

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ
НАУКА**

1. ОДЛУКА НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-5586/3-9 од 03.06.2015. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Момира Стевановића, под називом:

**„ УТИЦАЈ НОВОСИНТЕТИСАНИХ СКАФОЛДА И
МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА НА ЕКТОПИЧНУ
ОСТЕОГЕНЕЗУ *IN VIVO*“**

Чланови комисије су:

- 1 . **проф. др Драгиња Којовић** , редовни професор за ужу научну област Пародонтологија и орална медицина, Медицинског факултета Универзитета у Нишу, председник
 2. **проф. др Александра Лукић**, редовни професор за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, члан
 3. **доц. др Драган Газивода**, доцент за ужу научну област Орална хирургија, Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду, члан
- На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу следећи:

2. ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ НАУЧНЕ ЗАСНОВАНОСТИ ТЕМЕ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Кандидат Стевановић Момир испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета Медицинских наука у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1 Кратка биографија кандидата

Стевановић Момир рођен је 23.03.1976. године у Краљеву, од оца Зорана и мајке Горице Стевановић. Стоматолошки факултет у Београду уписао је 1995. године, а дипломирао 2002. са просечном оценом 8,97. После завршених основних студија, обавио је обавезни приправнички стаж и положио државни испит. Одслужио је војни рок у школи за резервне официре санитетске службе у Београду. Ожењен, отац двоје деце.

Октобра 2003. године, уписао је последипломске студије на Стоматолошком факултету Универзитета у Београду, из научне области *Пародонтологија и орална медицина*.

Од 01.09.2012. ради као фацитатор, а затим као сарадник у настави, од 19.08.2013. године на предметима Пародонтологија и Орална медицина на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Интегрисане академске студије стоматологије .

Од 01.05.2013.год је на специјалистичким студијама из Пародонтологије и оралне медицине на истом факултету. Тренутно је на 3. години докторских студија из области Клиничка и експериментална хирургија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Положио је усмени докторски испит.

2.2 Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: „УТИЦАЈ НОВОСИНТЕТИСАНИХ СКАФОЛДА И МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА НА ЕКТОПИЧНУ ОСТЕОГЕНЕЗУ *IN VIVO*”

Предмет:

Предмет овог истраживања је испитивање утицаја новосинтетисаних биоматеријала хидроксиапатит полиетиленимина (HA/PEI) и хидроксиапатит поли(лактид-ко-гликолида) (HA/PLGA) у комбинацији са недиференцираним и диференцираним мезенхималним матичним ћелијама на ектопично формирање кости код миша.

Хипотезе:

Радне хипотезе студије

1. Керамички биокompatитни скафолди дају боље или исте резултате у остеоиндукцији од најчешће примењиваног ксенографта Bio-Oss-а
2. Примена скафолда у комбинацији са мезенхимним матичним ћелијама даје боље резултате у моделу ектопичног формирања кости у поређењу са применом скафолда без ћелија
3. Примена скафолда у комбинацији са мезенхимним матичним ћелијама које су изложене остеоиндуктивном медијуму даје најбоље резултате при ектопичном формирању кости
4. Примена биоресорбилног полимера PLGA у саставу испитиваног скафолда позитивно утиче на ектопично формирање кости

2.3 Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавио један рад у целини у домаћем часопису са рецензијом, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

M.Stevanovic, D.Ćirić. Evaluation of results by the application of bone implantates in therapy of deep defects of a parodontium. Ser J Exp Clin Res. 2014 Vol 15 (No2);79-82.
M52- 1,5 бодва

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Аутологни коштани графтови представљају златни стандард при коштаном регенерацији. Ипак, неопходност додатне хирушке интервенције као и постоперативни бол и морбидитет компромитују овај терапијски поступак. Са друге стране алогени коштани графтови могу изазвати имунолошку реакцију а потребан је и одговарајући број донора. Ксенографти као коштани супституенти су доступни али њихова примена не даје очекиване резултате.

Велики број различитих биоматеријала је синтетсан са циљем постизања адекватне коштане регенерације. Скафолди, тродимензионални, чврсти и порозни биоматеријали, би требало да показују карактеристике биокомпатибилности, биодеградабилности и остокондуктивности при формирању кости. Осим скафолда, за коштану регенерацију се могу примењивати и ћелије. Мезенхималне матичне ћелије, мултипотентне адултне матичне ћелије прво изоловане из коштане сржи, показују потенцијал диференцијације у остеобласте. Осим коштане сржи мезенхималне матичне ћелије се могу изоловати из бројних ткива адултног организма. Релативно једноставна изолација и потенцијал остеобластне диференцијације учинили су мезенхималне матичне ћелије, изоловане из различитих ткива, интересантним за коштану регенерацију. Имуномодулаторни потенцијал мезенхималних матичних ћелија такође може утицати на коштану регенерацију, иако сви процеси који леже у основи модулације имуноског одговора нису познати. Велики број истраживања је спроведен са циљем откривања оптималне комбинације мезенхималних матичних ћелија и скафолда за коштану регенерацију. Анализирани су: хемијски састав скафолда, заступљеност калцијума и фосфата, површински однос скафолда и матичних ћелија, утицај односа неорганске и полимерне компоненте скафолда, облик полимерне компоненте скафолда, порозност скафолда, излагање ћелија остеогеном диференциационом медијуму и сл.

За испитивање карактеристика скафолда и/или скафолда са матичним ћелијама *in vivo*, најчешће се користе два модела:

- 1) модел „critical size defect”, код којег је артефицијално начињен дефект који не може спонтано остеогено зарастати
- 2) модел ектопчног формирања кости, код којег се кост формира на местима где се то физиолошки не очекује (нпр. субкутано)

2.5. Значај и циљ истраживања са становишта актуелности у одређеној научној области

Након спроведених *in vitro* истраживања неопходно је утврдити потенцијал новосинтетисаних скафолда на формирање кости *in vivo* у контролисаним условима. У ове сврхе смо изабрали модел ектопичног формирања кости код миша. Треба уочити разлику између ектопично формиране кости након имплантације скафолда са недиференцираним мезенхимним матичним ћелијама и скафолда са мезенхималним матичним ћелијама које су претходно биле изложене остеоиндуктивном медијуму.

Основни циљ нашег истраживања је упоредити утицај новосинтетисаних биоматеријала хидроксиапатит полиетиленимина (HA/PEI) и хидроксиапатит поли(лактид-когликолида) (HA/PLGA) и Bio-Oss-a, који је златни стандард у регенерацији коштаног ткива, у комбинацији са мезенхималним матичним ћелијама на ектопично формирање кости код миша.

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

1. утврдити утицај скафолда на ектопично формирање кости без примене мезенхималним матичних ћелија
2. утврдити утицај скафолда у комбинацији са мезенхималним матичним ћелијама које претходно нису изложене остеоиндуктивном медијуму на ектопично формирање кости
3. утврдити утицај скафолда у комбинацији са мезенхималним матичним ћелијама које су претходно изложене остеоиндуктивном медијуму на ектопично формирање кости

2.6 Веза са досадашњим истраживањима

Оно што ово истраживање чини актуелним је испитивање новосинтетисаних биоматеријала (скафолда) у комбинацији са мезенхималним матичним ћелијама за коштану регенерацију. Карактеристике ових материјала у комбинацији са мезенхималним матичним ћелијама нису испитиване у моделу ектопичног формирања кости.

Поред тога, у малом броју радова је нумерички изражено поређење нивоа активности ензима алкална фосфатаза и остеокалцина након примене биоматеријала и биоматеријала у комбинацији са матичним ћелијама код модела ектопичног формирања кости.

2.7 Методе истраживања

Ово *in vivo* истраживање ће бити спроведено као експериментална студија на животињама.

Биће испитани: Bio-Oss, који је златни стандард у регенерацији коштаног ткива и новосинтетисане биоматеријале: хидроксиапатит полиетилен имин [HA/PEI], хидроксиапатит поли(лактид ко гликолид) [HA/PLGA].

За експеримент ће се користити различите комерцијалне ћелијске линије мезенхимних матичних ћелија које се засејавају на скафолде (2×10^5 ћелија). Једна група скафолда ће после обogaћивања ћелијама бити одмах имплантирана у мишеве субкутано. Друга група скафолда ће бити засејана истим бројем ћелија, претходно изложених остеоиндуктивном медијуму (у трајању од 14 дана), а тек након тога имплантирана у мишеве субкутано.

Користиће се C57BL/6 мишеви, старости 6 до 8 недеља, телесне тежине 15-20g. Животиње се узгајају под стандардним условима у виваријумима Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија (Факултет медицинских наука: Универзитет у Крагујевцу), уз приступ води и храни *ad libitum*. За истраживање је добијено одобрење Етичког комитета Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Хируршка интервенција ће се спроводити у општој анестезији. Формираће се по три субкутана цепа сваком мишу дорзално. У формиране цеповете ће се имплантирати: скафолд без ћелија, скафолд са MSC и скафолд са MSC које су претходно излагане остеоиндуктивном медијуму. Животиње ће се жртвовати по истеку четири и 8 недеља (од тренутка имплантације) и тада ће се узети узорци за хистолошка и биохемијска испитивања.

Експерименталне групе:

E1: 23 C57BL/6 мишева којима ће субкутано бити имплантирани HA/PLGA скафолди и то: 1. без ћелија; 2. са MSC и 3. са MSC, које су биле изложене остеоиндуктивном медијуму.

Жртвовање животиња ће се обавити по истеку четврте недеље од имплантације.

E2: 23 C57BL/6 мишева којима ће субкутано бити имплантирани HA/PEI скафолди и то: 1. без ћелија; 2. са MSC и 3. са MSC, које су биле изложене остеоиндуктивном медијуму.

Жртвовање животиња ће се обавити по истеку четврте недеље од имплантације.

E3: 23 C57BL/6 мишева којима ће субкутано бити имплантирани HA/PLGA скафолди и то: 1. без ћелија; 2. са MSC и 3. са MSC, које су биле изложене остеоиндуктивном медијуму. Жртвовање животиња ће се обавити по истеку 8. недеље од имплантације.

E4: 23 C57BL/6 мишева којима ће субкутано бити имплантирани HA/PEI скафолди и то: 1. без ћелија; 2. са MSC и 3. са MSC, које су биле изложене остеоиндуктивном медијуму.

Жртвовање животиња ће се обавити по истеку 8. недеље од имплантације.

Контролне групе

K1: 23 C57BL/6 мишева којима ће субкутано бити имплантирани Bio-Oss скафолди и то: 1. без ћелија; 2. са MSC и 3. са MSC, које су биле изложене остеоиндуктивном медијуму.

Жртвовање животиња ће се обавити по истеку четврте недеље од имплантације.

K2: 23 C57BL/6 мишева којима ће субкутано бити имплантирани Bio-Oss скафолди и то: 1. без ћелија; 2. са MSC и 3. са MSC, које су биле изложене остеоиндуктивном медијуму.

Жртвовање животиња ће се обавити по истеку осме недеље од имплантације.

Примарну **хистолошку** анализу исечака узоркованог ткива обојених толуидин-плавим ће обавити два независна истраживача који ће исечке оценити као: ткиво налик кости, ткиво налик хрскавици и везивно ткиво. Исечци узорака позитивних на коштану и хрскавично ткиво ће се бојити и на колаген тип 1, колаген тип 2 и Ализарин Ред-ом на депозите калцијума.

Биохемијске анализе активности алкалне фосфатазе и квантификација остеокалцина ће бити спроведене на следећи начин:

узорци ткива ће бити инкубирани у 1ml 0,01% Triton X-100 (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*) и механички хомогенизују употребом хомогенизатора (*dispersing and mixing technology, Modell PT2000, Kinematica Inc., Cincinnati, OH, USA*). Хомогенизати се потом центрифугирају (460g; 10 минута). Након тога се одређује:

1. укупна концентрација протеина коришћењем Micro BCATM Pro-tein Assay Kit (*Fa.Pierce, Rockford, IL, USA*) којим се колориметријски мери оптичка густина на 570nm.
2. активност алкалне фосфатазе се процењује након инкубације 50ml узорка са 200ml p-nitrophenyl-phosphate (*100 mg capsule, Sigma 104s Phosphatase Substrate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*) и 50ml дестиловане воде. Конверзија у p-nitrophenol се мери након 30 минута на 405/490nm.
3. остеокалцин ће бити квантификован употребом ELISA кита N-MIDTM Osteocalcin One Step ELISA Kit (*Nordic Bioscience Diagnostics A/S, Herlev, Denmark*) фотометријском реакцијом на 450/650 nm.

ВРСТА СТУДИЈЕ

Експериментална студија

СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА

Величина узорка је израчуната на основу података о вредностима активности алкалне фосфатазе и вредностима остеокалцина публикованих у студијама сличног дизајна. Студијски узорак је израчунат узимајући алфа као 0.05 и снагу студије од 0.8 за Student's t тест (два независна узорка), поредећи групе међу собом (у оба смера), према статистичком програму G*Power3. На основу претпоставке која захтева највећи узорак, односно очекиване најмање разлике у испитиваним параметрима између експерименталних и контролних група (за вредност активности алкалне фосфатазе по mg протеина, SD=65 и SD=52), утврђен је број експерименталних животиња према групама и он износи 23 за сваку од група. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (Student's t тест за два независна узорка или Mann-Whitney тестом) између две групе испитаника, са снагом студије $\geq 80\%$.

СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Подаци ће бити анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 20.

Прво ће се испитати правилност расподеле добијених вредности коришћењем Shapiro-Wilk теста. Уколико вредности буду имале правилну расподелу користићемо параметарске тестове, док ће се неправилна расподела поредити коришћењем непараметарских тестова. Резултати експеримента ће се изражавати као средња вредност \pm стандардна грешка. Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи $p < 0,01$

2.8 Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се ектопично формирање кости у мишева код којих су примењене комбинације било ког, од три испитивана, скафолда са MSC.

Очекује се и да боље ефекте покажу скафолди имбибирани MSC које су претходно биле изложене остеоиндуктивном медијуму.

Такође се очекује да новосинтетисани скафолди покажу исте или веће ефекте на пролиферацију, остеобластну диференцијацију и ћелијску адхезивност у односу на златни стандард.

Значај ове студије се огледа у испитивању потпуно нових и у овом смислу неиспитаних биоматеријала. Такође, у малом броју истраживања је нумерички изражено поређење нивоа активности ензима алкална фосфатаза и остеокалцина након примене биоматеријала и биоматеријала у комбинацији са матичним ћелијама у моделу ектопичног формирања кости.

2.9 Оквирни садржај дисертације

Главни циљ ове студије је испитати утицај: хидроксиапатит полиетилен имин [HA/PEI], хидроксиапатит поли(лактид ко новосинтетисаних биоматеријала гликолид) [HA/PLGA] и комбинације истих са недиференцираним и диференцираним мезенхималним матичним ћелијама на ектопично стварање коштаног ткива код мишева C57Bl/6. Након субкутане апликације HA/PEI и HA/PLGA и комбинације тих новосинтетисаних биоматеријала са недиференцираним и диференцираним мезенхималним матичним ћелијама очекује се стварање коштаног ткива. Анализа новоствореног ткива би била хистолошка, бојење исечака ткива тоулидин плавим и ализарин редом и испитивање на колаген тип 1 и 2. Биохемијска анализа ће се огледати у испитивању активности алкалне фосфатазе и квантификацији нивоа остеокалцина у новоствореном ткиву, као главног неколагеног протеина кости. Потврђивањем претпоставке да новосинтетисани композитни биоматеријали имају већи остеоиндуктивни потенцијал од конвенционално примењиваног BIOSSA и да мезенхималне матичне ћелије које су претходно биле изложене остеогеном медијуму у комбинацији са HA/PLGA даје најбоље резултате у ектопичном формирању коштаног ткива отвара врата креирању нових приступа у терапији великих и малих дефеката коштаног ткива.

2.10 Име потенцијалног ментора

доц. др Татјана Кањевац, доцент за ужу научну област Превентивна и дечја стоматологија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

2.11 Научна област дисертације

Медицина. Ужа научна област: Стоматологија

2.12 Научна област чланова комисије

- 1. проф. др Драгиња Којовић**, редовни професор за ужу научну област Пародонтологија и орална медицина, Медицинског факултета Универзитета у Нишу, председник
- 2. проф. др Александра Лукић**, редовни професор за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, члан
- 3. доц. др Драган Газивода**, доцент за ужу научну област Орална хирургија, Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду, члан

Закључак и предлог комисије

1. На основу досадашњег успеха на докторским студијама и публикованих радова, **др Момир Стевановић** испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.

2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу, где се испитује утицај новосинтетисаних скафолда у комбинацији са мезенхималним матичним ћелијама на ектопично стварање коштаног ткива.

3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза **др Момира Стевановића** бити од великог научног и практичног значаја.

4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата **др Момира Стевановића** под називом „**УТИЦАЈ НОВОСИНТЕТИСАНИХ СКАФОЛДА И МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА НА ЕКТОПИЧНУ ОСТЕОГЕНЕЗУ IN VIVO**” и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

проф. др Драгиња Којовић, редовни професор за ужу научну област Пародонтологија и орална медицина, Медицинског факултета Универзитета у Нишу, председник

проф. др Александра Лукић, редовни професор за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, члан

доц. др Драган Газивода, доцент за ужу научну област Орална хирургија, Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду, члан

У Крагујевцу, 25.07.2015.