatne sintetske keramike (rhBMP6/ABC/TCP) i dalje dominiraju s najuspješnijim rezultatom cijeljenja s prosječnim rezultatom 4,6. Za razliku od TCP-a, uzorci s dodatkom bifazične keramike (rhBMP6/ABC/BCP) ostvaruju prosječni rezultat od 3,5. Iako nešto niži u odnosu na TCP, oba uzorka su pokazala povećanje prosječne ocjene u istom omjeru. U ovoj fazi je zamjetna signifikatna resorpcija čestica trikalcij-fosfata (TCP) dok čestice bifazične (TCP/HA) sintetske keramike perzistiraju. Ovi rezultati podudaraju se sa rezultatima u dostupnoj literaturi (DACULSI i LEGEROS, 2006., BOULER i sur., 2017.). Čestice hidroksiapatita ostaju neresorbirane kod nekih pacijenata čak i 20 godina nakon implantacije, dok čestice trikalcij-fosfata već nakon nekoliko tjedana pokazuju znakove resorpcije (TANAKA i sur., 2017.). Iz navedenog se da zaključiti da obje formulacije keramike daju dostatnu čvrstoću i biomehaničku otpornost kosti u ranim fazama cijeljenja te na taj način pospješuju osteointegraciju i djelovanje BMP6. Uzorci rhBMP2/ACS u ovoj fazi pokusa imaju prosječne rezultate od 3,5. Ovi uzorci su u početnoj fazi pokusa pokazali relativno visok rezultat po Cookovoj skali (3,25) Početni visoki rezultat može se pripisati visokoj razini otpuštanja BMP-2 u primijenjenoj formulaciji. Iako intenzivnija rana osteogeneza može djelovati povoljno u smislu bržeg formiranja nove

kosti, takav ubrzani proces osifikacije može imati i negativnu konotaciju. Naime, naglašena rana aktivacija osteogeneze povezana je s povećanim rizikom razvoja hiperostoza, što može nepovoljno utjecati na konačni morfološki i funkcionalni ishod cijeljenja u kliničkoj primjeni (VON BENECKE i sur., 2024.). Iako rendgenska slika pokazuje značajan napredak u ovoj fazi, kost još uvijek može imati smanjenu mehaničku čvrstoću, pa je važno izbjegavati prerano opterećenje kako bi se spriječio rizik od refrakture (DUDA i sur., 2023.).

Sljedeća vremenska točka u kojoj se provodila RTG dijagnostika je 17. tjedan. Kunići su inicijalno snimljeni *in vivo* u svrhu procjene dostatnosti trajanja pokusa. Nakon što je inicijalnim snimanjem utvrđen dostatan stupanj cijeljenja životinje su žrtvovane koristeći standardne protokole. Nakon žrtvovanja desne lakatne kosti kunića snimljene su u standardnim projekcijama. Procjenom prema Cookovoj skali u kasnoj koštanoj fazi cijeljenja najviši rezultat i dalje su pokazivali uzorci s dodatkom TCP-a (rhBMP6/ABC/TCP - 4,6). S obzirom da je većina uzoraka već u drugoj fazi pokusa imala gotovo potpuno formirane kortekse te signifikantnu prisutnost koštanog tkiva između čestica sintetske keramike, cijeljenje u ovoj vremenskom intervalu pokusa je bilo u završnoj fazi (WULSTEN i sur., 2011.).

U svim vremenskim točkama prilikom evaluacije po Cookovoj skali kontrolne skupine nisu pokazale signifikantno cijeljenje segmentalnog defekta lakatne kosti u kunića. Komparativna usporedba između kontrolnih skupina pokazala je u svim fazama pokusa bolje rezultate ABC/TCP implantata u odnosu na ABC/BCP implantate.

Rendgenološka usporedba pokusnih skupina u ovom istraživanju jasno pokazuje da kombinacija rekombinantnog koštanog morfogenetskog proteina 6 (rhBMP6) s autolognim krvnim ugruškom i keramikom (TCP ili BCP) daje najpovoljnije uvjete za kvalitetno i anatomski uredno cijeljenje segmentalnog defekta lakatne kosti kunića. U skupinama A i B (rhBMP6/ABC/BCP i rhBMP6/ABC/TCP) zabilježeno je potpuno koštano premoštenje uz kontinuirane i pravilno oblikovane kortekse, a preostale čestice keramike očekivano su se zadržale u području implantacije zbog sporijeg resorpcijskog profila (DACULSI i LEGEROS, 2006., BOULER i sur., 2017.). Ovakva morfološka slika sugerira da porozna keramika djeluje kao učinkovit osteokonduktivni nosač koji stabilizira ugrušak i osigurava ujednačenu distribuciju i zadržavanje rhBMP6 unutar defekta. Ovi rezultati potvrđuju da je mehanička stabilnost i volumno održanje implantacijskog materijala kritično za pravilnu osteoindukciju BMP6 u indikaciji segmentalnog defekta laktne kosti kunića. Boulder i suradnici u svom istraživanju 2017. godine potvrđuju da idealan materijal rezistentan na kompresivne sile mora objedinjavati ključna biološka svojstva kako bi se mogao usporediti s autolognim graftom,

uključujući biokompatibilnost, osteokonduktivnost i bioaktivnost. Osim toga, mora omogućiti sanaciju velikih defekata, osigurati mehaničku stabilnost te biti postupno resorptivan kako bi se omogućila osteogeneza tijekom remodeliranja kosti te da se u tom kontekstu BCP keramike široko se koriste u različitim kliničkim indikacijama. Skupina tretirana BMP2 na kolagenoj spužvici (skupina D) pokazala je snažan osteoinduktivni odgovor, ali uz izraženu heterotopičnu osifikaciju, uključujući formiranje kosti izvan anatomskih granica i mjestimično gotovo spajanje lakatne i palčane kosti. Ovakav nalaz u skladu je s poznatom tendencijom BMP2 da inducira intenzivnu, ali često nekontroliranu osteogenezu, osobito u kombinaciji s mekim nosačima poput kolagenih spužvica koje ne ograničavaju širenje osteoinduktivnog signala (SCHULTZ, 2008., COTTRILL i sur., 2023.). Kontrolne skupine bez BMP-a (E i F) nisu pokazale adekvatno cijeljenje unutar promatranog razdoblja, što potvrđuje da keramika sama po sebi nema dovoljan osteoinduktivni potencijal te da su BMP proteini ključna komponenta efektivne regeneracije segmentalnih defekata.

U ovom istraživanju CT se pokazao iznimno korisnim alatom za procjenu kvalitete koštane regeneracije, osobito nakon uklanjanja metalnih pločica i vijaka, koji su uzrokovali izražene radijalne artefakte i značajno ograničili mogućnost procjene defekta (GJESTEBY i sur., 2016.; ROUSSELLE i sur., 2020.). Nakon eksplantacije, CT je omogućio visoku razinu morfološke preciznosti u procjeni kontinuiteta korteksa, stupnja premoštenja, prisutnosti heterotopične osifikacije te neresorboranih keramičkih čestica. U usporedbi s rendgenskim snimanjem, CT je nudio superiornu prostornu rezoluciju i eliminirao problem preklapanja struktura, osobito važan u anatomiji lakatne kosti kunića gdje se lakatna i palčana kost preklapaju u dvodimenzionalnom prikazu (JAVOR i sur., 2025.). Dok je RTG prikladan za osnovnu orijentacijsku evaluaciju mineralizacije i položaja implantata, njegova dijagnostička vrijednost u segmentalnim defektima ovakvog tipa je ograničena. Mikro-CT, iako zlatni standard u analizi trabekularne i kortikalne mikroarhitekture, primarno je pogodan za *ex vivo* analizu zbog tehničkih ograničenja, uključujući nemogućnost snimanja uz prisustvo metala i ograničenja u veličini skenera (CLARK i sur., 2021.).

Mikro-CT analizom određeni su volumen keramičkih čestica, koštani volumen i mikroarhitekturni parametri novonastale kosti. U pokusnim skupinama skupina rhBMP6/ABC/BCP imala je statistički značajno veći CRM volumen u usporedbi sa skupinom rhBMP6/ABC/TCP ($p < 0,01$), dok u kontrolnim skupinama nije bilo statistički značajnih razlika. Koštani volumen bio je statistički značajno veći u skupini rhBMP6/ABC/TCP u usporedbi sa skupinom rhBMP2/ACS ($p < 0,01$) te sa skupinom rhBMP6/ABC ($p < 0,05$).

Između kontrolnih skupina nisu utvrđene značajne razlike. Analiza debljine trabekula pokazala je statistički značajno veće vrijednosti u skupini rhBMP6/ABC/TCP u odnosu na rhBMP2/ACS ($p < 0,05$) i rhBMP6/ABC/BCP ($p < 0,01$). Za broj i separaciju trabekula nisu utvrđene statistički značajne razlike među pokusnim skupinama. U segmentalnom defektu lakatne kosti to upućuje na učinkovitiju osteoindukciju i bržu zamjenu biomaterijala novonastalom kosti. S druge strane, veći volumen preostalog keramičkog materijala u skupini rhBMP6/ABC/BCP ukazuje na sporiju resorpciju i dulje zadržavanje nosača. U kliničkom smislu, to može biti prednost u situacijama kada je potrebna produljena mehanička potpora defektu, ali istodobno može usporiti potpunu zamjenu biomaterijala vitalnom kosti. U segmentalnom defektu lakatne kosti, gdje je cilj postići što bržu i kvalitetniju rekonstrukciju koštanog segmenta, dinamičnija resorpcija TCP-a u kombinaciji s rhBMP6 pokazala se povoljnijom. Izostanak značajnih razlika u broju i separaciji trabekula, uz razlike u njihovoj debljini, sugerira da primarna razlika među skupinama nije bila u količini formiranih trabekularnih struktura, već u njihovoj maturaciji i reorganizaciji (NEETESON i sur., 2020.).

Histološka analiza, kao zlatni standard za procjenu kvalitete novostvorenog koštanog tkiva, pružila je najdetaljniji uvid u faze cijeljenja i organizaciju regeneriranog koštanog tkiva. Unatoč svojoj mogućnosti razlikovanja svih komponenti koštanog tkiva (osteoid, zrela kost, koštana srž, vaskularizacija), glavni nedostatak je da se histologija može provoditi isključivo *ex vivo*, što onemogućuje longitudinalno praćenje istog uzorka tijekom vremena te zahtijeva eutanaziju životinja (FINZE i sur., 2023.).

Uzorci koji su sadržavali rekombinantne koštane morfo-genetske proteine, uključujući rhBMP6/ABC/TCP (A), rhBMP6/ABC/BCP (B), rhBMP6/ABC (C) i rhBMP2/ACS (D), pokazali su značajan stupanj regeneracije kosti. U svim skupinama s aktivnim BMP-ovima defekt je bio potpuno premošten, uz jasno formirane kortekse i rekonstrukciju medularnog kanala ispunjenog koštanom srži. Posebno je zabilježena prisutnost hematopoetskih stanica i adipocita unutar srži, što ukazuje na visoki stupanj maturacije regeneriranog tkiva (LI i sur., 2018.).

Skupine rhBMP6/ABC/TCP i rhBMP6/ABC/BCP (A i B), odnosno Osteogrow-C formulacije, pokazale su gotovo potpunu restauraciju kontinuiteta kosti s nativnim tkivom. U svim uzorcima zabilježene su dobro organizirane trabekule, kao i novoformirana koštana srž, što ukazuje da dodavanje keramičkih čestica u kombinaciji s rhBMP6 i ABC stvara optimalno mikrookruženje za osteogenezu.

Slično tome, rhBMP6/ABC (C) i rhBMP2/ACS (D) potaknuli su formiranje zrele, lamelarne kosti. Međutim, u ovim skupinama nije bilo dodatne keramičke potpore, pa su regenerirane strukture bile nešto homogenije, bez prisutnih keramičkih čestica. Nadalje, u blizini pozicija prethodnog fiksatora vidljiva je lokalno tanja kortikalna kost, što se može pripisati djelomičnom oštećenju kosti prilikom vađenja kirurških pločica.

U kontrolnim skupinama koje su sadržavale samo ugrušak i keramičke čestice ABC/TCP (E) i ABC/BCP (F) nije došlo do potpunog cijeljenja defekta. Histološki su vidljive izolirane formacije koštanog tkiva na površinama i između keramičkih čestica, no ove strukture nisu dosegle razinu organizacije ili kontinuitet korteksa kao u skupinama s BMP-ovima. Ovi rezultati potvrđuju da keramika sama po sebi pruža osteokonduktivnost, ali nedostaje snažan osteinduktivni signal koji omogućuju koštani morfogogenetski proteini (LEGEROS i sur., 2003.).

Dodavanje keramičkih čestica (TCP ili BCP) u kombinaciji s koštanim morfogogenetskim proteinima (skupine A i B) rezultiralo je regeneracijom kosti, uključujući i koštanu srž, te potpunu obnovu kortikalne i trabekularne arhitekture. Keramičke čestice su služile kao privremena mineralna strukturalna potpora, potičući prostorno organiziranu osteogenezu (STOKOVIC i sur., 2021.). Nasuprot tome, uzorci bez keramičkih čestica (skupine C i D) pokazali su uredno cijeljenje, ali s nešto homogenijom koštanom arhitekturom i bez dodatnih mineralnih depozita koji se inače nalaze između keramičkih granula. Navedeni rezultati koreliraju s dostupnom literaturom gdje brojna istraživanja potvrđuju potrebu za dodatkom materijala otpornog na kompresivne sile u indikacijama segmentalnog defekta dugih cjevastih kostiju (MOLINA i sur., 2014.). U histološkim presjecima nisu uočene negativne interakcije niti reakcije s okolnim koštanim tkivom što potvrđuje da TCP i BCP kao keramičke čestice zaslužne za očuvanje cjelovitosti i otpornosti na kompresivne sile posjeduju potrebna svojstva biokompatibilnosti, sposobnosti integracije s okolnim tkivima, kemijske stabilnosti i optimalne površinske topografije (WILLIAMS, 2008.).

Histološka analiza provedena na nedekalcificiranim preparatima obojenima po von Kossa-i i Goldner-u omogućila je vrlo pouzdanu procjenu regeneracije kosti u pokusnim skupinama tretiranim različitim implantatima. Upotreba nedekalcificiranih preparata pokazala se ključnom metodološkom prednosti, budući da je očuvanje mineralne faze omogućilo visoku morfološku rezoluciju, precizne kvantifikacije i izbjegavanje artefakata karakterističnih za dekalificirana tkiva (PARK i sur., 2015.).

7. ZAKLJUČCI

Osteoinduktivni lijek koji sadrži rekombinantni humani koštani morfogenetski protein 6 (rhBMP6) primijenjen u autolognom krvnom ugrušku s keramičkim česticama pokazao je superioran učinak u cijeljenju segmentalnog defekta lakatne kosti u kunića u usporedbi s formulacijama lijeka bez keramičkih čestica, što se očitovalo pojačanim stvaranjem novostvorene kosti, boljom strukturnom organizacijom regenerirane kosti te uspješnijom integracijom s nativnim koštanim tkivom. Dobiveni rezultati potvrdili su osteoinduktivni potencijal testirane formulacije te je time potvrđena hipoteza istraživanja. Provedbom istraživanja ostvareni su postavljeni opći i specifični ciljevi te su doneseni zaključci prikazani u nastavku.

1. Uspješnost osteoinduktivne terapije segmentalnog defekta lakatne kosti kunića ovisi o sastavu implantata, odnosno o istodobnoj prisutnosti osteoinduktivne komponente (rhBMP), autolognog krvnog ugruška kao biološkog nosača te biomehanički otpornog keramičkog materijala.
2. Implantati koji su sadržavali rhBMP6 u autolognom krvnom ugrušku uz dodatak keramičkih čestica kalcijeva fosfata (BCP i TCP) pokazali su superiorne ishode u odnosu na implantate bez biomehaničke potpore te u odnosu na ostale ispitivane terapijske pristupe. Ova kombinacija rezultirala je ranijim početkom osteogeneze, bržim formiranjem koštanog kalusa te progresivnim i ujednačenim premoštenjem defekta.
3. Trikalcijev fosfat pokazao je bržu resorpciju i intenzivniju zamjenu keramičkog materijala novostvorenom kosti, dok je bifazična keramika osigurala dugotrajniju mehaničku potporu i stabilnost defekta.
4. Implantat koji je sadržavao rhBMP2 na kolagenskoj spužvici pokazao je sposobnost induciranja koštanog cijeljenja, ali uz veću varijabilnost ishoda i manju predvidljivost u usporedbi s formulacijama temeljenima na rhBMP6.
5. Rendgensko snimanje pokazalo se prikladnim za longitudinalno *in vivo* praćenje dinamike cijeljenja i procjenu formiranja kalusa te kontinuiteta kortikalne kosti. Kompjuterizirana tomografija omogućila je precizniju trodimenzionalnu evaluaciju premoštenja defekta, raspodjele novostvorenog koštanog tkiva i detekciju heterotopičnih osifikacija. Mikro-CT se potvrdio kao najpreciznija metoda za kvantitativnu i kvalitativnu analizu regenerirane kosti te predstavlja zlatni standard u pretkliničkoj radiološkoj evaluaciji koštane regeneracije.

6. Kombinacija rhBMP6, autolognog krvnog ugruška i biomehanički otpornog keramičkog materijala predstavlja optimalnu i translacijski relevantnu strategiju za regeneraciju segmentalnih defekata dugih kostiju.

8. POPIS LITERATURE

AHN, J. M., S. J. HYUN, K. J. KIM (2022): Safety and efficacy of a new moldable and compression resistant matrix carrier with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the rabbit bone defect model. *Turk Neurosurg* 32, 845-853. DOI: 10.5137/1019-5149.JTN.37422-21.2.

BAE, J. H., H.R. SONG, H.J. KIM, H.C. LIM, J.H. PARK, Y. LIU, S.H. TEOH (2011): Discontinuous release of bone morphogenetic protein-2 loaded within interconnected pores of honeycomb-like polycaprolactone scaffold promotes bone healing in a large bone defect of rabbit ulna. *Tissue Eng. Part A*, 17(19-20), 2389-2397. DOI: 10.1089/ten.tea.2011.0032

BETZ, R. R. (2002): Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions. *Orthopedics* 25, S561-S570. DOI: 10.3928/0147-7447-20020502-04.

BIAO, M. N., Y. M. CHEN, S. B. XIONG, B. Y. WU, B. C. YANG (2017): Synergistic effects of fibronectin and bone morphogenetic protein on the bioactivity of titanium metal. *J. Biomed. Mater. Res. A* 105, 2485-2498. DOI: 10.1002/jbm.a.36106.

BODDE, E. W., P. H. SPAUWEN, A. G. MIKOS, J. A. JANSEN (2008): Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. *J. Biomed. Mater. Res. A* 85, 206–217. DOI: 10.1002/jbm.a.31549.

BOULER, J. M., P. PILET, O. GAUTHIER, E. VERRON (2017): Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response. *Acta Biomater.* 53, 1–12. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.01.076.

BRAGDON, B., O. MOSEYCHUK, S. SALDANHA, D. KING, J. JULIAN, A. NOHE (2011): Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell. Signal.* 23, 609–620. DOI: 10.1016/j.cellsig.2010.11.003.SAMPATH, T. K., A. H. REDDI (2020): Discovery of bone morphogenetic proteins—A historical perspective. *Bone* 140, 115548. DOI: 10.1016/j.bone.2020.115548.

CALORI, G. M., M. COLOMBO, M. BUCCI, E. L. MAZZA, P. FADIGATI, S. MAZZOLA (2015): Clinical effectiveness of Osigraft in long-bones non-unions. *Injury* 46, S55–S64. DOI: 10.1016/S0020-1383(15)30056-5.

CANNIO, M., D. BELLUCCI, J. A. ROETHER, D. N. BOCCACCINI, V. CANNILLO (2021): Bioactive glass applications: a literature review of human clinical trials. *Materials (Basel)* 14, 5440. DOI: 10.3390/ma14185440.

CHEN, D. I., M. ZHAO, G.R. MUNDY (2004): Bone morphogenetic proteins. *Growth factors*, 22(4), 233-241. DOI: 10.1080/08977190412331279890

CHENG, K., Y. PENG, J. DIAO, H. ZHU, Q. LU, N. ZHAO, Y. WANG, H. DING (2025): Personalizing β -TCP porous scaffolds to promote osteogenesis: a study of segmental femoral defects in beagle models. *Biomed. Mater.* 20, 15023. DOI: 10.1088/1748-605X/ad98d8.

CHIARI, C., L. GRGUREVIC, T. BORDUKALO NIKSIC, H. OPPERMAN, A. VALENTINITSCH, E. NEMECEK, K. STAATS, M. SCHREINER, C. TROST, A. KOLB, F. KAINBERGER, S. PEHAR, M. MILOSEVIC, S. MARTINOVIC, M. PERIC, T. KUBER SAMPATH, S. VUKICEVIC, R. WINDHAGER (2020): Recombinant human BMP6 applied within autologous blood coagulum accelerates bone healing: randomized controlled trial in high tibial osteotomy patients. *J. Bone Miner. Res.* 35, 1893–1903. DOI: 10.1002/jbmr.4107.

CHOPLIN, R. H., M. R. ALLEN (2019): Skeletal Imaging. In: *Basic and Applied Bone Biology*. Academic Press. pp. 103–123.

CLARK, D. P., C. T. BADEA (2021): Advances in micro-CT imaging of small animals. *Phys. Med.* 88, 175–192. DOI: 10.1016/j.ejmp.2021.07.005.

COOK, S. D., G. C. BAFFES, M. W. WOLFE, T. K. SAMPATH, D. C. RUEGER (1994): Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 301, 302–312. (PMID: 8156691).

COOPER, G.M., M.P. MOONEY, A.K. GOSAIN, P.G. CAMPBELL, J.E. LOSEE, J. HUARD (2010): Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plastic and reconstructive surgery*, 125(6), 1685–1692.

COTTRILL, E., Z. PENNINGTON, M. T. WOLF, N. DIRCKX, J. EHRESMAN, A. PERDOMO-PANTOJA, C. RAJKOVIC, J. LIN, D. R. MAESTAS JR., A. MAGEAU, D. LAMBRECHTS, V. STEWART, D. M. SCIUBBA, N. THEODORE, J. H. ELISSEEFF, T. WITHAM (2023): Creation and preclinical evaluation of a novel mussel-inspired, biomimetic,

bioactive bone graft scaffold: direct comparison with Infuse bone graft using a rat model of spinal fusion. *Journal of Neurosurgery: Spine*, 39(1), 113-121.

DACULSI, G., R. LEGEROS (2006): Biphasic calcium phosphate (BCP) bioceramics: Chemical, physical and biological properties. In: *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. pp. 1–11.

DAHLT, M. T., S. MORRISON (2021): Segmental bone defects and the history of bone transport. *J. Orthop. Trauma* 35(Suppl. 4), S1–S7. DOI: 10.1097/BOT.0000000000002124.

DAMLAR, I., Ö. ERDOGAN, U. TATLI, O. F. ARPAG, U. GORMEZ, Y. USTUN (2015): Comparison of osteoconductive properties of three different β -tricalcium phosphate graft materials: a pilot histomorphometric study in a pig model. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* 43, 175–180. DOI: 10.1016/j.jcms.2014.11.006.

DELAWI, D., W. JACOBS, J. L. VAN SUSANTE, L. RILLARDON, D. PRESTAMBURGO, N. SPECCHIA, E. GAY, N. VERSCHOOR, C. GARCIA-FERNANDEZ, E. GUERADO, H. QUARLES VAN UFFORD, M. C. KRUYT, W. J. A. DHERT, F. C. ONER (2016): OP-1 compared with iliac crest autograft in instrumented posterolateral fusion: a randomized, multicenter non-inferiority trial. *J. Bone Joint Surg. Am.* 98, 441–448. DOI: 10.2106/JBJS.O.00209.

DOREA, H. C., R. M. McLAUGHLIN, H. D. CANTWELL, et al. (2005): Evaluation of healing in feline femoral defects filled with cancellous autograft, cancellous allograft or Bioglass. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.*, 18, 157–

DUDA, G. N., S. GEISSLER, S. CHECA, S. TSITSILONIS, A. PETERSEN, K. SCHMIDT-BLEEK (2023): The decisive early phase of bone regeneration. *Nat. Rev. Rheumatol.* 19, 78–95. DOI: 10.1038/s41584-022-00887-0.

DUMIC-CULE, I., M. PECINA, M. JELIC, M. JANKOLIJA, I. POPEK, L. GRGUREVIC, S. VUKICEVIC (2015): Biological aspects of segmental bone defects management. *Int. Orthop.* 39, 1005-1111. DOI: 10.1007/s00264-015-2728-4.

DURDEVIC, D., T. VLAHOVIC, S. PEHAR, D. MIKLIC, H. OPPERMAN, T. BORDUKALO-NIKSIC, I. GAVRANKAPETANOVIC, M. JAMAKOSMANOVIC, M.

MILOSEVIC, S. MARTINOVIC, T. KUBER SAMPATH, M. PERIC, L. GRGUREVIC, S. VUKICEVIC (2020): A novel autologous bone graft substitute comprised of rhBMP6 blood coagulum as carrier tested in a randomized and controlled Phase I trial in patients with distal radial fractures. *Bone* 140, 115551. DOI: 10.1016/j.bone.2020.115551.

EL BIALY, I., W. JISKOOT, M. REZA NEJADNIK (2017): Formulation, delivery and stability of bone morphogenetic proteins for effective bone regeneration. *Pharm. res.*, 34, 1152-1170. DOI: 10.1007/s11095-017-2147-x

FINZE, R., M. LAUBACH, M. RUSSO SERAFINI, U. KNESER, F. MEDEIROS SAVI (2023): Histological and immunohistochemical characterization of osteoimmunological processes in scaffold-guided bone regeneration in an ovine large segmental defect model. *Biomedicines* 11, 2781. DOI: 10.3390/biomedicines11102781.

FUJITA, N., T. MATSUSHITA, K. ISHIDA, K. SASAKI, S. KUBO, T. MATSUMOTO, M. KUROSAKA, Y. TABATA, R. KURODA (2012): An analysis of bone regeneration at a segmental bone defect by controlled release of bone morphogenetic protein 2 from a biodegradable sponge composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 6, 291-298. DOI: 10.1002/term.432

GARCIA, D. C., L. E. MINGRONE, F. E. PINOTTI, L. SEADE, R. D. MELO, A. B. LUGAO, J. A. B. BEZERRA, M. J. C. D. SA (2025): Assessment of the osseointegration of pure-phase β -tricalcium phosphate (β -TCP) ceramic cylinder implants in critical segmental radial bone defects in rabbits. *Vet. Sci.* 12, 200. DOI: 10.3390/vetsci12030200.

GEETHA, M., A. K. SINGH, R. ASOKAMANI, A. K. GOGIA (2009): Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – a review. *Prog. Mater. Sci.* 54, 397–425. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2008.06.004.

GJESTEBY, L., B. DE MAN, Y. JIN, H. PAGANETTI, J. VERBURG, D. GIANTSOURI, G. WANG (2016): Metal artifact reduction in CT: where are we after four decades?. *IEEE Access* 4, 5826-5849. DOI: 10.1109/ACCESS.2016.2608621.

GOLDSCHLAGER, T., A. ABDELKADER, J. KERR, I. BOUNDY, G. JENKIN (2010): Undecalcified bone preparation for histology, histomorphometry and fluorochrome analysis. *J. Vis. Exp.* (35), 1707. DOI: 10.3791/1707.

GOMEZ-BARRENA, E., N. G. PADILLA-EGUILUZ, E. GARCIA-REY, P. HERNANDEZ-ESTEBAN, J. CORDERO-AMPUERO, J. C. RUBIO-SUAREZ (2020): Validation of a long bone fracture non-union healing score after treatment with mesenchymal stromal cells combined to biomaterials. *Injury* 51, S55-S62. DOI: 10.1016/j.injury.2020.02.030.

GRGUREVIĆ, L., S. VUKIČEVIĆ (2018): OSTEOGROW – novi lijek za koštanu regeneraciju. *Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. Medicinske znanosti.* 533, 81-81. DOI:10.21857/ygjwrcjnry

GRGUREVIC, L., I. ERJAVEC, M. GUPTA, M. PECIN, T. BORDUKALO-NIKSIC, N. STOKOVIC, D. VNUK, V. FARKAS, H. CAPAK, M. MILOSEVIC, J.B. SPOLJAR, M. PERIC, M. VUCKOVIC, D. MATICIC, R. WINDHAGER, H. OPPERMANN, T.K. SAMPATH, S. VUKICEVIC (2020): Autologous blood coagulum containing rhBMP6 induces new bone formation to promote anterior lumbar interbody fusion (ALIF) and posterolateral lumbar fusion (PLF) of spine in sheep. *Bone* 138, 115448. DOI: 10.1016/j.bone.2020.115448

GRGUREVIC, L., H. OPPERMANN, M. PECIN, I. ERJAVEC, H. CAPAK, M. PAUK, S. KARLOVIC, V. KUFNER, M. LIPAR, J. BUBIC SPOLJAR (2019): Recombinant human bone morphogenetic protein 6 delivered within autologous blood coagulum restores critical size segmental defects of ulna in rabbits. *JBMR plus*, 3(5), e10085. DOI: 10.1002/jbm4.10085

GRIMM, H., N. BILLER-ANDORNO, T. BUCH, M. DAHLHOFF, G. DAVIES, C. R. CEDERROTH, O. MAISSEN, W. LUKAS, E. PASSINI, E. TORNQVIST, I. A. S. OLSSON, J. SANDSTROM (2023): Advancing the 3Rs: innovation, implementation, ethics and society. *Front. Vet. Sci.* 10, 1185706. DOI: 10.3389/fvets.2023.1185706

HABIBOVIC, P., K DE GROOT (2007): Osteoinductive biomaterials—properties and relevance in bone repair. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 1(1), 25-32.

HERNIGOU, P., A. DESROCHES, S. QUEINNEC, C. H. FLOUZAT LACHANIETTE, A. POIGNARD, J. ALLAIN, N. CHEVALLIER, H. ROUARD (2014): Morbidity of graft harvesting versus bone marrow aspiration in cell regenerative therapy. *Int. Orthop.* 38, 1855–1860. DOI: 10.1007/s00264-014-2418-y.

HOLLINGER J.O, J.C. KLEINSCHMIDT(1990): The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg.* 1990;1:60–68.

HUANG, T. Y., C.C. WU, P.W. WENG, J.M. CHEN, W.L.YEH (2021): Effect of ErhBMP-2-loaded β -tricalcium phosphate on ulna defects in the osteoporosis rabbit model. *Bone Rep.*, 14, 100739. DOI: 10.1016/j.bonr.2020.100739

IVANJKO, N., N. ŠTOKOVIĆ, M. PECIN, D. VNUK, A. SMAJLOVIĆ, N. IVKIĆ, H. CAPAK, A. JAVOR, Z. VRBANAC, D. MATIĆIĆ, S. VUKIČEVIĆ (2023): Calcium phosphate ceramics combined with rhBMP6 within autologous blood coagulum promote posterolateral lumbar fusion in sheep. *Sci. Rep.* 13, 22079. DOI: 10.1038/s41598-023-48878-9.

IVANJKO, N., N. STOKOVIC, M. MILESEVIC, V. RUMENOVIC, R. WINDHAGER, K. T. SAMPATH, N. KOVACIC, D. GRCEVIC, S. VUKICEVIC (2023): rhBMP6 in autologous blood coagulum is a preferred osteoinductive device to rhBMP2 on bovine collagen sponge in the rat ectopic bone formation assay. *Biomed. Pharmacother.* 169, 115844. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115844.

JAVOR, A., N. ŠTOKOVIĆ, N. IVANJKO, I. LUKŠA, H. CAPAK, Z. VRBANAC (2025): Diagnostic Imaging of the Skeletal System: Overview of Applications in Human and Veterinary Medicine. *Bioengineering* 12, 1358. DOI: 10.3390/bioengineering12121358.

JIANG, Y., J. ZHAO, E. Y. LIAO, R. C. DAI, X. P. WU, H. K. GENANT (2005): Application of micro-CT assessment of 3-D bone microstructure in preclinical and clinical studies. *J. Bone Miner. Metab.* 23 (Suppl. 1), 122–131. DOI: 10.1007/BF03026336

KARIPIDOU, N., J. P. M. GORLEY, C. KATRILAKA, C. MANGLARIS, A. N. TZAVELLAS, M. PITOU, A. AGGELI (2025): A critical review of commercial collagen-based scaffolds in bone regeneration: functional properties and clinical evidence from Infuse® bone graft. *J. Funct. Biomater.* 16, 313. DOI: 10.3390/jfb16090313.

KEATING, J. F., A. H. R. W. SIMPSON, C. M. ROBINSON (2005): The management of fractures with bone loss. *J. Bone Joint Surg. Br.* 87, 142–150. DOI: 10.1302/0301-620X.87B2.15874.

KIM, Y. H., K. W. KIM, K. W. RHYU, J. B. PARK, J. H. SHIN, Y. Y. KIM, J. S. LEE, J. H. AHN, J. H. RYU, H. Y. PARK, S. I. KIM (2025): Bone fusion materials: past, present, and future. *Asian Spine J.* 19, 490–500. DOI: 10.31616/asj.2024.0520.

KIM, J. M., M. H. KIM, S. S. KANG, G. KIM, S. H. CHOI (2014): Comparable bone healing capacity of different bone graft matrices in a rabbit segmental defect model. *J. Vet. Sci.* 15, 289–295. DOI: 10.4142/jvs.2014.15.2.289.

KNABE, C., D. ADEL-KHATTAB, W.-D. HUBNER, F. PETERS, T. KNAUF, B. PELESKA, D. BARNEWITZ, A. GENZEL, R. KUSSEROW, F. STERZIK, M. STILLER, C. MULLER-MAI (2019): Effect of silicon-doped calcium phosphate bone grafting materials on bone regeneration and osteogenic marker expression after implantation in the ovine scapula. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 107, 594–614. DOI: 10.1002/jbm.b.34153.

LASANIANOS, N. G., N. K. KANAKARIS, P. V. GIANNOUDIS (2010): Current management of long bone large segmental defects. *Orthop. Trauma* 24, 149–163. DOI: 10.1016/j.mporth.2009.10.003

LEACH, J., R. G. BITTAR (2009): BMP-7 (OP-1®) safety in anterior cervical fusion surgery. *J. Clin. Neurosci.* 16, 1417–1420. DOI: 10.1016/j.jocn.2009.02.012.

LEGEROS, R. Z., S. LIN, R. ROHANIZADEH, D. MIJARES, J. LEGEROS (2003): Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 14, 201–209. DOI: 10.1023/A:1022872421333.

LEI, W., Y. WU, H. YUAN, P. HE, J. WU, J. CHEN, M. LI (2025): Establishing rabbit critical-size bone defects to evaluate the bone-regeneration potential of porous calcium phosphate ceramics. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 12, 1524133. DOI: 10.3389/fbioe.2024.1524133.

LI, Y., Y. LIU, H. BAI, R. LI, J. SHANG, Z. ZHU, C. YANG, H. LI, J. QI, W. ZHANG (2021): Sustained release of VEGF to promote angiogenesis and osteointegration of three-dimensional printed biomimetic titanium alloy implants. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9, 757767. DOI: 10.3389/fbioe.2021.757767.

LI, Z., J. HARDIJ, D. P. BAGCHI, E. L. SCHELLER, O. A. MACDOUGALD (2018): Development, regulation, metabolism and function of bone marrow adipose tissues. *Bone* 110, 134–140. DOI: 10.1016/j.bone.2018.02.015.

LITTLE, D. G., M. RAMACHANDRAN, A. SCHINDELER (2007): The anabolic and catabolic responses in bone repair. *J. Bone Joint Surg. Br.* 89, 425–433. DOI: 10.1302/0301-620X.89B4.18301.

LUCA, L., A.-L. ROUGEMONT, B. H. WALPOTH, L. BOURE, A. TAMI, J. M. ANDERSON, O. JORDAN, R. GURNY (2011): Injectable rhBMP-2-loaded chitosan hydrogel composite: osteoinduction at ectopic site and in segmental long bone defect. *J. Biomed. Mater. Res. A* 96, 66–74. DOI: 10.1002/jbm.a.32957.

MILLS, L. A., A. H. R. W. SIMPSON (2012): In vivo models of bone repair. *J. Bone Joint Surg. Br.* 94, 865–874. DOI: 10.1302/0301-620X.94B7.27370.

MIYAZONO, K., Y. KAMIYA, M. MORIKAWA (2010): Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J. biochem.*, 147(1), 35-51. DOI: 10.1093/jb/mvp148

MOLINA, C. S., D. J. STINNER, W. T. OBREMSKEY (2014): Treatment of traumatic segmental long-bone defects: a critical analysis review. *JBJS Rev.* 2, e1. DOI: 10.2106/JBJS.RVW.M.00062.

MONT, M. A., P. S. RAGLAND, B. BIGGINS, G. FRIEDLAENDER, T. PATEL, S. COOK, G. ETIENNE, A. SHIMMIN, R. KILDEY, D. C. RUEGER, T. A. EINHORN (2004): Use of bone morphogenetic proteins for musculoskeletal applications. *J. Bone Joint Surg. Am.* 86(Suppl. 2), 41–55. DOI: 10.2106/00004623-200412002-00008.

MORSHED, S. (2014): Current options for determining fracture union. *Advances in medicine*, 2014(1), 708574.

MOZA, B., D. MUKHERJEE, M. SINGH, V. PAHWA, P. UJJAINIA, S. PATHAK, A. SAHA, A. SRIVASTAVA (2024): Advancements in the imaging techniques for detection of skeletal pathologies: a comprehensive review. *Tuijin Jishu/J. Propuls. Technol.* 45, 100–110.

NAUTH, A., M. D. MCKEE, T. A. EINHORN, J. T. WATSON, R. LI, E. H. SCHEMITSCH (2011): Managing bone defects. *J. Orthop. Trauma* 25, 462–466. DOI: 10.1097/BOT.0b013e318224caf0.

NEETESON, N. J., A. R. BUGBIRD, L. A. BURT, S. K. BOYD (2020): Statistical investigation of interdependence of trabecular microarchitectural parameters from micro-computed tomography. *Bone* 137, 115397. DOI: 10.1016/j.bone.2020.115397.

OGOSE, A., T. HOTTA, H. KAWASHIMA, N. KONDO, W. GU, T. KAMURA, N. ENDO (2005): Comparison of hydroxyapatite and beta tricalcium phosphate as bone substitutes after excision of bone tumors. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 72, 94–101. DOI: 10.1002/jbm.b.30136.

OKADA, T., T. KANAI, N. TACHIKAWA, M. MUNAKATA, S. KASUGAI (2016): Long-term radiographic assessment of maxillary sinus floor augmentation using beta-tricalcium phosphate: analysis by cone-beam computed tomography. *Int. J. Implant Dent.* 2, 8. DOI: 10.1186/s40729-016-0042-6.

O'NEILL, K. R., C. M. STUTZ, N. A. MIGNEMI, M. C. BURNS, M. R. MURRY, J. S. NYMAN, J. G. SCHOENECKER (2012): Micro-computed tomography assessment of the progression of fracture healing in mice. *Bone* 50, 1357–1367. DOI: 10.1016/j.bone.2012.03.008.

PARK, S. H., H. CHOI, J. S. HAN, Y. B. PARK (2015): Comparative study of decalcification versus nondecalcification for histological evaluation of one-wall periodontal intrabony defects in dogs. *Microsc. Res. Tech.* 78, 94–104. DOI: 10.1002/jemt.22449.

PECIN, M., N. STOKOVIC, N. IVANJKO, A. SMAJLOVIC, M. KRESZINGER, H. CAPAK, Z. VRBANAC, H. OPPERMANN, D. MATICIC, S. VUKICEVIC (2021): A novel autologous bone graft substitute containing rhBMP6 in autologous blood coagulum with synthetic ceramics for reconstruction of a large humerus segmental gunshot defect in a dog: the first veterinary patient to receive a novel osteoinductive therapy. *Bone Rep.* 14, 100759. DOI: 10.1016/j.bonr.2021.100759.

PERIĆ, M., I. DUMIĆ-CULE, D. GRČEVIĆ, M. MATIJAŠIĆ, D. VERBANAC, R. PAUL, L. GRGUREVIĆ, V. TRKULJA, C. M. BAGI, S. VUKIČEVIĆ (2015): The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. *Bone* 70, 73–86. DOI: 10.1016/j.bone.2014.07.010.

REICHERT, J. C., S. SAIFZADEH, M. E. WULLSCHLEGER, D. R. EPARI, M. A. SCHÜTZ, G. N. DUDA, H. SCHELL, M. VAN GRIENSVEN, H. REDL, D. W. HUTMACHER (2009): The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials* 30, 2149–2163. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.050.

RENTSCH, C., W. SCHNEIDERS, S. MANTHEY, B. RENTSCH, S. RAMMELT (2014): Comprehensive histological evaluation of bone implants. *Biomatter* 4, e27993. DOI: 10.4161/biom.27993.

RITMAN, E. L. (2011): Current status of developments and applications of micro-CT. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 13, 531–552. DOI: 10.1146/annurev-bioeng-071910-124732.

ROENTGEN, W. C. (1895): Ueber eine neue Art von Strahlen. *Ann. Phys. Chem.* 64, 1–11.

ROUSSELLE, A., A. AMELOT, J. THARIAT, J. JACOB, G. MERCY, L. DE MARZI, L. FEUVRET (2020): Metallic implants and CT artefacts in the CTV area: Where are we in 2020?. *Cancer/Radiothérapie* 24, 658–666. DOI: 10.1016/j.canrad.2020.06.022.

RUSSO, A., M. BIANCHI, M. SARTORI, M. BOI, G. GIAVARESI, D. M. SALTER, M. JELIC, M. C. MALTARELLO, A. ORTOLANI, S. SPRIO, M. FINI, A. TAMPERI, M. MARCACCI (2018): Bone regeneration in a rabbit critical femoral defect by means of magnetic hydroxyapatite macroporous scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 106, 546–554. DOI: 10.1002/jbm.b.33836.

SAMPATH, T. K., A. H. REDDI (2020): Discovery of bone morphogenetic proteins – a historical perspective. *Bone* 140, 115548. DOI: 10.1016/j.bone.2020.115548.

SANDHU, H. S., S. N. KHAN (2002): Animal models for preclinical assessment of bone morphogenetic proteins in the spine. *Spine* 27(Suppl. 1), S32–S38. DOI: 10.1097/00007632-200208151-00008.

SCHEMITSCH, E. H. (2017): Size matters: defining critical in bone defect size!. *J Orthop Trauma.*, 31, S20-S22. DOI: 10.1097/BOT.0000000000000978

SCHNEIDER, M. R. (2021): Von Kossa and his staining technique. *Histochem. Cell Biol.* 156, 523–526. DOI: 10.1007/s00418-021-02051-3.

SCHULTZ, D. G. (2008): FDA Public Health Notification: Life-threatening complications associated with recombinant human bone morphogenetic protein in cervical spine fusion.

SCHWARZENBERG, P., S. DARWICHE, R. S. YOON, H. L. DAILEY (2020): Imaging modalities to assess fracture healing. *Curr. Osteoporos. Rep.* 18, 169–179. DOI: 10.1007/s11914-020-00581-3.

SEEHERMAN, H., J.M. WOZNEY (2005): Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 16(3), 329-345. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2005.05.001

SEGAL, U., J. SHANI (2010): Surgical management of large segmental femoral and radial bone defects in a dog. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 23, 66–70. DOI: 10.3415/VCOT-09-02-0022.

SHIBAHARA, K., K. HAYASHI, Y. NAKASHIMA, K. ISHIKAWA (2023): Reconstruction of load-bearing segmental bone defects using carbonate apatite honeycomb blocks. *ACS Mater. Au* 3, 321-336. DOI: 10.1021/acsmaterialsau.3c00008.

STOKOVIC, N., N. IVANJKO, I. MATIC JELIC, M. MILESEVIC, V. RUMENOVIC, V. BLAZEVIC, L. ROGINA, I. BASTALIC, I. ERJAVEC, T. BORDUKALO NIKSIC, V. KUFNER, D. ADANIC, M. PERIC, M. PECIN, T. K. SAMPATH, S. VUKICEVIC (2022): State-of-the-art of the bone morphogenetic protein research field: 13th International BMP Conference, Dubrovnik 2022. *Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. Medicinske znanosti* 553 (60-61), 84–99. DOI: 10.21857/ypn4ocd309.

STOKOVIC, N., N. IVANJKO, M. MILESEVIC, T. KUBER SAMPATH, S. VUKICEVIC (2022): A simple rodent subcutaneous assay for identification of new osteoinductive molecules: The key method for screening of novel bone regeneration implants. *Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. Medicinske znanosti* 553(60–61), 40–53. DOI: 10.21857/y54jofvngxm.

STOKOVIC, N., N. IVANJKO, A. JAVOR, M. PECIN, K. MUZINA, Z. M. STEPANIC, H. CAPAK, Z. VRBANAC, D. MATICIC, S. VUKICEVIC (2025): Regeneration of a rabbit segmental defect with a new bone therapy: autologous blood coagulum with bone morphogenetic protein 6 and synthetic ceramics. *Biomater. Res.* 29, 0140. DOI: 10.34133/bmr.0140.

STOKOVIC, N., N. IVANJKO, M. PECIN, I. ERJAVEC, S. KARLOVIC, A. SMAJLOVIC, H. CAPAK, M. MILOSEVIC, J. BUBIC SPOLJAR, D. VNUK, D. MATICIC, H. OPPERMANN, T. K. SAMPATH, S. VUKICEVIC (2020): Evaluation of synthetic ceramics as compression resistant matrix to promote osteogenesis of autologous blood coagulum containing recombinant human bone morphogenetic protein 6 in rabbit posterolateral lumbar fusion model. *Bone* 140, 115544. DOI: 10.1016/j.bone.2020.115544.

STOKOVIC, N., N. IVANJKO, M. PECIN, I. ERJAVEC, S. KARLOVIC, A. SMAJLOVIC, H. CAPAK, M. MILOSEVIC, J. BUBIC SPOLJAR, D. VNUK, D. MATICIC, H. OPPERMANN, T. K. SAMPATH, S. VUKICEVIC (2020): Evaluation of synthetic ceramics as compression resistant matrix to promote osteogenesis of autologous blood coagulum containing recombinant human bone morphogenetic protein 6 in rabbit posterolateral lumbar fusion model. *Bone*.140, 115544. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115544

STOKOVIC, N., N. IVANJKO, D. MATICIC, F. P. LUYTEN, S. VUKICEVIC (2021): Bone morphogenetic proteins, carriers, and animal models in the development of novel bone regenerative therapies. *Materials* 14, 3513. DOI: 10.3390/ma14133513.

STOKOVIC, N., N. IVANJKO, M. PECIN, I. ERJAVEC, A. SMAJLOVIC, M. MILESEVIC, S. KARLOVIC, H. CAPAK, Z. VRBANAC, D. MATICIC, S. VUKICEVIC (2022): Long-term posterolateral spinal fusion in rabbits induced by rhBMP6 applied in autologous blood coagulum with synthetic ceramics. *Sci. Rep.* 12, 11649. DOI: 10.1038/s41598-022-14931-2.

STOKOVIC, N., N. IVANJKO, V. RUMENOVIC, A. BRESKI, K. T. SAMPATH, M. PERIC, M. PECINA, S. VUKICEVIC (2022): Comparison of synthetic ceramic products formulated with autologous blood coagulum containing rhBMP6 for induction of bone formation. *Int. Orthop.* 46, 2693–2704. DOI: 10.1007/s00264-022-05546-3.

STOKOVIC, N., N. IVANJKO, M. MILESEVIC, V. RUMENOVIC, H. OPPERMANN, L. SHIMP, T. KUBER SAMPATH, M. PECINA, S. VUKICEVIC (2021): Synthetic ceramic macroporous blocks as a scaffold in ectopic bone formation induced by recombinant human bone morphogenetic protein 6 within autologous blood coagulum in rats. *Int. Orthop.* 45, 1097–1107. DOI: 10.1007/s00264-020-04847-9.

STOKOVIC, N., N. IVANJKO, I. ERJAVEC, A. BRESKI, M. PERIC, S. VUKICEVIC (2021): Zoledronate bound to ceramics increases ectopic bone volume induced by rhBMP6 delivered in autologous blood coagulum in rats. *Biomedicines* 9, 1487. DOI: 10.3390/biomedicines9101487.

STOKOVIC, N., N. IVANJKO, M. MILESEVIC, K. MUZINA, M. PECIN, D. MATICIC, S. VUKICEVIC (2026): Bone induction as a function of size and chemical composition of calcium phosphate granules in Osteogrow-C evaluated in animal models: a 1-year follow-up. *Biomater. Res.* 30, 0337. DOI: 10.34133/bmr.0337.

STOKOVIC, N., N. IVANJKO, N. IVANJKO, I. ERJAVEC, M. MILOSEVIC, H. OPPERMANN, L. SHIMP, K. T. SAMPATH, S. VUKICEVIC (2020): Autologous bone graft substitute containing rhBMP6 within autologous blood coagulum and synthetic ceramics of different particle size determines the quantity and structural pattern of bone formed in a rat subcutaneous assay. *Bone* 141, 115654. DOI: 10.1016/j.bone.2020.115654.

ŠTOKOVIĆ, N. (2022): Indukcija ektopičnog koštanog tkiva osteoinduktivnim implantatom koji sadrži rekombinirani humani koštani morfogenetski protein 6 (rhBMP6), autologni krvni ugrušak i bifazičnu biokeramiku. Doctoral dissertation. University of Zagreb. School of Medicine

SULAIMAN, S. B., T. K. KEON, C. H. CHENG, A. B. SAIM, R. B. H. IDRUS (2013): Tricalcium phosphate/hydroxyapatite (TCP-HA) bone scaffold as potential candidate for the formation of tissue engineered bone. *Indian J. Med. Res.* 137, 1093–1101.

SUL, Y.-T., C. B. JOHANSSON, S. PETRONIS, A. KROZER, Y. JEONG, A. WENNERBERG, T. ALBREKTSSON (2002): Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown. *Biomaterials* 23, 491–501. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00131-4

TANAKA, T., H. KOMAKI, M. CHAZONO, S. KITASATO, A. KAKUTA, S. AKIYAMA, K. MARUMO (2017): Basic research and clinical application of beta-tricalcium phosphate (β -TCP). *Morphologie* 101, 164–172. DOI: 10.1016/j.morpho.2017.01.003.

TOOMBS, J. P., L. J. WALLACE (1985): Evaluation of autogeneic and allogeneic cortical chip grafting in a feline tibial nonunion model. *Am. J. Vet. Res.*, 46, 519–528.

TURUNEN, M. J., S. LAGES, A. LABRADOR, U. OLSSON, M. TAGIL, J. S. JURVELIN, H. ISAKSSON (2014): Evaluation of composition and mineral structure of callus tissue in rat femoral fracture. *J. Biomed. Opt.* 19, 025003. DOI: 10.1117/1.JBO.19.2.025003.

URIST, M. R. (1965): Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893-899. DOI: 10.1126/science.150.3698.893.

VERDERIO, P., M. LECCHI, C. M. CINISELLI, B. SHISHMANI, G. APOLONE, G. MANENTI (2023): 3Rs principle and legislative decrees to achieve high standard of animal research. *Animals* 13, 277. DOI: 10.3390/ani13020277.

VON BENECKE, J. P., E. TARSITANO, L. M. A. ZIMMERMANN, K. M. SHAKESHEFF, W. R. WALSH, H. W. BAE (2024): A narrative review on recombinant human bone morphogenetic protein 2: where are we now?. *Cureus* 16, e67785. DOI: 10.7759/cureus.67785.

VUKICEVIC S, M. PERIC, H. OPPERMANN, N. STOKOVIC, N. IVANJKO, I. ERJAVEC, V. KUFNER, D. VNUK, J. BUBIC SPOLJAR, M. PECIN, R. NOVAK, I. MATIC JELIC, K. BAKIC, M. MILESEVIC, V. RUMENOVIC, I. POPEK, S. PEHAR, S. MARTINOVIC, V. BLAZEVIC, L. ROGINA, S. VIKIC-TOPIC, T. BOZIC, D. VERBANAC, T. BORDUKALO NIKSIC, K. SAMPATH , M. PECINA, D. MATICIC, L. GRGUREVIC (2020): Bone morphogenetic proteins: From discovery to development of a novel autologous bone graft substitute consisting of recombinant human BMP6 delivered in autologous blood coagulum carrier. *Rad CASA – Med. Sci.* 544, 26–41. DOI: 10.21857/mnlqgc5vgy

VUKICEVIC, S., H. OPPERMANN, D. VERBANAC, M. JANKOLIJA, I. POPEK, J. CURAK, J. BRKLJACIC, M. PAUK, I. ERJAVEC, I. FRANCETIC, I. DUMIC-CULE, M. JELIC, D. DURDEVIC, T. VLAHOVIC, R. NOVAK, V. KUFNER, T. BORDUKALO NIKSIC, M. KOZLOVIC, Z. BANIC TOMISIC, J. BUBIC-SPOLJAR, I. BASTALIC, S. VIKIC-TOPIC, M. PERIC, M. PECINA, L. GRGUREVIC (2014): The clinical use of bone morphogenetic proteins revisited: a novel biocompatible carrier device OSTEOGROW for bone healing. *Int. Orthop.* 38, 635-647. DOI: 10.1007/s00264-013-2201-1

VUKICEVIC, S., L. GRGUREVIC, I. ERJAVEC, M. PECIN, T. BORDUKALO NIKSIC, N. STOKOVIC, M. LIPAR, H. OPPERMANN, T. KUBER SAMPATH, M. PERIC (2020): Autologous blood coagulum is a physiological carrier for BMP6 to induce new bone formation

and promote posterolateral lumbar spine fusion in rabbits. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 14, 147–159. DOI: 10.1002/term.2981.

VUKICEVIC, S., N. STOKOVIC, M. PECINA (2019): Is ceramics an appropriate bone morphogenetic protein delivery system for clinical use? *Int. Orthop.* 43, 1275–1276. DOI: 10.1007/s00264-019-04322-0.

VUKICEVIC, S., L. GRGUREVIC (2009): BMP-6 and mesenchymal stem cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20, 441–448. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.020.

101. WILDEMANN, B., A. IGNATIUS, F. LEUNG, L. A. TAITSMAN, R. M. SMITH, R. PESÁNTEZ, M. J. STODDART, R. G. RICHARDS, J. B. JUPITER (2021): Non-union bone fractures. *Nat. Rev. Dis. Primers* 7, 57. DOI: 10.1038/s41572-021-00289-8.

WILLEMS, A., C. ICLI, J. H. WAARSING, S. M. A. BIERMA-ZEINSTRAN, D. E. MEUFFELS (2022): Bone union assessment with computed tomography (CT) and statistical associations with mechanical or histological testing: a systematic review of animal studies. *Calcif. Tissue Int.* 110, 147–161. DOI: 10.1007/s00223-021-00904-6.

WILLIAMS, D. F. (2008): On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941–2953.

WULSTEN, D., V. GLATT, A. ELLINGHAUS, K. SCHMIDT-BLEEK, A. PETERSEN, H. SCHELL, J. LIENAU, W. SEBALD, F. PLÖGER, P. SEEMANN, G. N. DUDA (2011): Time kinetics of bone defect healing in response to BMP-2 and GDF-5 characterised by in vivo biomechanics. *Eur. Cell Mater.* 21, 177–192. DOI: 10.22203/ecm.v021a14.

YADAV, S., A. NATH, R. SURESH, A. K. VASUDEVAN, B. BALAKRISHNAN, M. R. PETER, A. NATH, P. SURESH (2025): Advances in implant surface technology: a biological perspective. *Cureus* 17, e78264. DOI: 10.7759/cureus.78264.

YAMAMOTO, M., Y. TAKAHASHI, Y. TABATA (2006): Enhanced bone regeneration at a segmental bone defect by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from a biodegradable hydrogel. *Eng.* 12(5), 1305–1311. DOI: 10.1089/ten.2006.12.1305

YAMAMOTO, M., A. HOKUGO, Y. TAKAHASHI, T. NAKANO, M. HIRAOKA, Y. TABATA (2015): Combination of BMP-2-releasing gelatin/ β -TCP sponges with autologous bone marrow for bone regeneration of X-ray-irradiated rabbit ulnar defects. *Biomaterials*. 56, 18-25. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.03.057

ZHU, L., Y. LIU, A. WANG, Z. ZHU, Y. LI, C. ZHU, Z. CHE, T. LIU, H. LIU, L. HUANG (2022): Application of BMP in bone tissue engineering. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10, 810880. DOI: 10.3389/fbioe.2022.810880.

9. ŽIVOTOPIS S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA

Ana Javor rođena je 3. kolovoza 1996. godine u Slavanskom Brodu. Diplomirala je 2021. godine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a prethodno je završila srednjoškolsko obrazovanje u Gimnaziji Matija Mesić u Slavanskom Brodu. Od siječnja 2022. godine zaposlena je na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu kao asistentica u Zavodu za rendgenologiju, ultrazvučnu dijagnostiku i fizikalnu terapiju, gdje sudjeluje u nastavnim, znanstvenim i stručnim aktivnostima. Od ožujka 2022. godine pohađa doktorski studij veterinarskih znanosti na istom fakultetu. Engleskim jezikom služi se na razini C1 u svim jezičnim kompetencijama, dok se njemačkim jezikom služi na razini A2. Dobitnica je Rektorove nagrade za individualni znanstveni i umjetnički rad dodijeljene 2020. godine za rad pod naslovom „Razlike morfometrijskih značajki eritrocita s inkluzijama *Babesia canis canis*“. Aktivno sudjeluje u znanstvenim skupovima te je sudjelovala na Eastern European Veterinary Conference u Ljubljani 2022. godine, 4. Annual Scientific Meetingu ECVSMR u Parizu 2023. godine, 10. međunarodnom kongresu Veterinarska znanost i struka u Zagrebu 2023. godine, EVDI Annual Congressu u Ateni 2024. godine i u Sitgesu 2025. godine. Dodatno se stručno usavršavala sudjelovanjem na radionici „Ultrasound 1“ u organizaciji OKEAN Veterinary Training System 2023. godine te se znanstveno-stručno usavršavala u Istituto Veterinario di Novara u Italiji u svibnju 2025. godine te u Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University u Belgiji u lipnju iste godine. Također je bila članica organizacijskog odbora Međunarodnog znanstveno-stručnog kongresa Veterinarska znanost i struka 2023 i 2026. godine. Primarni klinički fokus obuhvaća primjenu i interpretaciju rendgenološke dijagnostike (RTG), ultrazvučne dijagnostike (UZV) i kompjutorizirane tomografije (CT) u dijagnostici bolesti malih životinja.

IZVORNI ZNANSTVENI RADOVI

ĐURIČIĆ, D., M. LUKAČ, S. FARAGUNA, **A. JAVOR**, J. MILJKOVIĆ (2025): Right hemithorax pneumonia in red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*). *Int. J. Vet. Sci. Anim. Husband.* 10, 262–265. DOI: 10.22271/veterinary.2025.v10.i3d.2144.

ŠTOKOVIĆ, N., N. IVANJKO, **A. JAVOR**, M. PEĆIN, K. MUŽINA, Ž. M. STEPANIĆ, H. CAPAK, Z. VRBANAC, D. MATIČIĆ, S. VUKIČEVIĆ (2025): Regeneration of a rabbit segmental defect with a new bone therapy: autologous blood coagulum with bone morphogenetic protein 6 and synthetic ceramics. *Biomater. Res.* 29, 14. DOI: 10.34133/bmr.0140.

CAPAK, H., B. ŠKRLIN, **A. JAVOR**, I. FOLNOŽIĆ, M. VUČKOVIĆ, Z. VRBANAC (2024): The incidence and distribution of radiographic changes in digital region of stud bulls without lameness. *Vet. Arhiv* 94, 1–10. DOI: 10.24099/vet.arhiv.2045.

IVANJKO, N., N. ŠTOKOVIĆ, M. PEĆIN, D. VNUK, A. SMAJLOVIĆ, N. IVKIĆ, H. CAPAK, **A. JAVOR**, Z. VRBANAC, D. MATIČIĆ et al. (2023): Calcium phosphate ceramics combined with rhBMP6 within autologous blood coagulum promote posterolateral lumbar fusion in sheep. *Sci. Rep.* 13, 22079. DOI: 10.1038/s41598-023-48878-9.

TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ, T., K. KORPEŠ, M. ĐURAS, Z. VRBANAC, **A. JAVOR**, M. KOLENC (2023): Paleopathological changes in animal bones from Croatian archaeological sites. *Publications* 10, 361–386. DOI: 10.3390/publications10050361.

PREGLEDNI RADOVI

JAVOR, A., N. ŠTOKOVIĆ, N. IVANJKO, I. LUKŠA, H. CAPAK, Z. VRBANAC (2025): Diagnostic imaging of the skeletal system: overview of applications in human and veterinary medicine. *Bioengineering* 12, 1358. DOI: 10.3390/bioengineering12121358.

BACAN, I., H. CAPAK, **A. JAVOR**, B. ŠKRLIN, A. KRALJEVIĆ, F. KEREKOVIĆ, A. SMAJLOVIĆ, K. MILJAK, Z. VRBANAC (2023): Rendgenološki nalazi ozljeda lokomotornog sustava preživača – prikaz slučajeva. In: *Veterinarski dani 2023*. Zagreb. pp. 88–91.

ŠTOKOVIĆ, N., N. IVANJKO, M. PEĆIN, T. BORDUKALO-NIKŠIĆ, V. KUFNER, I. ERJAVEC, T. BOŽIĆ, M. MILEŠEVIĆ, V. RUMENOVIĆ, I. MATIĆ JELIĆ, V. BLAŽEVIĆ,

A. SMAJLOVIĆ, H. CAPAK, Z. VRBANAC, **A. JAVOR**, D. VNUK, H. OPPERMAN, D. ADANIĆ, M. PERIĆ, D. MATIČIĆ, S. VUKIČEVIĆ (2024): Exploration of new platforms and potentials in regenerative medicine. *Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. Medicinske znanosti* 563(66-67), 48–57. DOI: 10.21857/m3v76t1j6y

VUKELIĆ, L., H. CAPAK, M. LOJKIĆ, B. ŠKRLIN, I. BACAN, **A. JAVOR**, M. EFENDIĆ, Z. VRBANAC, T. PROPADALO, N. MAČEŠIĆ (2023): Dijagnostički doprinos sonoelastografije muškog spolnog sustava domaćih životinja. In: *Veterinarski dani 2023*. Zagreb. pp. 65–67.

STRUČNI RADOVI

HORNUNG, I., **A. JAVOR**, B. MRATOVIĆ, M. LUKAČ, H. CAPAK (2025): Kontrastne radiografske pretrage gmazova i vodozemaca. *Veterinar* 63, 5–13.

PERVAN, D., **A. JAVOR**, I. ZEČEVIĆ, D. BROZIĆ (2023): Enteralna prehrana pasa i mačaka nazoezofagealnim i nazogastričnim sondama. *Hrv. Vet. Vjesn.* 31, 52–60.

PEJAKIĆ, I., E. SAJDL, K. VID, H. CAPAK, **A. JAVOR**, G. JURKIĆ KRSTESKA, I. FOLNOŽIĆ (2022): Intrauterina mumifikacija plodova u kuničke – prikaz slučaja. *Hrv. Vet. Vjesn.* 30, 46–50.

ZBORNICI, SAŽECI I OSTALO

POPOVIĆ, K., J. MILJKOVIĆ, S. CIRKULAN, T. ŠALIKA, **A. JAVOR**, T. MATAUŠIĆ, A. SHEK VUGROVEČKI, I. ŽURA ŽAJA, D. ĐURIČIĆ (2025): Assessment of body condition and morphometric data of Indian star tortoises at three different locations in captivity. In: *Proceedings of the Zoo and Wildlife Health Conference 2025* (Fiuza, R., Ed.). European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians (EAZWV). Brussels, Belgium. p. 125.

BRKLJAČA BOTTEGARO, N., I.-C. ŠOŠTARIĆ ZUCKERMANN, J. GOTIĆ, K. BOJANIĆ, K. MILJAK, **A. JAVOR**, V. PRIE, B. PRIE, Z. VRBANAC (2024): Association between radiographical, computed tomography (CT) and histopathological findings of 35 front feet with various histopathological grades of chronic laminitis. In: *Proceedings of the 5th Scientific*

Meeting of the European College of Veterinary Sports Medicine and Rehabilitation (ECVSMR) (López Rivero, J. L., Ed.). ECVSMR. Hannover. p. 108.

KRALJEVIĆ, A., N. IVKIĆ, **A. JAVOR**, J. ADANIĆ, I. VUKOVIĆ, I. BACAN, H. CAPAK, Z. VRBANAC (2023): Bottom-hung window trauma – rehabilitation challenges in a cat. In: Book of Abstracts of the 10th International Congress Veterinary Science and Profession (Brkljača Bottegaro, N., Lukač, M., Vrbanac, Z., Eds.). Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb. Zagreb. p. 84.

EFENDIĆ, M., I. BACAN, **A. JAVOR**, H. CAPAK, E. PONGRAC, I. ŠMIT, M. CRNOGAJ, I. JOVIĆ, T. DODIG, K. ŠIMONJI et al. (2023): Multiple cartilaginous exostosis causing spinal cord compression in a Bull Terrier puppy – a case report. In: Book of Abstracts of the 10th International Congress Veterinary Science and Profession (Brkljača Bottegaro, N., Lukač, M., Vrbanac, Z., Eds.). Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb. Zagreb. p. 97.

JAVOR, A., M. EFENDIĆ, I. BACAN, A. KRALJEVIĆ, F. TORPOLNJAK, F. KEREKOVIĆ, M. HOHŠTETER, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, M. KRESZINGER, D. VNUK et al. (2023): Atypical presentation of osteomyelitis in a German Shepherd dog – a case report. In: Book of Abstracts of the 10th International Congress Veterinary Science and Profession (Brkljača Bottegaro, N., Lukač, M., Vrbanac, Z., Eds.). Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb. Zagreb. p. 96.

KRALJEVIĆ, A., V. PLICHTA, B. ŠKRLIN, M. BOŽIKOVIĆ, **A. JAVOR**, H. CAPAK, Z. VRBANAC (2023): Brachial plexus injury rehabilitation in a cat – a case report. In: Book of Abstracts of the 10th International Congress Veterinary Science and Profession (Brkljača Bottegaro, N., Lukač, M., Vrbanac, Z., Eds.). Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb. Zagreb. p. 94.

JAVOR, A., A. KRALJEVIĆ, I. BACAN, B. ŠKRLIN, F. TOPOLNJAK, F. KEREKOVIĆ, Z. VRBANAC, H. CAPAK (2023): Spinal computed tomography findings in French Bulldogs. In: Book of Abstracts of the 10th International Congress Veterinary Science and Profession (Brkljača Bottegaro, N., Lukač, M., Vrbanac, Z., Eds.). Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb. Zagreb. p. 77.

JUKIĆ, R., V. TURK, **A. JAVOR**, Z. VRBANAC, M. PALIĆ, K. SEVERIN, H. CAPAK (2022): Diagnostic imaging in forensic veterinary medicine of wildlife. In: Book of Abstracts of the 2nd International Student GREEN Conference. Faculty of Food Technology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek. Osijek. pp. 122–123.

KRALJEVIĆ, A., H. CAPAK, Z. VRBANAC, **A. JAVOR**, L. VUKELIĆ, T. BUREŠ, D. STANIN, B. ŠKRLIN, D. STANIN (2021): Retrospective study of locomotor system pathology in Croatian Shepherd dogs – preliminary results. In: Book of Abstracts of the 9th International Congress Veterinary Science and Profession. Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb. Zagreb. p. 96.

JAVOR, A., A. KRALJEVIĆ, F. TOPOLNJAK, B. ŠKRLIN, D. STANIN, Z. VRBANAC, H. CAPAK (2022): Bolesti kralježnice kod francuskih buldoga – od dijagnostike do rehabilitacije. In: *Veterinarski dani 2022*. Poreč. pp. 25–29.

CAPAK, H., **A. JAVOR**, B. MRATOVIĆ, I. LUKŠA, A. KRALJEVIĆ, B. ŠKRLIN, Z. VRBANAC (2024): Rizični čimbenici pri slikovnoj dijagnostici hitnih pacijenata. In: *7. Hrvatski veterinarski kongres*. Dubrovnik. pp. 119–120.