

# **Nastavno - naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu**

Na sednici Nastavno - naučnog veća Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu od 18. 03. 2016. godine, imenovana je komisija (odluka broj 3/13) u sastavu:

Prof. dr Snježana Čolić, Stomatološki fakultet, Beograd

Doc. dr Jelena Roganović, Stomatološki fakultet, Beograd

dr Verica Milošević, naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja *Siniša Stanković*,  
Beograd,

za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom **ISPITIVANJE USPEŠNOSTI  
REGENERACIJE KOSTNOG TKIVA NA MODELU KRITIČNOG DEFEKTA  
KALVARIJE KUNIĆA SA DIJABETES MELITUSOM TIP I,**

Kandidat: mr. sci dr Milka Živadinović

Mentor: Prof. dr Božidar Brković

Imenovana Komisija je proučila doktorsku disertaciju i podnosi Nastavno - naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

## **IZVEŠTAJ**

### **A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije**

Doktorska disertacija dr Milke Živadinović pod nazivom **ISPITIVANJE USPEŠNOSTI  
REGENERACIJE KOSTNOG TKIVA NA MODELU KRITIČNOG DEFEKTA  
KALVARIJE KUNIĆA SA DIJABETES MELITUSOM TIP I** je napisana na 111 strana na

kojima je prikazano 6 tabela, 58 fotografija i 238 referenci iz savremene, značajne naučne literature. Disertacija sadrži: rezime na srpskom i engleskom jeziku, uvod, hipotezu, ciljeve istraživanja, materijal i metode, rezultate, diskusiju, zaključke, literaturu, upotrebljene skraćenice i biografiju.

U **Uvodu** su obrazloženi mehanizmi regeneracije kostnog tkiva orofacijalne regije i ključnih procesa osteoindukcije i osteokondukcije, odgovornih za uspešnost osteogeneze. Poseban osvrt je dat na tkivne i ćelijske mehanizme ovog procesa, koji uključuju različite aktivnosti ćelija kosti i prisustvo osteoinduktivnih faktora rasta, odgovornih za koordinirane međućelijske aktivnosti, koje pored stvaranja kostnog tkiva, utiču i na proces vaskulogeneze. Imajući u vidu da regenerativna terapija kostnog tkiva u uslovima dijabetes melitusa tip I (DM tip I) predstavlja noviji terapijski pristup, analizirani su principi ovakvog terapijskog postupka. S tim u vezi, komparativno su prikazani dosadašnji rezultati laboratorijskih eksperimentalnih i kliničkih istraživanja uspešnosti regenerativne terapije kosti primenom različitih biomaterijala, kao i za sada malobrojni podaci o primeni ovog metoda u uslovima DM tip I. Pošto su za regeneraciju kosti na modelu kritičnih defekta kalvarije kunića izabrani biomaterijali sa osteoinduktivnim (autotransplantat) i osteokonduktivnim delovanjem (beta-trikalcijum fosfat sam ili u kombinaciji sa hidroksiapatitom), prikazana su njihove biološka, hemijske i mehanička svojstva. Posebno je ukazano na mogućnost primene ovih biomaterijala u dijabetično izmenjenom kostnom tkivu, kao i na mali broj podataka koji se odnose na njihovu primenu za uspešnu regenerativnu terapiju kostnih defektata kritične veličine, koji bez primenjene regenerativne terapije ne mogu da zarastaju spontano kostnim tkivom.

**Ciljevi istraživanja** su precizno definisani: Ispitati histološke i histomorfometrijske karakteristike novoformiranog kostnog tkiva i odrediti koncentracije VEGF i BMP2 u

novoformiranom kostnom tkivu posle primene autotransplantata, beta-trikalcijum fosfata ili beta-trikalcijum fosfata sa hidroksiapatitom na modelu kritičnih defekata kalvarije zdravih, kontrolnih kunića, kao i kod kunića sa eksperimentalno izazvanim DM tip I, 4 nedelje posle primene pomenutih materijala. Komparativnom statističkom analizom utvrditi značaj uspešnosti primenjene terapije na ranu fazu regeneracije kostnog tkiva kod kontrolnih i kunića sa eksperimentalno izazvanim DM tip I.

U poglavlju **Materijal i metode** pregledno su date karakteristike eksperimentalnog istraživanja na laboratorijskim životinjama kunićima i jasno su definisani protokoli za izvođenje eksperimenta u uslovima indukovano DM tip I po principima *Dobre laboratorijske prakse*. Posebno su prikazani metodi analize ispitivanih uzoraka regenerisane kosti primenom metoda deskriptivne histološke analize i histomorfometrijskog praćenja ishoda regenerativne terapije. Pored toga, jasno i pregledno su prikazani metodi kvantitativne analize nivoa signalnih molekula, VEGF i BMP2. U statističkoj obradi podataka navedeni su svi racionalno upotrebljeni statistički testovi.

**Rezultati** su prikazani u dva poglavlja, kao preliminarno istraživanje i kao komparativno, kontrolisano istraživanje uspešnosti regenerativne terapije kosti primenom biomaterijala u uslovima nekontrolisanog DM tip I. Prikazani rezultati prate postavljene ciljeve. U prvom poglavlju prikazane su histološke i histomorfometrijske karakteristike novoformirane kosti posle regenerativne terapije autotransplantatom i beta-trikalcijum fosfatom samo u uslovima dijabetes melitusa tip I, koje su praćene na defektima kosti kritične veličine od 12 mm, radi utvrđivanja standardnog protokola. Drugo poglavlje sadrži prikaz rezultata analize histoloških i histomorfometrijskih karakteristika na tkivnom nivou, kod zdravih i kunića sa DM tip I, na modelu kritičnih defekta veličine 8 mm. S tim u vezi, komparativno je prikazana učestalost

regeneracije tkiva novoformiranom kosti, fibroznim tkivom i krvnim sudovima, kao i stepen resorpcije biomaterijala (autotransplantata, beta-trikalcijum fosfata samog ili u kombinaciji sa hidroksiapatitom i spontanog zarastanja praznih defekata). Pored toga, na ćelijskom nivou dati su rezultati promena koncentracije faktora rasta VEGF i BMP2, komparativno analizirani posle regenerativne terapije kosti biomaterijalima u fiziološkim i uslovima indukovnog DM tip I.

U **Diskusiji** je naučnom analizom dobijenih rezultata utvrđeno da se primenom autotransplantata i beta-trikalcijum fosfata postiže uspešna regeneracija kosti kritičnih defekta kalvarije kunića sa indukovnim DM tip I u ranoj fazi regeneracije kosti u trajanju od 4 nedelje. Analiza komparativnih rezultata o efikasnosti regenerativne terapije primenjenih biomaterijala u uslovima prisutnog DM tip I, u odnosu na proces spontanog zarastanja kostnog defekta i zdravih kunića, pokazuje da je ispitivana kombinacija biomaterijala efikasna kako na tkivnom nivou, tako i na ćelijskom nivou praćena promenama koncentracija ispitivanih signalnih molekula. Istovremeno, dobijeni rezultati su povezani sa nalazima dosadašnjih svremenih istraživanja u ovoj oblasti.

Na osnovu iznetih i diskutovanih rezultata predstavljeni su **zaključci** koji daju jasne odgovore na postavljene ciljeve.

U **literaturi** su navedene relevantne, savremene i značajne naučne reference, koje su citirane u radu.

## **B. Kratak opis postignutih rezultata**

Histološka analiza kosti 4 nedelje posle primene materijala za regeneraciju je pokazala da primena autotransplantata dovodi do potpunog koštanog zarastanja svih regenerisanih defekta sa izraženijom trabekularnom strukturom kosti kod zdravih u odnosu na kuniće sa DM tip I. Novoformirano kostno tkivo je bilo prisutno i u centralnim delovima defekta, dobro inkorporirano sa partikulama beta-trikalcijum fosfata, kako kod zdravih tako i kod kunića sa DM tip I, dok je kod grupa sa primenjenim beta-trikalcijum fosfatom i hidroksiapatitom, novoformirano kostno tkivo registrovano uglavnom na periferiji kritičnog defekta. Vezivno fibrozno tkivo je bilo prisutno u centralnim delovima svih defekata osim u defektima regenerisanim autotransplantatom. Neresorbovani materijal je bio prisutan u centralnim delovima defekta dobro inkorporiran u novoformiranu kost ili u vezivno tkivo, češće prisutno u dijabetičnim defektima kosti.

Dobijeni rezultati unutar grupe zdravih i kunića sa DM tip I, 4 nedelje posle regenerativne terapije, pokazali su značajno povećanje novoformirane kosti i kostne srži u defektima regenerisanim autotransplantatom u odnosu na rezultate dobijene u defektima posle primene beta-trikalcijum fosfata samog ili u kombinaciji sa hidroksiapatitom i kontrolne grupe. Analiza prisustva neresorbovanih partikula materijala u grupama sa indukovanim DM tip I je pokazala njihovo značajno prisustvo posle primene beta-trikalcijum fosfata u kombinaciji sa hidroksiapatitom u odnosu na ostale ispitivane grupe, dok je procenat materijala bio podjednak posle primene autotransplantata i beta-trikalcijum fosfata. Komparativna analiza u uspešnosti regenerativne terapije između defekata kosti zdravih kunića i kunića sa indukovanim DM tip I je pokazala da DM značajno redukuje procenat novoformirane kosti bez obzira na primenjeni materijal za regenerativnu terapiju. Međutim u dijabetičnim defektima regenerisanim sa beta-trikalcijum fosfata u kombinaciji sa hidroksiapatitom, bilo je

prisutno značajno više neresorbovanog materijala u odnosu na iste defekte kod zdravih kunića, a što nije bio slučaj registrovan u drugim ispitivanim grupama.

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

Imajući u vidu principe savremene regenerativne terapije kostnog tkiva, kao i racionalne metodološke pristupe za analizu njene efikasnosti, celokupni rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da primena autotransplantata, kao osteoinduktivnog materijala, i beta-trikalcijum fosfata, kao osteokonduktivnog materijala, predstavlja efikasan terapijski pristup u postizanju uspešne, rane faze regeneracije kritičnih defektata kosti u uslovima DM tip I na animalnom modelu.

### **C. Uporedna analiza doktorske disertacije**

Rezultati ove doktorske disertacije, proistekli iz eksperimentalne *in vivo* studije, pokazali su uspešnost regenerativne terapije kosti primenom autotransplantata i beta-trikalcijum fosfata, kao i efikasnost koncepta regenerativne terapije u DM tip I na modelu kritičnog defekta kosti kalvarije kunića.

Ključni mehanizmi koji su odgovorni za otežano i usporeno zarastanje kostnog tkiva u uslovima DM tip I jeste supresija osteoblastogeneze, kojim je redukovana aktivnost, diferencijacija i proliferacija osteoblasta, a povećana njihova apoptoza. Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju po prvi put da se primenom autotransplantata i beta-trikalcijum fosfata postiže uspešan koncept regenerativne terapije kostnih defekata kritične veličine u DM

tip I, kao što je to slučaj posle primene ovih materijala u uslovima fiziološke homeostaze (Park i sar. 2010, Humber i sar. 2010).

Savremena preporuka za ispitivanje uspešnosti regenerativne terapije kostnog tkiva u uslovima dijabetes melitusa je komparativna analiza primene biomaterijala kod zdravih u odnosu na postignutu uspešnost terapije ispitivanih eksperimentalnih grupa sa DM. Dosada objavljena jedna studija Estevesa i sar. (2008), pokazala je da se primenom autotransplantata u regenerativnoj terapiji kostnog defekta tibije kunića postiže sličan kvantitet i bolji kvalitet novoformirane kosti zdravih u odnosu na kuniće sa indukovanim DM tip I, što je delimično u saglasnosti sa dobijenim rezultatima u ovoj doktorskoj disertaciji. Naime, analizirajući histomorfometrijske karakteristike, ovi autori nisu pokazali značajnu redukciju novoformiranog kostnog tkiva kod dijabetičnih kunića u odnosu na zdrave. Ovakav rezultat nije dobijen u ovoj doktorskoj disertaciji, što bi moglo da se pripiše činjenici da pomenuti autori nisu koristili model kritičnog defekta kalvarije, već male defekte tibije kunića, i kraći opservacioni period regeneracije kosti. Skorija komparativna, kontrolisana istraživanja na modelu kritičnih defekata kalvarije kunića sa indukovanim DB tip I su pokazala da se uspešnost regenerativne terapije kritičnih defekata kosti značajno povećava kada se pojača induktivni efekat regenerativne terapije, što su pokazala ispitivanja Gomesa i sar. (2008) i Mariana i sar. (2010), primenom demineralizovanog dentinskog matriksa, odnosno plazme bogate trombocitima, kao i primena zaštitnih membrana, na šta su ukazala istraživanja Vieira i sar. (2008). Analiza rezultata doktorske disertacije je pokazala da najčešće primenjivani osteoinduktivni regenerativni materijal, autotransplantat, i to bez kumulativnog induktivnog efekta dodatih faktora rasta, a što je pokazano u dosadašnjim istraživanjima, postiže uspešnu regenerativnu terapiju kritičnih defekata dijabetične kosti. Takođe, dosadašnja istraživanja su bila bazirana na značaju zaštitnih, sintetskih membrana u regenerativne svrhe, što je isključivalo značajan efekat periosta, kao biološke membrane, u kvalitetu postignute

regenerativne terapije i čija primena predstavlja značajan faktor kako u procesima osteogeneze, tako i u procesima vaskulogeneze. Imajući to u vidu, po prvi put su dati i mehanizmi regeneracije kosti u DM tip I, pošto je u doktorskoj disertaciji komparativno analiziran ćelijski nivo promena faktora rasta VEGF i BMP2.

#### **D. Objavljeni rad koji čini deo doktorske disertacije**

Milka Živadinović, Miroslav Andrić, Verica Milošević, Milica Manojlović-Stojanoski, Branislav Prokić, Bogomir Prokić, Aleksandar Dimić, Dejan Čalasan, Božidar Brković. Histomorphometric evaluation of bone regeneration using autogenous bone and beta-tricalcium phosphate in diabetic rabbits. Vojnosanit Pregl 2016, DOI 10.2298/VSP151125013Z.

#### **E. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija ISPITIVANJE USPEŠNOSTI REGENERACIJE KOSTNOG TKIVA NA MODELU KRITIČNOG DEFEKTA KALVARIJE KUNIĆA SA DIJABETES MELITUSOM TIP I, mr. sci dr Milke Živadinović, predstavlja značajan i originalan naučni doprinos u analizi tkivnih i ćelijskih mehanizama regeneracije kosti i pronalaženju odgovarajućih terapijskih modaliteta u zarastanju defekata kosti u dijabetes melitusu tip I. U radu su primenjene savremene eksperimentalne metode za analizu uspešnosti regenerativne terapije kosti. Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja, sa precizno definisanim ciljevima, originalnim naučnim pristupom, savremenom metodologijom rada, adekvatno prikazanim i diskutovanim rezultatima i jasno uobličanim zaključcima.



Na osnovu svega napred navedenog, i imajući u vidu objavljeni rad iz oblasti doktorske disertacije, Komisija predlaže Nastavno - naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju pod naslovom **ISPITIVANJE USPEŠNOSTI REGENERACIJE KOSTNOG TKIVA NA MODELU KRITIČNOG DEFEKTA KALVARIJE KUNIĆA SA DIJABETES MELITUSOM TIP I** mr. sci dr Milke Živadinović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora stomatoloških nauka.

U Beogradu, 18. april 2016. godine

**Članovi komisije:**

Prof. dr Snježana Čolić

---

Doc. dr Jelena Roganović

---

dr Verica Milošević, naučni savetnik

---