



br. 36/10

datum: 21.02.2014.

Na molbu ass dr Jelene Stepić, Etički odbor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na sednici održanoj dana 19.02.2014. godine, daje

S A G L A S N O S T

Dr Jeleni Stepić za sprovođenje istraživanja u okviru izrade doktorske disertacije, pod naslovom:

„ISPITIVANJE UTICAJA RAZLIČITIH KOLAGENIH MEMBRANA NA REGENERACIJU KOSTI KALVARIJE KUNIĆA“

i u druge svrhe se ne može koristiti.

PREDSEDNIK ETIČKOG ODBORA

/prof.dr Ljiljana Janković/

PODACI O MENTORU

Kandidat: dr Jelena Stepić

Ime i prezime mentora: Snježana Čolić

Zvanje: Vanredni profesor, Klinika za oralnu hirurgiju, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Spisak radova koji kvalifikuju mentora za vođenje doktorske disertacije:

1. Jurisic V, Terzic T, Colic S, Jurisic M (2008). The concentration of TNF-a correlate with number of inflammatory cells and degree of vascularization in radicular cysts. *Oral Dis* 2008 Oct; 14(7): 600–05.
2. Marković A, Colić S, Dražić R, Gacić B, Todorović A, Stajčić Z. Resonance frequency analysis as a reliable criterion for early loading of sandblasted/acid-etched active surface implants placed by the osteotome sinus floor elevation technique. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011 Jul- Aug; 26(4):718-24.
3. Marković A, Calasan D, Colić S, Stojčev-Stajčić L, Janjić B, Mišić T. Implant stability in posterior maxilla: bone-condensing versus bone-drilling: a clinical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Nov; 112(5):557-63.
4. Misic T, Markovic A, Todorovic A, Colic S, Miodrag S, Milicic B. An in vitro study of temperature changes in type 4 bone during implant placement: bone condensing versus bone drilling. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Jul; 112(1):28-33.
5. Aleksa Marković, José Luís Calvo-Guirado, Zoran Lazić, Gerardo Gómez-Moreno, Dejan Čalasan, Javier Guardia, Snježana Čolic, Antonio Aguilar-Salvatierra, Bojan Gačić, Rafael Delgado-Ruiz, Bojan Janjić and Tijana Mišić. Evaluation of primary stability of self-tapping and non-self-tapping dental implants. A 12-week clinical study. *Clin Impl Dent Relat Res* June 2013, 15(3): 341–49.
6. Aleksa Marković, Snježana Čolić, Miodrag Šćepanović, Tijana Mišić, Ana Đinić, Dinesh Sharma Bhusal. A 1-Year Prospective Clinical and Radiographic Study of Early-Loaded Bone Level Implants in the Posterior Maxilla. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014 Jan 27. doi:10.1111/cid.12201. [Epub ahead of print]

Dekan fakulteta
Prof.dr Miroslav Vukadinović

Datum _____

m.p.

BIOGRAFIJA

Dr Jelena Stepić je rođena 31.05.1985. godine u Sisku, Republika Hrvatska. Osnovnu školu i gimnaziju „Uroš Predić“ je završila u Pančevu, kao nosilac Vukove diplome. Na Stomatološki fakultet, Univerziteta u Beogradu, upisana je školske 2004/2005 godine i diplomirala je u oktobru 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,69 (devet i 69/100).

Učestvovala je na 48., 49. i 50. kongresu studenata biomedicinskih nauka Srbije sa internacionalnim učešćem, sa ukupno 6 (šest) studentskih radova. Više puta je nagrađivana kao najbolji student za I (prvu), IV (četvrtu) i V (petu) godinu osnovnih studija. Osim toga, studije je završila prva u generaciji i nagrađena je kao II (drugi) po uspehu najbolji diplomirani student. Tokom studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, Fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka Republike Srbije, Zadružbine „Dragoljub Marinković“ i Fonda za mlade talente Vlade Republike Srbije. Pripravnički staž je obavila na klinikama Stomatološkog fakulteta u Beogradu i položila stručni ispit decembra 2010. godine.

Doktorske studije na Stomatološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, upisala je školske 2010/2011 godine, na modulu „Klinička istraživanja zasnovana na bazičnim naukama“ i položila sve ispite sa prosečnom ocenom 9,75 (devet i 75/100). Učesnik je na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Kontrola bola i molekularni mehanizmi kao faktori regenerativne terapije u stomatologiji kod zdravih i pacijenata sa dijabetes melitusom“ (175021).

Originalni naučni rad u časopisu internacionalnog značaja:

Pejović M, Stepić J, Marković A, Dragović M, Miličić B, Čolić S. Retrospective study of spontaneous bone regeneration after decompression of large odontogenic cystic lesions in children. Vojnosanit Pregl : In press.

Originalni naučni rad u časopisu nacionalnog značaja:

Stepić J, Pejović M, Čolić S. Marsupijalizacija juvenilne paradentalne ciste - prikaz slučaja. Stomatološki glasnik Srbije 2011, 58(4): 239-243.

Radovi saopšteni na skupovima:

Pejović M, Stepić J, Dragović M, Magić M, Čolić S. Alveolar zygomatic buttress as a donor site for localized ridge augmentation-case report. 23rd Congress of the European Association for Osseointegration, Rome, Italy, septembar 2014.

Dragović M, Stepić J, Pejović M, Magić M, Čolić S. Effectiveness of decompression followed by enucleation of large cystic lesions in adults. 19th BaSS Congress, Belgrade 2014.

Pejović M, Stepić J, Dragović M, Čolić S. Effectiveness of decompression of large cystic lesions in children. 19th BaSS Congress, Belgrade 2014.

Stepić J, Pejović M. Barijerne membrane – karakteristike i klinička primena. Sastanak Sekcije oralnih hirurga i implantologa Srbije, Arandelovac, Jun 2013.

Stepić J, Pejović M, Čolić S. Konzervativno hirurški pristup u terapiji odontogenog keratocističnog tumora: prikaz slučaja. Deveti simpozijum oralnih hirurga i implantologa Srbije, Beograd, Novembar 2012.

Pejović M, Stepić J, Čolić S. Konzervativni hirurški modaliteti u terapiji viličnih cista kod decesmarsupijalizacija/dekompresija: prikazi slučajeva. Deveti Simpozijum oralnih hirurga i implantologa Srbije, Beograd, Novembar 2012.

Stepić J, Pejović M. Osnovne karakteristike koštanih zamenika – pregled literature. Sastanak Sekcije oralnih hirurga i implantologa Srbije, Srebrno jezero, Jun 2012.

Stepić J, Pejović M, Čolić S. Marsupijalizacija juvenilne paradentalne ciste - prikaz slučaja. Osmi Simpozijum oralnih hirurga i implantologa Srbije, Beograd, Novembar 2011.

Pejović M, Stepić J, Čolić S. Traumatski neurom n.mentalisa – prikaz slučaja. Osmi simpozijum oralnih hirurga i implantologa Srbije, Beograd, Novembar 2011.

PREDMET ISTRAŽIVANJA

Primarna stabilnost endoosealnog implantata predstavlja osnovni preduslov uspešne oseointegracije (1), a može se postići ukoliko ima dovoljno volumena zdrave i vitalne kosti na mestu njegove ugradnje (2). Međutim, procenjuje se da kod oko 50% implantatnih ležista postoji potreba za nadogradnjom kosti, pre ili u toku ugradnje implantata (3). Jedna od najčešće primenjivanih tehnika kojom se obezbeđuje uspešna regeneracija koštanog tkiva je vođena koštana regeneracija (4).

Tehnika vođene koštane regeneracije zasnovana je na upotrebi membrane kao fizičke barijere koja se postavlja preko ivica defekta, čime se stvara pogodna sredina za koštanu regeneraciju (5-6). Na ovaj način se defekt izoluje od prodora brzoproliferišućih ćelija okolnih mekih tkiva, stabilizuje koagulum i omogućava migracija osteoprogenitornih ćelija iz koštanih zidova, njihova diferencijacija u osteoblaste i stvaranje nove kosti (7). Istovremeno, membrana pruža podršku mekim tkivima reznja, sprečavajući njihov kolaps u koštani defekt i sledstveno smanjenje prostora za regeneraciju (7). Efikasnost principa vođene koštane regeneracije potvrđena je u brojnim eksperimentalnim i kliničkim studijama (8), ali predmet stalnog polemisanja predstavlja izbor barijerne membrane.

Zahtevi koji su postavljeni kako bi membrana bila efikasna podrazumevaju biokompatibilnost materijala, integraciju sa okolnim tkivima, odgovarajuću barijernu moć, očuvanje prostora za koštanu regeneraciju i jednostavnu kliničku primenu (9). Iako je upotreba prve generacije barijernih membrana, neresorptivnog ekspaniranog politetrafluoretilena (ePTFE), pokazala veoma uspešnu i predvidljivu koštanu regeneraciju (10-11), hirurška trauma zbog uklanjanja membrane u drugom aktu, a naročito komplikacije koje prate njenu čestu ekspoziciju - bakterijska kontaminacija, infekcija tkiva i kompromitovan ishod regeneracije (12-15), su uslovile razvoj resorptivnih membrana.

Danas se najčešće primenjuju resorptivne membrane na bazi prirodnog kolagena tipa I i III, svinjskog ili goveđeg porekla (16). Prednosti kolagena, nad drugim resorptivnim materijalnim, jesu aktivna uloga u stvaranju koaguluma, adhezija progenitornih ćelija, hemotaksa gingivalnih fibroblasta i fibroblasta periodontalnog ligamenta, stimulacija osteoblasta, kao i slab inflamatorni i imunogeni odgovor, odlična tkivna integracija i jednostavna klinička primena (16). Osim toga, ekspozicija kolagene membrane ne izaziva infekciju okolnih tkiva (14), iako se membrana tada pod dejstvom bakterijskih proteolitičkih

enzima (17) brže resorbuje. Sa druge strane, kolagen ima nezadovoljavajuće mehaničke karakteristike koje dodatno slabe usled resorpcije od strane makrofaga i polimorfonukleara (18), uzrokuju kolabiranje membrane u koštani defekt (19-20) i potrebu za postavljenjem nekog koštanog supstituenta kao podrške (19). Takođe, standardna neumrežena kolagena membrana se resorbuje nepredvidljivo i relativno brzo (21-22), što može da ograniči njenu barijernu moć na manju od optimalne.

Uvođenjem brojnih tehnika za umrežavanje kolagenih vlakana (16) poboljšane su mehaničke karakteristike membrane i otpornost kolagena na resorpciju, čime je omogućena duža podrška osteogene aktivnosti (21-23). Međutim, hemijsko umrežavanje kolagenih vlakana nije dovelo do značajno bolje koštane regeneracije, u odnosu na prirodni kolagen (19, 23-25), jer je zabeleženo da smanjuje tkivnu integraciju i vaskularizaciju membrane (21), dovodi do inflamatorne reakcije na strano telo (21), česte ekspozicije praćene jakom inflamacijom mekih tkiva (23, 26-27) i može da prouzrokuje inhibitorni efekat na kulturi ćelija sličnih osteoblastima (28). Nešto bolji rezultati koštane regeneracije postignuti su umrežavanjem kolagenih vlakana ribozom (29-30), što je verovatno posledica imitiranja procesa prirodnog umrežavanja koji postoji između vlakana kolagena (31).

Perikardijalne membrane odlikuje prirodno umreženi kolageni matriks i višeslojna strukturna građa perikarda (32). Novije studije su pokazale da imaju i bolje mehaničke karakteristike - otpornost na pritisak i istezanje (33), kao i dužu barijernu moć u odnosu na standardnu neumreženu kolagenu membranu (21, 34), što sve može biti od značaja za primenu perikarda u vođenoj koštanoj regeneraciji. Osim toga, perikardijalne membrane zadržavaju pozitivne odlike prirodnog kolagena - ranu vaskularizovanost i odličnu tkivnu integraciju, i dovode do slične (28) ili čak superiornije atezije i proliferacije humanih SaO2 osteoblasta u odnosu na neumreženi kolagen (34). Zahvaljujući kompaktnoj i višeslojnoj strukturi usporena je resorpcija membrane, što bi moglo imati pozitivne efekte na koštanu regeneraciju, naročito kod velikih defekata (34). Tako su, na primer, Thomatis i saradnici (35) zapazili da na animalnom modelu preko kritične veličine mandibule kunića, neresorbovane humana i goveđa perikardijalna membrana ne izazivaju jaku inflamatornu reakciju i dovode do koštane regeneracije histološki komparabilne sa zlatnim standardom ePTFE. Takođe je, i nedavna multicentrična klinička studija pokazala da se goveđa perikardijalna membrana može koristiti za predvidljivu horizontalnu augmentaciju alveolarnog grebena (36). Poslednjih par godina, i perikardijum konjskog porekla se pokazao kao pogodan graft u terapiji rupture aorte

(37-38) i timpanične membrane (39), dok je njegova uspešnost u koštanoj regeneraciji ostala neistražena.

Drugi način da se produži barijerna moć i mehanička stabilnost standardne neumrežene kolagene membrane može se postići tehnikom postavljanja dva sloja membrane preko ivica defekta (40). Pretpostavlja se da dodatni sloj membrane smanjuje mikro pokrete membrane, poboljšava barijernu funkciju, kao i stabilizaciju koštanog grafta (40). Iako je pokazano da dodatni sloj membrane nema uticaja na stepen njene resorpcije, dvoslojna tehnika doprinosi značajno većoj debljini preostale membrane i površini prisutnog kolagena (41). Osim toga, kod ove tehnike je primećena i osifikacija centralnog dela membrane, nezavisna od koštanog stvaranja sa periferije (41). Do sličnog zapažanja došli su Taguchi i saradnici koji smatraju da porozni sloj neumrežene kolagene membrane može služiti kao matrica za urastanje mezenhimalnih ćelija, zarobljavanje osteoinduktivnih faktora i osteoblastnu diferencijaciju (42). Pretpostavlja se, i da značajno povećanje debljine membrane i dužine barijerne moći može dovesti do povećanog prorastanja krvnih sudova i naseljavanje vlakana kolagena osteoprogenitornim ćelijama, što dalje vodi proliferaciji, osteoblastnoj diferencijaciji i osteogenezi (43).

U skorije vreme u upotrebi je dvoslojni kolageni matriks, koji je prvenstveno namenjen za mekotkivnu augmentaciju. Dvoslojni kolageni matriks sačinjen je od kompaktnog i spongioznog sloja, što znači da ima isti sastav i strukturnu građu kao i standardna neumrežena kolagena membrana, ali znatno veću debljinu. Kompaktni sloj kolagenih vlakana je elastičan, gladak i histološki dokazano poseduje barijernu moć (44), dok je spongiozni vrlo porozan, namenjen za prorastanje fibroblasta i tkivnu integraciju. Prednosti kolagenog matriksa nad membranom, od koje se razlikuje prvenstveno u debljini spongioznog sloja, ogledaju se u lakšoj manipulaciji i većoj otpornosti na mastikatorne sile (45). Dosadašnje studije su pokazale da se kolageni matriks odlično integriše u okolna tkiva, izaziva minimalni inflamatorni odgovor i ima uspešnu kliničku primenu u terapiji mukogingivalnih anomalija (44-46). Osim toga, nedavna eksperimentalna studija pokazala je da primena kolagenog matriksa kod hroničnih defekata alveolarnog grebena, ne samo do dovodi do augmentacije mekih tkiva, već podstiče i koštano zarastanje (47). Zbog svega navedenog kolageni matriks mogao bi naći uspešnu primenu i u vođenoj koštanoj regeneraciji.

Poznato je da angiogeneza vremenski i prostorno prethodi osteogenezi (48-49), kao i da najveći broj krvnih sudova i nove kosti potiče iz kostne srži sa zidova defekta (15). Međutim, uočeno je da se nova kost može stvarati i neposredno ispod membrane, nezavisno od

regeneracije koje napreduje sa dna defekta (15). Imajući u vidu da osteoblasti mogu nastati i iz pericita malih krvnih sudova vezivnog tkiva (50), smatra se da je za ovo nezavisno periferno koštano stvaranje odgovorna rana vaskularizacija barijerne membrane (15,51). U literaturi postoje kontradiktorni podaci o vaskularizaciji kolagenih membrana. Dok jedna grupa autora pokazuje brzu i potpunu vaskularizaciju neumrežene kolagene membrane, već u prvim nedeljama po implantaciji (15,34,51), Ghanaati i saradnici u četvrtoj nedelji nalaze tek umerenu vaskularizovanost perifernog dela neumrežene kolagene membrane (44), kao i središnjeg dela poroznog dvoslojnog kolagenog matriksa (52). Isto tako, ni posle 8 nedelja zarastanja, ova grupa autora ne uočava potpunu vaskularizovanost kolagene membrane i matriksa (44,52). Rana potpuna vaskularizacija barijerne membrane mogla bi poboljšati vaskularizaciju koštanog grafta i tako podstaći regeneraciju tkiva (34). Novostvoreni krvni sudovi imaju ključnu ulogu u stvaranju, remodelaciji i regeneraciji kosti (15, 53-54). Naime, pored transporta kiseonika i hranljivih materija, krvni sudovi obezbeđuju transport osteoprogenitornih (54) i endotelijalnih progenitornih ćelija (55) u regiju defekta. Osim toga, endotelne ćelije novoformirane vaskularne mreže sintezom signalinih molekula (citokina, hemokina, prostanoida, adhezivnih molekula i faktora rasta) utiču na procese proliferacije, diferencijacije i funkcije osteoblasta i osteoklasta (55).

Kako je primena različitih barijernih membrana, bez obzira na razlike u vaskularizaciji, pokazala podjednaku koštanu regeneraciju na modelu akutnih defekata, ovaj model nije sasvim pouzdan obzirom da ima veliki potencijal da spontano regeneriše (15). Pogodan model za procenu regenerativnog efekta novih biomaterijala i poređenje uspešnosti koštane regeneracije različitim materijalima predstavlja model defekata kritične veličine (56). Defekti kritične veličine jesu oni defekti koštanog tkiva koji neće regenerisati kada se ostave da zarastaju spontano određen period vremena, odnosno defekti koji zahtevaju vođenu regeneraciju (57). Kalvarija kunića je među najčešćim modelima kritičnih defekata koji se koriste u istraživanjima (58) obzirom da po svojoj strukturnoj građi i slabijoj vaskularizaciji odgovara građi donje vilice čoveka, kao i da nije izložena pritisku i opterećenju (59). Promer kritičnog defekta kalvarije može varirati od 6 do 15 mm, zavisno od perioda koji se ispituje (58), a defekti od 8 milimetara se smatraju kritičnim ukoliko je zarastanje kraće od 12 nedelja (56,58). Defekti ovog promera su naročito pogodni jer omogućavaju formiranje više defekata po jednoj životinji, čime se smanjuje invazivnost, dužina trajanje intervencije i broj životinja, kao i varijacija rezultata unutar jedinki (60).

RADNA HIPOTEZA

Karakteristike različitih kolagenih membrana, struktura, tkivna integracija i dužina barijerne moći, utiču na regeneraciju koštanog tkiva. Rana vaskularizacija membrane doprinosi većem stepenu revaskularizacije grafta i uspešnijoj regeneraciji defekata kritične veličine.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Poređenje inflamatornog odgovora sa određivanjem gigantocelularne reakcije kod primene različitih kolagenih membrana u procesu regeneracije koštanog tkiva;
2. Ispitivanje stepena neoangiogeneze kod primene različitih kolagenih membrana u procesu regeneracije koštanog tkiva;
3. Kvalitativna i kvantitativna analiza morfoloških obeležja koštane regeneracije kod primene različitih kolagenih membrane;
4. Gradiranje stepena regeneracije pri primeni različitih kolagenih membrana.

OPRAVDANOST ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu da je na tržištu prisutan veliki broj različitih barijernih membrana, za koje nema dovoljno podataka u literaturi koje bi opravdale njihovu uspešnu primenu, a da se izbor membrane prepušta kliničaru, ovo istraživanje bi trebalo da pokaže u kako membrane utiču na ranu revaskularizaciju grafta i koštanu regeneraciju zahtevnih defekata, i time olakšaju dileme oko izbora barijerne membrane u kliničkoj praksi.

MATERIJAL I METOD

Kontrolisano istraživanje na eksperimentalnim životinjama biće sprovedeno na Klinici za hirurgiju Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu. U istraživanje će biti uključeno 10 novozelandskih belih kunića, muškog pola, starosti od 6 do 8 meseci i telesne težine od 3,5 do 5 kilograma. Eksperimentalne životinje će biti uzgajane u kontrolisanim laboratorijskim uslovima uzgajivačnice Vojnomedicinske akademije u Beogradu, u skladu sa

domaćim i međunarodnim standardima (ISO 10993-2: 2006, Part 2: Animal welfare requirements, Vodič Nacionalnog Instituta za zdravlje, za brigu i korišćenje laboratorijskih životinja). Tokom trajanja eksperimenta svaka životinja će biti smeštena u posebnom kavezu, u stacionaru Klinike za hirurgiju, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, gde će imati stalni nadzor, kontrolisanu ishanu (Veterinarski zavod Subotica, Srbija) i dnevnu profesionalnu negu. Na kalvarijama svih eksperimentalnih životinja, na isti način, će biti napravljena četiri defekta kritične veličine, u koje će biti implantirani deproteinizovani goveđi koštani zamenik (Bio-oss, Geistlich AG, Switzerland) prekriven sa po jednom barijernom membranom - perikardijalnom membranom konjskog porekla (Heart, Bioteck, Italy), dvoslojnim kolagenim matriksom (Mucograft, Geistlich AG, Switzerland) i neumreženom kolagenom membranom (Bio-Gide, Geistlich AG, Switzerland) ili ostavljen bez membrane za negativnu kontrolu. Kod prve eksperimentalne životinje membrane će biti postavljane po principu slučajnog uzorka u smeru kazaljke na satu, i taj redosled biće poštovan kod svih eksperimentalnih životinja.

Hirurška procedura

Hirurška intervencija će biti izvedena u opštoj anesteziji, po protokolu za eksperimentalne kunice, primenom 15 mg/kg zoletila i.m. i 5 mg/kg ksilazina i.m. Neposredno nakon aplikovanja opšteg anestetika, koža glave kunića će biti obrijana i denzinfikovana rastvorom povidon joda. Incizija će biti učinjena sredinom lobanje, od frontalne do okcipitalne kosti, a koža i periost odignuti kako bi se pristupilo kostima kalvarije. Sa obe strane kalvarije, ispred i iza frontoparietalne suture, biće napravljena po dva kružna bikortikalna defekta pomera 8 milimetara. Defekti će prvo biti markirani trepan borerom spoljnjeg prečnika od 8 mm, a zatim preparisani okruglim dijamantskim borerom, uz konstantno i obilno hlađenje fiziološkim rastvorom (Natrii Chloridi Infundibile, rastvor za infuziju, Zdravlje A.D.Leskovac). Tokom preparacija defekata posebno će se voditi računa da se ne povredi tvrda moždanića.

Nakon završene preparacije defekti će prvo biti dobro isprani fiziološkim rastvorom, a zatim do vrha popunjavani sa deproteinizovanim goveđim koštanim zamenikom (Bio-oss, Geistlich AG, Switzerland). Tako popunjeni koštani defekti će potom biti redom prekriveni sa perikardijalnom membranom konjskog porekla (Heart, Bioteck, Italy), dvoslojnim kolagenim matriksom (Mucograft, Geistlich AG, Switzerland) i neumreženom kolagenom membranom (Bio-Gide, Geistlich AG, Switzerland), dok će jedan defekt biti ostavljen bez membrane za negativnu kontrolu. Sve membrane će biti kvadratnog oblika i za 2 mm šire od prečnika

defekta. Stabilan položaj barijernih membrana biće obezbeđen ušivanjem periosta horizontalnim madrac šavovima. Nakon ušivanja periosta koža biti vraćena na mesto i ušivena pojedinačnim šavovima. Postoperativno kunićima će biti ordinirana analgetska (Butrofanol 0,1 mg/kg s.c.) i antibiotska terapija (Amoksicilin sa klavulonskom kiselinom 125 mg/kg s.c.) prva tri dana. Životinje će biti smeštene u individualne kaveze, uz svakodnevni nadzor i kontrolisanu ishranu, sve do završetka eksperimenta.

Posle perioda ispitivanja od 2 i 4 nedelje po 5 eksperimentalnih kunića biće humano žrtvovano, intravenskom injekcijom 10ml rastvora Pentobarbitola od 100mg/kg. Neposredno po žrtvovanju kosti kalvarije će biti ispreparisane, isprane fiziološkim rastvorom i potopljene u 10% formalin. Reprezentativni uzorci koštanog tkiva kalvarije, koji makroskopski odgovaraju eksperimentalnim defektima, biće dalje pripremani za histološku, histomorfometrijsku i imunohistohemijsku analizu optičkom mikroskopijom (mikroskopski aparat Olympus 5).

Histološko ocenjivanje

Sve analize biološkog materijala biće vršene na Institutu za patologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Uzorci će prvo biti dekalcifikovani primenom jakih kiselina- „metod brze dekalcinacije“. Nakon potpune dekalcinacije, procenjene subjektivnom metodom, iskustveno, uzorci će biti fiksirani u Aparatu za automatsku fiksaciju Leica 1300 sa softverskom kontrolom kvaliteta. Fiksirani uzorci će biti ukalupljeni u parafinske blokove i sečeni u 10 serijskih tkivnih preseka, debljine 4µm. Za osnovnu vizuelizaciju biće primenjeno standardno hematoksilin-eozin (HE) bojenje, dok će se od histohemijskih metoda koristiti trihromna bojenja: Masson trihromno i Azzan trihromno. Osim trihromnih bojenja za procenu mineralizacije primeniće se i bojenje von Kossa.

I. Procena bezbednosti primene membrana

Bezbednost primene ispitivanih barijernih membrana biće analizirana optičkom mikroskopijom, na 4 različita uveličanja (10x, 20x, 100x, 400x). Analiza će obuhvatati semikvantitativnu procenu lokalne tolerancije okolnog tkiva prema međunarodnim standardima (*ISO 10993-6: 2007, Part 6: Tests for local effects after implantation*). Parametri koji će se određivati semikvantitativno, na polju velikog uveličanja 400x (HPM), jesu :

1. intenzitet inflamatorne reakcije (0-odsutan, 1-blag, 2-srednji , 3- izražen, 4-veoma izražen),

2. prisustvo džinovskih ćelija tipa oko stranog tela (0-odsutne, 1do3 -blago, 4-6 umereno, 7 i više- intenzivno)
3. intenzitet nekroze (0- odsutna, manje od 10% lakostepena, 11-20% umerena, više od 21% intenzivna)
4. intenzitet fibroze (0- odsutna, manje od 20% lakostepena, 21-40% umerena, više od 41% intenzivna)
5. intenzitet koštane metaplazije (0- odsutna, manje od 10% lakostepena, 11-20% umerena, više od 21% intenzivna)

Kvalitativno će biti određivano prisustvo granula koštanog supstituenta (0- nisu prisutne, 1- prisutne su) .

II. Procena specifičnosti neoangiogeneze

Specifičnosti neoangiogeneze biće procenjivana u celokupnoj regiji koštanog defekta, kao i zasebno u regiji neposredno ispod barijerne membrane histološkom, histomorfometrijskom i imunohistohemijskom analizom. Pored standardnog HE bojenja za procenu prisustva i karakteristika postignute neoangiogeneze korišće se histohemijska bojenja za vizuelizaciju mišićnih i elastičnih vlakana (Masson trihromno i elastica Van Gieson). Osim toga, endotel novostvorenih krvnih sudova biće markiran primenom komercijalnih antitela (At) : CD31, FVIII, a za obeležavanje zida krvnog suda će se koristiti α -SMA. Sva navedena primarna At aplikovaće se na reprezentativne uzorke, uz standardnu streptavidin-biotin tehniku, sa LSAB vizuelizacionim sistemom i hromogenom.

Rezultati primenjene imunohistohemijske analize biće određivani semikvantitativno, uz spoljašnju kontrolu tkiva benignog vaskularnog tumora tipa hemangioma. Kao pozitivna interpretiraće se aktivnost u citoplazmi, a određivaće se intenzitet i rasprostranjenost pozitivnosti, kao i njihova kombinacija:

A. Intenzitet pozitivnosti

1. 0- nema pozitivnosti
2. 1+ slab intenzitet pozitivnosti
3. 2+ umeren intenzitet pozitivnosti
4. 3+ jak intenzitet pozitivnosti

B. rasprostranjenost pozitivnosti

1. pojedinačne ćelije (< 1% ćelija)
2. fokalna pozitivnost (1-30% ćelija)
3. difuzna pozitivnost (>31%ćelija)

III.Procena uspešnosti koštane regeneracije

Efikasnost koštane regeneracije biće analizirana histološki i histomorfometrijski. Optičkom mikroskopijom biće kvalitativno ocenjivano prisustvo novostvorene kosti, fibroznog tkiva, kao i tkivna integracija i degradacija membrane. Histomorfometrijskom analizom, uz primenu programa za morfometriju (Software “ Cell-B” by Olympus), biće izdvojena regija defekta sa njenim granicama, u kojoj će se meriti procentualna zastupljenost novostvorene kosti, kostne srži, fibroznog tkiva, partikula postavljenog koštanog supstituenta, kao i debljina barijerne membrane, ukoliko nije prethodno potpuno resorbovana.

Statistička obrada

Svi dobijeni podaci u okviru istraživanja biće izraženi kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija i obrađeni adekvatnim statističkim testovima

LITERATURA

1. Lioubavina-Hack N, Lang NP, Karring T. Significance of primary stability for osseointegration of dental implants. *Clin. Oral Impl. Res.* 2006;17: 244–50.
2. Lekholm U, Zarb GA. Patient selection and preparation. In: Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T, eds. *Tissue-Integrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry* 1st ed, Chicago: Quintessence, 1985: 199–210.
3. Bosshardt DD, Schrenk KR. Biologic Basis of Bone Regeneration. In :Buser D, ed: *20 Years of Guided Bone Regeneration in Implant Denistry*, 2009; 2nd ed; Chicago: Quintessence 2009: 15- 45.
4. McAllister BS, Haghighat K. Bone augmentation techniques. *J Periodontol* 2007;78: 377–96.
5. Dahlin, C, Sennerby L, Lekholm U, Linde A, Nyman S. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1989; 4: 19–25.
6. Nyman S, Lang NP, Buser D, Bragger U. Bone regeneration adjacent to titanium dental implants using guided tissue regeneration: areport of two cases. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990;5:9-14.
7. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994; 9: 13–29.
8. Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin. Oral Impl. Res.* 2010; 21:567–76.
9. Scantlebury T. 1982-1992: a decade of technology development for guided tissue regeneration. *J Periodontol* 1993; 64: 1129–37.
10. Buser D, Dula K, Hirt HP, Schenk RK. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1996;54: 420–32.
11. Nevins M, Mellonig JT. The advantages of localized ridge augmentation prior to implant placement: a staged event. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1994; 14: 96-111.
12. Simion M, Baldoni M, Rossi P, Zaffe D. A comparative study of the effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1994;14:166-80.
13. Machtei EE. The effect of membrane exposure on the outcome of regenerative procedures in humans: a meta-analysis. *J Periodontol* 2001; 72:512-6.
14. Zitzmann, NU, Naef R, Scharer P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997; 12: 844–52.
15. Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Sager D, Ferrari D,Becker J. Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at dehiscence-type defect using different barrier membranes. An experimental study in dogs. *Clin Oral Impl. Res.* 2008; 19: 402–15.
16. Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *J Periodontol* 2001; 72: 215–29.

17. Sela MN, Kohavi D, Krausz E, Steinberg D, Rosen G. (2003) Enzymatic degradation of collagen-guided tissue regeneration membranes by periodontal bacteria. *Clin Oral Impl. Res.* 2003; 14 : 263–8.
18. Zhao S, Pinholt EM, Madsen JE, Donath K. Histological evaluation of different biodegradable and non-biodegradable membranes implanted subcutaneously in rats. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery* 2000; 28: 116–22.
19. Strietzel FP, Khongkhunthian P, Khattiya R, Patchanee P, Reichart PA. Healing pattern of bone defects covered by different membrane types: a histologic study in the porcine mandible. *J Biomed Mater Res B Appl Bio-mater* 2006;78: 35–46.
20. Dupoirieux L, Pourquier D, Picot MC, Neves M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001;30: 58-62.
21. Rothamel D, Schwarz F, Sager M, Herten M, Sculean A, Becker J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clin. Oral Impl. Res.* 2005; 16: 369–78.
22. Moses O, Vitrial D, Aboodi G, Sculean A, Tal H, Kozlovsky A, Artzi Z, Weinreb M, Nemcovsky CE. Biodegradation of three different collagen membranes in the rat calvarium: a comparative study. *J Periodontol* 2008; 79: 905–11.
23. Bornstein MM, Bosshardt D, Buser D. Effect of two different bioabsorbable collagen membranes on guided bone regeneration: a comparative histomorphometric study in the dog mandible. *J Periodontol* 2007; 78: 1943–53.
24. Bornstein MM, Heynen G, Bosshardt D, Buser D. Effect of two bioabsorbable barrier membranes on bone regeneration of standardized defects in calvarial bone: A comparative histomorphometric study in pigs. *J Periodontol* 2009; 80:1289-99.
25. Shin SI, Herr Z, Kwon ZH, Chung JH. Effect of a collagen membrane combined with a porous titanium membrane on exophytic new bone formation in a rabbit calvarial model. *J Periodontol* 2013; 84: 110-16.
26. Becker J, Al-Nawas B, Klein MO, Schliephake H, Terheyden H, Schwarz F. Use of a new cross-linked collagen membrane for the treatment of dehiscence-type defects at titanium implants. A prospective randomized controlled double-blinded clinical multicenter study. *Clin. Oral Impl. Res.* 2009; 20: 742–9.
27. Annen BM, Rame CF, Hammerle CH, Jung RE. Use of a new cross-linked collagen membrane for the treatment of peri-implant dehiscence defects: a randomised controlled double- blinded clinical trial. *European Journal of Oral Implantology* 2011; 4: 87–100.
28. Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Herten M, Scherbaum W, Becker J. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblastlike cells. *Clin. Oral Impl. Res* 2004; 15: 443–9.
29. Friedmann A, StrietzelFP, Maretzki B, Pitaru S, Bernimoulin JP. Histological assessment of augmented jaw bone utilizing a new collagen barrier membrane compared to a standard barrier membrane to protect a granular bone substitute material. *Clin. Oral Impl. Res.* 2002; 13: 587–94.
30. Friedmann A, Gissel K, Soudan M, Kleber BM, Pitaru S, Dietrich T. Randomized controlled trial on lateral augmentation using two collagen membranes: Morphometric results on mineralized tissue compound. *Journal of Clinical Periodontology* 2011;38:677-85.
31. Zubery Y, Goldlust A, Alves A, Nir E. Ossification of a novel cross-linked porcine collagen barrier in guided bone regeneration in dogs. *Journal of Periodontology* 2007; 78: 112–21.

32. Hitti RA, Kerns DG. Guided Bone Regeneration in the Oral Cavity: A Review, *The Open Pathology Journal*, 2011; 5: 33-45.
33. Zhang J., Wang GY, Xiao YP, Fan LY, and Wang Q. The biomechanical behavior and host response to porcine-derived small intestine submucosa, pericardium and dermal matrix acellular grafts in a rat abdominal defect model,” *Biomaterials*, 2011; 32: 7086–95.
34. Rothamel D, Schwarz F, Fienitz T, Smeets R, Dreiseidler T, Ritter L, Happe A, Zöller J. Biocompatibility and biodegradation of a native porcine pericardium membrane: results of in vitro and in vivo examinations. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2012; 27:146-54.
35. Thomaidis V, Kazakos K, Lyras D et al. Comparative study of 5 different membranes for guided bone regeneration of rabbit mandibular defects beyond critical size. *Med Sci Monit* 2008; 14: 67–73.
36. Sterio TW, Katancik JA , Blanchard SB, Xenoudi P, Mealey BL. A Prospective, Multicenter Study of Bovine Pericardium Membrane with Cancellous Particulate Allograft for Localized Alveolar Ridge Augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2013; 33:499–507.
37. Yamamoto H, Yamamoto F, Ishibashi K, et al: In situ replacement with equine pericardial roll grafts for ruptured infected aneurysms of the abdominal aorta. *J Vasc Surg* 2009, 49:1041–5.
38. Kubota H, Endo H, Noma M, Tsuchiya H, Akihiro Yoshimoto A, Matsukura M, Takahashi Y, Inaba Y and Sudo K. Equine pericardial roll graft replacement of infected pseudoaneurysm of the aortic arch. *Journal of Cardiothoracic Surgery* 2012, 7:45-9.
39. Albera R, Dagna F, Lacilla M, and Canale A. Equine Versus Bovine Pericardium in Transmeatal Underlay Myringoplasty. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology* 118 :287-291.
40. von Arx T, Buser D. Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: a clinical study with 42 patients. *Clin. Oral Impl. Res.* 2006; 17: 359–66.
41. Kozlovsky A, Aboodi G, Moses O, Tal H, Artzi Z, Weinreb M, et al. Biodegradation of a resorbable collagen membrane (Bio-Gide) applied in a double-layer technique in rats. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20:1116–23.
42. Taguchi Y, Amizuka N, Nakadate M, Ohnishi H, Fujii N, Oda K, et al. A histological evaluation for guided bone regeneration induced by a collagenous membrane. *Biomaterials* 2005;26: 6158–66.
43. Tal H, Moses O, Kozlovsky A and Nemcovsky C .Bioresorbable Collagen Membranes for Guided Bone Regeneration. In: Tal H, ed. *Bone Regeneration*, Shanghai: InTech, 2012: 112-38.
44. Ghanaati S, Schlee M, Webber MJ, Willershausen I, Barbeck M, Balic E, et al. Evaluation of the tissue reaction to a new bilayered collagen matrix in vivo and its translation to the clinic. *Biomed Mater* 2011, 6:015010.
45. Herford AS, Akin L, Cicciu M, Maiorana C, Boyne PJ. Use of a porcine collagen matrix as an alternative to autogenous tissue for grafting oral soft tissue defects. *J Oral Maxillofac Surg* 2010, 68: 1463–70.
46. Rocchietta I, Schupbach P, Ghezzi C, Meschiera M, Simion M. Soft tissue integration of a porcine collagen membrane: An experimental study in pigs. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2012, 32: e34–e40.
47. Thoma DS, Hammerle CHF, Cochran DL, Jones AA, Gorlach C, Uebersax L, Mathes S, Graf-Hausner U, Jung RE. Soft tissue volume augmentation by the use of collagen-

based matrices in the dog mandible – a histological analysis. *J Clin Peridontol* 2011; 38: 1063–70.

48. Schmid, J., Wallkamm, B., Hammerle, C.H., Gogolewski, S. & Lang, N.P. The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. A case report of a rabbit experiment. *Clinical Oral Implants Research* 1997, 8: 244–8.
49. Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 2003;8: 980-9.
50. Reilly TM, Seldes R, Luchetti W, Brighton CT. Similarities in the phenotypic expression of pericytes and bone cells. *Clin Orthopedics* 1998;346:95-103.
51. Schwarz, F., Rothamel, D., Hertel, M., Sager, M. & Becker, J. Angiogenesis pattern of native and cross-linked collagen membranes: an immunohistochemical study in the rat. *Clinical Oral Implants Research* 2006, 17: 403– 9.
52. Ghanaati S. Non-cross-linked porcine-based collagen I-III membranes do not require high vascularization rates for their integration within the implantation bed: a paradigm shift. *Acta Biomater* 2012, 8: 3061-72.
53. Schipani E, Maes C, Carmeliet G, Semenza GL. Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF. *J Bone Mineral Res* 2009;24:1347-53.
54. Barou O, Mekraldi S, Vico V, Boivin G, Alexandre C, Lafage-Proust MH. Relationships between trabecular bone remodeling and bone vascularization: A quantitative study. *Bone* 2002; 30:604-12.
55. Brandi ML, Collin-Osdoby P. Vascular biology and the skeleton. *J Bone Miner Res* 2006; 21(2):183-92.
56. Borie E, Fuentes R, del Sol M, Oporto G, Engelke W. The influence of FDBA and autogenous bone particles on regeneration of calvarial defects in the rabbit: a pilot study. *Ann Anat* 2011;193:412-7.
57. Cooper, G., Mooney, M., Gosain, A., Campbell, P., Losee, J. & Huard, J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2010, 125: 1685–92.
58. Delgado-Ruiz RA, Calvo-Guirado JL, Romanos GE. Critical size defects for bone regeneration experiments in rabbit calvariae: systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clin. Oral Impl. Res.* 00, 2014; 1–16.
59. Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg* 1980;38: 176-80.
60. Sohn JY, Park JC, Um YJ, Jung UW, Kim CS, Cho KS, Choi SH. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. *J Periodontol Implant Sci* 2010;40: 180-7.

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU STOMATOLOŠKOG FAKULTETA UNIVERZITETA
U BEOGRADU**

Na V redovnoj sednici u školskoj 2013/2014. godini, Nastavno-naučno veće Stomatološkog fakulteta u Beogradu je 26.06.2014. godine imenovalo komisiju u sastavu:

1. Prof. dr Snježana Čolić, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. Doc. dr Božidar Brković, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. Doc. dr Jelena Sopta, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

za ocenu podobnosti prijavljene teme doktorske disertacije pod nazivom **ISPITIVANJE
UTICAJA RAZLIČITIH KOLAGENIH MEMBRANA NA REGENERACIJU KOSTI
KALVARIJE KUNIĆA**

Kandidat: dr Jelena Stepić

Mentor: Prof. dr Snježana Čolić

Imenovana komisija je proučila obrazloženje predložene teme doktorske disertacije i podnosi Nastavno-naučnom veću Stomatološkog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ O OCENI PREDLOGA TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

A. Biografski podaci o kandidatu

Dr Jelena Stepić je rođena 31.05.1985. godine u Sisku (Republika Hrvatska). Osnovnu školu i gimnaziju je završila u Pančevu, kao nosilac Vukove diplome. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2004/2005 godine, a diplomirala je prva u generaciji oktobra 2009. godine, kao drugi po uspehu najbolji student sa prosečnom ocenom 9,69 (devet i 69/100). Tokom osnovnih studija učestvovala je na 48., 49. i 50. kongresu studenata biomedicinskih nauka Srbije sa internacionalnim učešćem i nagrađivana je kao najbolji student za I (prvu), IV (četvrtu) i V

(petu) godinu osnovnih studija. Tokom školovanja bila je stipendista Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije, Fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka, Zadužbine „Dragoljub Marinković“ i Fonda za mlade talente Vlade Republike Srbije. Pripravnički staž je obavila na klinikama Stomatološkog fakulteta u Beogradu i decembra 2010.godine položila stručni ispit.

Doktorske studije na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2010/2011 godine, na modulu „Klinička istraživanja zasnovana na bazičnim naukama“ i položila sve ispite sa prosečnom ocenom 9,75 (devet i 75/100). Učesnik je na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Kontrola bola i molekularni mehanizmi kao faktori regenerativne terapije u stomatologiji kod zdravih i pacijenata sa dijabetes melitusom“ (175021).

B. Objavljeni naučni radovi i saopštenja

Rad u časopisu nacionalnog značaja:

Stepić J, Pejović M, Čolić S. Marsupijalizacija juvenilne paradentalne ciste – prikaz slučaja. Stomatološki glasnik Srbije 2011, 58(4): 239-243.

Saopšteni radovi na međunarodnim skupovima:

Pejovic M, Stepić J, Dragović M, Magić M, Čolić S. Alveolar zygomatic buttress as a donor site for localized ridge augmentation-case report. 23rd Congress of the European Association for Osseointegration, Rome, Italy, septembar 2014.

Pejovic M, Stepić J, Dragović M, Čolić S. Effectiveness of decompression of large cystic lesions in children. 19th Congress of the Balkan Stomatological Society, Serbia, Belgrade, april 2014.

Dragović M, Stepić J, Pejovic M, Magić M, Čolić S. Effectiveness of decompression followed by enucleation of large cystic lesions in adults. 19th Congress of the Balkan Stomatological Society, Serbia, Belgrade, april 2014.

Saopšteni radovi na domaćim skupovima:

Stepić J, Pejović M. Barijerne membrane – karakteristike i klinička primena. Sastanak Sekcije oralnih hirurga i implantologa Srbije, Aranđelovac, jun 2013.

Stepić J, Pejović M, Čolić S. Konzervativno hirurški pristup u terapiji odontogenog keratocističnog tumora: prikaz slučaja. Deveti simpozijum oralnih hirurga i implantologa Srbije, Beograd, novembar 2012.

Pejović M, Stepić J, Čolić S. Konzervativni hirurški modaliteti u terapiji viličnih cista kod decesa-marsupijalizacija/dekompresija: prikazi slučajeva. Deveti Simpozijum oralnih hirurga i implantologa Srbije, Beograd, novembar 2012.

Stepić J, Pejović M. Osnovne karakteristike koštanih zamenika – pregled literature. Sastanak Sekcije oralnih hirurga i implantologa Srbije, Srebrno jezero, jun 2012.

Stepić J, Pejović M, Čolić S. Marsupijalizacija juvenilne paradentalne ciste – prikaz slučaja. Osmi Simpozijum oralnih hirurga i implantologa Srbije, Beograd, novembar 2011.

Pejović M, Stepić J, Čolić S. Traumatski neurom n.mentalisa – prikaz slučaja. Osmi simpozijum oralnih hirurga i implantologa Srbije, Beograd, novembar 2011.

C. Obrazloženje teme

1. Naučna oblast- Stomatološke nauke- Oralna hirurgija

2. Predmet rada– Predložena disertacija dr Jelene Stepić za predmet rada ima uticaj različitih kolagenih membrana na ranu neoangiogenezu i stepen koštane regeneracije na modelu defekta kritične veličine kalvarije kunića.

3. Naučni ciljevi istraživanja- Ciljevi predložene disertacije jesu: (1) Poređenje inflamatornog odgovora sa određivanjem gigantocelularne reakcije kod primene različitih kolagenih membrana u procesu regeneracije koštanog tkiva; (2) Ispitivanje stepena neoangiogeneze kod primene različitih kolagenih membrana u procesu regeneracije koštanog tkiva; (3) Kvalitativna i kvantitativna analiza morfoloških obeležja koštane regeneracije kod primene različitih kolagenih membrana i (4) Gradiranje stepena regeneracije pri primeni različitih kolagenih membrana.

4. Metode istraživanja- Planirano je da se kontrolisano istraživanje na eksperimentalnim životinjama sprovede na Klinici za hirurgiju Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu. U istraživanje bi bilo uključeno 10 skeletno zrelih novozelandskih belih kunića muškog pola na čijim kalavarijama bi se pravilo po 4 defekta kritične veličine prečnika 8 milimetara. Svaki defekt bi prvo bio popunjen sa deproteinizovanim goveđim koštanim zamenikom (Bio-oss®, Geistlich AG, Switzerland) preko kojeg bi bila postavljena neka od tri ispitivane kolagene membrane: (1) perikardijalna membrana konjskog porekla (Heart®, Bioteck, Italy); (2) dvoslojni kolageni matriks (Mucograft®, Geistlich AG, Switzerland); ili (3) standardna neumrežena kolagena membrana (Bio-Gide®, Geistlich AG, Switzerland); dok bi četvrti defekt služio kao kontrolni, bez uticaja barijerne membrane. Kod prve eksperimentalne životinje membrane bi bile postavljane po principu slučajnog uzorka u smeru kazaljke na satu, i taj redosled postavljanja bi bio istovetan kod svih životinja. Posle perioda ispitivanja od 2 i 4 nedelje, planirano je da bude žrtvovano po 5 nasumično odabranih eksperimentalnih kunića. Analizom uzoraka koštanog tkiva, koji makroskopski odgovaraju eksperimentalnim defektima, biće procenjena bezbednost primene barijernih membrana, specifičnost rane neoangiogeneze i stepen koštane regeneracije.

Bezbednost primene barijernih membrana biće analizirana optičkom mikroskopijom i obuhvataće semikvantitativnu procenu lokalne tolerancije okolnog tkiva prema međunarodnim standardima (*ISO 10993-6: 2007, Part 6: Tests for local effects after implantation*) kojom će se određivati intenzitet inflamatorne reakcije, prisustvo džinovskih ćelija tipa oko stranog tela, intenzitet nekroze, intenzitet fibroze i intenzitet koštane metaplazije.

Specifičnosti neoangiogeneze biće procenjena histološkom, histomorfometrijskom i imunohistohemijskom analizom. Pored standardnog hematoksilin-eozin (HE) bojenja za procenu

prisustva i karakteristika postignute neoangiogeneze korišće se histohemijska bojenja za vizuelizaciju mišićnih i elastičnih vlakana (Masson trihromno i elastica Van Gieson). Osim toga, endotel novostvorenih krvnih sudova biće markiran primenom komercijalnih antitela (At) : CD31 i FVIII, a za obeležavanje zida krvnog suda će se koristiti α -SMA. Sva navedena primarna At aplikovaće se na reprezentativne uzorke, uz standardnu streptavidin-biotin tehniku, sa LSAB vizuelizacionim sistemom i hromogenom. Rezultati primenjene imunohistohemijske analize biće određivani semikvantitativno, uz spoljašnju kontrolu tkiva benignog vaskularnog tumora tipa hemangioma. Kao pozitivna interpretiraće se aktivnost u citoplazmi, a određivaće se intenzitet i rasprostranjenost pozitivnosti i njihova kombinacija.

Stepen koštane regeneracije biće ispitivana histološkim i histomorfometrijskim metodama. Standardno će biti primenjeno HE bojenje za osnovnu vizuelizaciju. Od histohemijskih bojenja korišće se trihromna bojenja: Masson trihromno, Azzan trihromno, u cilju verifikacije prisustva vezivnog tkiva, dok će se za procenu mineralizacije pored trihromnih koristiti i von Kossa bojenje. Optičkom mikroskopijom biće kvalitativno ocenjivano prisustvo i struktura novostvorene kosti dok će se histomorfometrijskom analizom, uz primenu programa za morfometriju (Software "Cell-B" by Olympus), procenjivati procentualna zastupljenost novostvorene kosti, kostne srži, fibroznog tkiva, partikula postavljenog koštanog supstituenta, kao i debljina preostale barijerne membrane.

5. Aktuelnost problematike u svetu- Savremena regenerativna terapija u oralnoj i maksilofacijalnoj hirurgiji usredsređena je na primenu prirodnih i sintetskih materijala kojima se podstiče složen fiziološki proces koštane regeneracije (Aghalo, 2007; Retzepi, 2010). Iako je dokazano da primena barijernih membrana omogućava nesmetano odvijanje procesa osteogeneze time što sprečava migraciju brzoproliferišućih neosteogenih ćelija (Schrenk, 1994), u kliničkim uslovima ova tehnika ne rezultira uvek predvidljivom koštanom regeneracijom (Becker, 2009). Današnja istraživanja su usmerena na resorptivne materijale, posebno prirodni kolagen tipa I i III kojem je najveća zamerka nepredvidljiva dužina barijerne moći. Sa tim u vezi razvijene su brojne tehnike umrežavanja kolagenih vlakana, koje iako obezbeđuju dužu barijernu moć ona ne znači obavezno i veći stepen koštane regeneracije, verovatno usled uticaja jake inflamatorne reakcije i slabijeg integrisanja membrane u okolna tkiva (Rothamel, 2005; Becker, 2009; Shin, 2013). I dalje postoje nedoumice kako faktori poput sastava barijerne membrane, njene strukture,

morfologije, poroznosti, sposobnosti adherencije i dužine barijerne moći utiču na ishod regeneracije (Bornstein, 2007; Calvo-Guirado, 2014). Osim toga, znajući da angiogeneza zauzima značajno mesto u koštanoj regeneraciji, jer vremenski i prostorno prethodi osteogenezi (Schmid, 1997; Carano, 2003), važno je istražiti uticaj membrane na neoangiogenezu u procesu koštane regeneracije obzirom da su rezultati dosadašnjih istraživanja suprotstavljeni. Schwarz i saradnici su pokazali da su standardne neumrežene kolagene membrane potpuno vaskularizovane već u drugoj nedelji po postavljanju u tkiva, kao i da se u regiji neposredno ispod membrane zapaža koštano stvaranje nezavisno od regeneracije koja napreduje sa dna koštanog defekta (Schwarz, 2008). Pretpostavka ove grupe autora jeste da bi rana vaskularizovanost membrane mogla da poboljša vaskularizaciju grafta i time pozitivno utiče na koštanu regeneraciju (Rothamel, 2012). Nasuprot tome, rezultati Ghanaatia i saradnika pokazuju da je standardna neumrežena kolagena membrana samo delimično i periferno vaskularizovana, a da poseduje stabilan barijerni efekat tokom perioda ispitivanja od 8 nedelja (Ghanaati, 2012). Takođe, autori ističu da rana potpuna vaskularizovanost nastaje kod materijala koji izazivaju jaku inflamatornu reakciju, što doprinosi brznoj degradaciji membrane i može negativno uticati na upeh terapije. Osim toga, pokazano je primena standardne neumrežene kolagene membrane podstiče značajniju revaskularizaciju autolognog blok grafta tek nakon 12. nedelje, što utiče na smanjenje resorpcije i povećanje stabilnosti grafta (Koerdt, 2013, 2014). Kako se još uvek traga za idealnom membranom i na tržištu postoji veliki broj različitih membrana bez dobro kontrolisanih studija za primenu mnogih, rezultati ovog istraživanja trebalo bi da pokažu koje karakteristike kolagenih membrana najviše utiču na stepen koštane regeneracije i time olakšaju dileme oko izbora barijerne membrane u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

Na osnovu postavljenog naučnog problema i njegovog obrazloženja komisija smatra da je tema **ISPITIVANJE UTICAJA RAZLIČITIH KOLAGENIH MEMBRANA NA REGENERACIJU KOSTI KALVARIJ E KUNIĆA** značajna, savremena i podobna za izradu doktorske disertacije jer ispunjava uslove za originalan naučni doprinos u istraživanjima koja se odnose na regeneraciju koštanog tkiva u oralnoj i maksilofacijalnoj hirurgiji. Komisija predlaže odgovarajuću izmenu naslova koji bi glasio **UTICAJ RAZLIČITIH KOLAGENIH MEMBRANA NA RANU NEOANGIOGENEZU U PROCESU KOŠTANE REGENERACIJE NA MODELU KRITIČNOG DEFEKTA KALVARIJ E KUNIĆA**. Kako kandidat, dr Jelena Stepić, ispunjava sve potrebne uslove da može prijaviti doktorsku tezu, na

osnovu pozitivnog mišljenja o predloženoj temi, komisija jednoglasno predlaže Nastavno-naučnom veću Stomatološkog fakulteta da prihvati obrazloženu temu **UTICAJ RAZLIČITIH KOLAGENIH MEMBRANA NA RANU NEOANGIOGENEZU U PROCESU KOŠTANE REGENERACIJE NA MODELU KRITIČNOG DEFEKTA KALVARIJE KUNIĆA** za izradu doktorske disertacije. Naučno-nastavnom veću se predlaže da za mentora odredi prof. dr Snježanu Čolić.

U Beogradu,

ČLANOVI KOMISIJE:

1. _____

(Prof. dr Snježana Čolić)

2. _____

(Doc.dr Božidar Brković)

3. _____

(Prof. dr Jelena Sopta, Medicinski fakultet, Beograd)

Na osnovu člana 50. Statuta Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu Nastavno naučno veće Stomatološkog fakulteta, na II redovnoj sednici u školskoj 2014/15. godini, održanoj 16.12.2014. godine, donelo je sledeću

O D L U K U

Usvaja se pozitivan izveštaj stručne komisije za ocenu predloga teme doktorske disertacije **dr Jelene Stepić**, pod korigovanim nazivom **UTICAJ RAZLIČITIH KOLAGENIH MEMBRANA NA RANU NEOANGIOGENEZU U PROCESU KOŠTANE REGENERACIJE NA MODELU KRITIČNOG DEFEKTA KALVARIJE KUNIĆA.**

Utvrdjuje se da kandidat može pristupiti radu na doktorskoj disertaciji pod korigovanim nazivom, pod uslovom da se sa izveštajem komisije i odlukom ovog Veća saglasi Veće naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.

Za mentora kandidatu imenuje se prof. dr Snježana Čolić.

Odluku dostaviti:

- Veću naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu
- Imenovanom/oj,
- Mentoru,
- Veću,
- Odseku za nastavu,
- Pisarnici.

Referent kadrovskog odseka
Violeta Rastović

Dekan
Stomatološkog fakulteta

Prof.drMiroslavVukadinović

Fakultet STOMATOLOŠKI

Broj zahteva _____

članu 6. i članu 7. stav 1. ovog pravilnika)

_____ 2014.

(Datum)

UNIVERZITET U BEOGRADU

STRUČNO VEĆE ZA MEDICINSKE

NAUKE

(Naziv stručnog veća kome se zahtev upućuje, aglasno

Beograd,
Studentski trg br.1

ZAHTEV

za davanje saglasnosti na predlog teme doktorske disertacije

Molimo da, shodno članu 57. st.3. Zakona o univerzitetu ("Službeni glasnik RS" br. 21/02), date saglasnost Na predlog teme doktorske disertacije:

„UTICAJ RAZLIČITIH KOLAGENIH MEMBRANA NA RANU NEOANGIOGENEZU U PROCESU KOŠTANE REGENERACIJE NA MODELU KRITIČNOG DEFEKTA KALVARIJE KUNIĆA“

NAUČNA
OBLAST

KLINIČKE STOMATOLOŠKE NAUKE

PODACI O KANDIDATU:

1. Ime, ime jednog od roditelja i prezime kandidata:

STEPIĆ ZORAN JELENA

2. Naziv i sedište fakulteta na kome je stekao visoko obrazovanje:

STOMATOLOŠKI FAKULTET U BEOGRADU

3. Godina diplomiranja: **2009**

4. Naziv magistarske teze kandidata: _____ /

5. Naziv fakulteta na kome je magistarska teza odbranjena: _____ /

6. Godina odbrane magistarske teze: _____ /

7. Naziv fakulteta na kome je kandidat završio doktorske studije: _____ /

odsek, smer ili grupa _____ /

Godina završetka doktorskih studija: _____ /

Obaveštavamo vas da je

Nastavno naučno veće

(naziv nadležnog tela fakulteta)

na sednici održanoj

16.12.2014.

razmotrilo predloženu temu i zaključilo da je tema podobna za izradu

doktorske disertacije.

DEKAN FAKULTETA

Prof. dr Miroslav Vukadinović

Prilog:

1. Predlog teme doktorske disertacije sa obrazloženjem,
2. Akt nadležnog tela fakulteta o podobnosti teme za izradu doktorske disertacije.