

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

Na redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu održanoj 29.05.2018. godine, imenovana je Komisija u sastavu:

- **Prof. dr Aleksa Marković**, Klinika za oralnu hirurgiju, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu
- **Akademik Miodrag Čolić**, Profesor emeritus, Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane u Beogradu
- **Dr Božana Čolović**, Naučni saradnik, Institut za nuklearne nauke Vinča

za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom **UTICAJ RAZLIČITIH MODIFIKACIJA POVRŠINE TITANA FIZIČKIM I HEMIJSKIM METODAMA NA NJEGOVU CITOKOMPATIBILNOST I IMUNOMODULACIJSKA SVOJSTVA**

Kandidat: dr Marko Z. Magić

Mentor: Prof. dr Snježana Čolić

Komentor: Prof. dr Dejan Marković

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 Marka Z. Magića pod nazivom **UTICAJ RAZLIČITIH MODIFIKACIJA POVRŠINE TITANA FIZIČKIM I HEMIJSKIM METODAMA NA NJEGOVU CITOKOMPATIBILNOST I IMUNOMODULACIJSKA SVOJSTVA** napisana je na 114 strana, uz prikaz 10 slika, 3 tabele, 34 grafikona i 117 referenci iz naučne literature na

koju se odnosi ovo istraživanje. Disertacija sadrži: sažetak na srpskom i engleskom jeziku, uvod, hipotezu i ciljeve istraživanja, materijal i metode, rezultate, diskusiju, zaključke i literaturu.

U **Uvodu** su obradjeni *Biokompatibilnost, Oseointegracija, Titan u oralnoj implantologiji, Obrada površine implantata* i *Imunomodulacijski efekti biomaterijala*.

U delu *Biokompatibilnost* kandidat je istakao važnost biokompatibilnosti materijala koji se koriste u implantologiji koja podrazumeva da biomaterijali, pri interakciji sa tkivom domaćina, treba da izazivaju reakciju koja ostaje u granicama tolerancije. Tolerabilne interakcije ćelija i tkiva sa biomaterijalima su uslov njegove funkcije i opstanka u organizmu. Promena kakarakteristika površine implantata koristi se za ograničavanje interakcije sa imunskim ćelijama da bi se smanjila inflamacija i imunski odgovor. U delu *Oseointegracija* istaknuto je da oseointegracija predstavlja složen proces zarastanja nakon ugradnje implantata u koji su uključene brojne ćelije i medijatori zapaljenske i imunske reakcije. Cilj ovog procesa je integrisanje stranog materijala (biomaterijala) u organizam. Opisan je makro i mikro-dizajn dentalnih implantata. Detaljno je objašnjeno i da pojam inertnost nije sinonim za biokompatibilnost. U delu *Titan u oralnoj implantologiji* detaljno su opisane karakteristike titana i njegovih legura - dobre fizičke i hemijske osobine i pokazana biokompatibilnost, ali i nezadovoljavajuća korozivna svojstva u biološkim tečnostima. Prirodni oksido redukcion potencijal titana je najniži od svih legura korišćenih u stomatologiji, ali postavljen u organizam, u kontaktu sa bazama, kiselinama, enzimima i bakterijama, postaje legura koja najteže korodira. U delu *Obrada površine implantata* objašnjeno je na koji način se mogu prevazići nedostaci titana za primenu u implantologiji. Modifikacija površine dentalnog implantata se sprovodi da bi se poboljšala biokompatibilnost, povećala površina za povezivanje implantata i kosti, poboljšao stepen oseointegracije implantata i smanjili negativni efekti implantata na okolno tkivo, što treba da utiče na poboljšanu oseointegraciju implantata. *Imunomodulacijski efekti biomaterijala* opisuju imunske reakcije koje nastaju kao posledica ugradnje stranog tela – implantata u lokalno tkivo i organizam. Opisuju se i medijatori imunskih reakcija (citokini) od važnosti za imunski odgovor na ugradnju implantata.

U poglavlju **Hipoteza i ciljevi istraživanja** izneta je radna hipoteza da legura titana čija je površina modifikovana hemijskom metodom (formiranjem oksidnog sloja) i fizičkom metodom (nanošenjem hidroksiapatitnog sloja raspršivanjem plazmom) ne ispoljava značajnu citotoksičnost. Legura čija je površina modifikovana navedenim metodama ima manji pro-inflamacijski, a snažniji imunoregulacijski efekat u odnosu na leguru čija površina nije modifikovana.

Da bi se ispitala radna hipoteza postavljeni su precizno definisani ciljevi:

1. Ispitati i uporediti citotoksično delovanje legure titana čija je površina modifikovana hemijskom obradom i deponovanjem hidroksiapatitne prevlake plazma metodom, primenom *in vitro* testova direktnog kontakta na ćelijskoj liniji L929, određivanjem: metaboličke aktivnosti ćelija, proliferacije ćelija, produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) ćelija, nekroze i apoptoze ćelija.
2. Ispitati i uporediti imunomodulacijsko delovanje legure titana čija je površina modifikovana hemijskom obradom i deponovanjem hidroksiapatitne prevlake plazma metodom, primenom *in vitro* modela fitohemaglutininom (PHA) stimulisanih humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC) određivanjem: proliferacije ćelija u kulturi, i produkcije citokina (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF- α , TNF- β , IFN- γ) u kulturi.

U okviru poglavlja **Materijal i metode** detaljno su opisani svi upotrebljeni uzorci legura titana, kao i postupci pomoću kojih su izvršene modifikacije površine titana: legura titana čija površina nije modifikovana (Ti); legura titana čija površina je modifikovana alkalnim nagrivanjem, jonskom izmenom i dodatnim termičkim tretmanom u vazdušnoj atmosferi (Ti-Ca); legura titana čija površina je modifikovana jednostranim (Ti-HAP) ili dvostranim (Ti-HAP2) nanošenjem hidroksiapatitnog (HAP) sloja inovativnom metodom raspršivanja plazme. Detaljno je opisan pojam kondicioniranog medijuma (KM) koji je pripreman inkubacijom uzoraka u kompletnom medijumu za kulture. Citotoksičnost je ispitivana *in vitro*, primenom testova direktnog kontakta u skladu sa preporukama standarda ISO (ISO 10993-5). Eksperimenti su rađeni na ćelijskoj liniji mišijih fibroblasta (L929). Ispitivana je citotoksičnost Ti legure čija je površina modifikovana na dva različita načina (eksperimentalni uzorci) u odnosu na Ti leguru bez modifikacije (kontrola). Procena ćelijskog rasta i morfološka analiza L929 ćelija je izvedena korišćenjem fazno kontrastne svetlosne mikroskopije (IX51 invertni mikroskop, Olympus), pod uvećanjem 10 i 20 puta. Vijabilnost L929 ćelija je određena primenom 1% rastvora Tripan plavog. Metabolička aktivnost L929 ćelija je analizirana nakon 24 sata kontakta ćelija i eksperimentalnih uzoraka, primenom testa redukcije 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT). Proliferaciju L929 ćelija merena je primenom testa ugradnje $^3\text{[H}^+]$ -timidina. Intraćelijska produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) je analizirana primenom protočne citofluorimetrije i metode obeležavanja ćelija sa 2'-7'- di-hlorodihidro fluorescein diacetatom (DCFH-DA). Analiza nekroze i apoptoze L929 ćelija je izvršena pomoću protočne citofluorimetrije primenom postupka obeležavanja ćelija sa propidijum jodidom (PI). Merenje produkcije laktat dehidrogenaze (LDH), kao indirektna mera nekroze usled gubitka integriteta ćelijske membrane, je određivana u supernatantima kultura L929 ćelija primenom komercijalnih LDH testova na sistemu ADVIA 1800. Merenje apoptoze preko aktivacije gena za kaspaze podrazumevalo je analizu ekspresije gena za mišje kaspaze (Cas-3, Cas-8 i Cas-9) pomoću metode lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (Real-Time PCR) bojenjem pomoću *SYBR Green* boje. Imunomodulacijski efekat modifikovanih površina Ti legure je

ispitivan na modelu fitohemaglutininom (PHA) aktiviranih humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMNC). Analiziran je efekat kondicioniranog medijuma ispitivanih uzoraka i kontrolnog medijuma (koncentracije 50% i 25%) na funkcionalne karakteristike PBMNC (proliferaciju i produkciju citokina) *in vitro*. Efekat kondicioniranog medijuma na proliferaciju PBMNC je ispitivan testom proliferacije, primenom $^3\text{H}^+$ -timidina. Produkcija pro-inflamacijskih (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , TNF- β), anti-inflamacijskih (IL-10), Th1 (IL-2, IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5) i Th17 (IL-17) citokina je određivana u supernatantima kultura PHA-stimulisanih PBMNC nakon 72 sata kultivacije u prisustvu kondicioniranog medijuma testiranih uzoraka.

U statističkoj obradi podataka navedeni su svi adekvatno upotrebljeni statistički testovi.

Rezultati su dobro organizovani i predstavljeni na razumljiv način. U prvom delu su navedeni rezultati fizičko-hemijske karakterizacije modifikovanih Ti legura korišćenih u istraživanju. Posebno se ističe rezultat modifikacije površine Ti legure nanošenjem hidroksiapatitnog sloja, dobijen metodom raspršivanja plazme. Merenje jačine adhezije nanetog hidroksiapatitnog sloja pokazalo je jačinu adhezije od 60.5 ± 15.5 MPa, što predstavlja izuzetno dobar rezultat. Zatim su navedeni rezultati: merenja direktne citotoksičnosti modifikovanih površina titanovih legura; efekta legura titana na produkciju reaktivnih kiseoničnih jedinjenja (ROS); efekta legura titana na ćelijsku nekrozu; efekta legura titana na apoptozu preko aktivacije gena za kaspaze; ispitivanja citokompatibilnosti legure titana na koje je obostrano naneta prevlaka HAP-a; ispitivanja uloge jona Ca u citotoksičnom delovanju HAP-modifikovanih Ti legura; efekta kondicioniranih medijuma legura titana na metaboličku aktivnost stimulisanih humanih PBMNC; efekta kondicioniranih legura titana na nekrozu i apoptozu stimulisanih humanih PBMNC; ispitivanja imunomodulacijskih svojstava legura titana (produkcija citokina od strane stimulisanih PBMNC).

U **Diskusiji** su naučnom analizom dobijenih rezultata obrazloženi biološki efekti ispitivanih modifikacija legura titana. Prvo je diskutovan način nanošenja hidroksiapatne obloge na leguru titana. Upotreba hidroksiapatitom obloženih legura titana u kliničkoj praksi pre svega zavisi od stabilnosti hidroksiapatitne prevlake. Diskutovano je kako se rezultati ispitivanja direktne i indirektno citotoksičnosti modifikovanih površina legure titana mogu klasifikovati na osnovu ISO 10993-5. Detaljno je analizirana, uz poređenje sa literaturnim podacima i povećana produkcija reaktivnih kiseoničnih jedinjenja (ROS), koja je dobijena pod uticajem sve tri ispitivane legure titana (Ti, Ti-Ca i Ti-HAP) obzirom da prekomerna produkcija ROS-a može izazvati oštećenja ćelija. Diskutovano je da li kondicioniranje utiče na citotoksičnost HAP-modifikovanih legura Ti i uloga jona Ca u citotoksičnom delovanju legura Ti čija je površina modifikovana HAP-om, aktivaciji gena za kaspaze pod uticajem ispitivanih legura titana. Analizirani su i imunomodulacijski efekti ispitivanih legura u odnosu na dobijene rezultate

drugih autora. Diskutovani su rezultati dobijeni za ćelijsku proliferaciju limfocita i produkciju citokina *in vitro*.

Na osnovu iznetih i diskutovanih rezultata doneti su **Zaključci** koji predstavljaju jasne odgovore na postavljene ciljeve. Korišćena **Literatura** sadrži spisak od 117 referenci iz naučne literature na koju se odnosi ovo istraživanje koje su adekvatno citirane u radu.

B. Kratak opis postignutih rezultata

Nemodifikovana legura (Ti), legura modifikovana hemijskim tretmanom sa NaOH i $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ i naknadnim termalnim tretmanom (Ti-Ca) i legura na koju je jednostrano naneta prevlaka HAP-a (Ti-HAP) mogu se okarakterisati kao ne-citotoksične (redukcija vijabilnosti manja od 30%). Legura na koju je dvostrano naneta prevlaka HAP-a (Ti-HAP2) je klasifikovana u kategoriju blago-umereno citotoksične (redukcija vijabilnosti 30%-55%). Kondicioniranje u medijumu u trajanju od 24 sata značajno smanjuje citotoksični efekat jednostrano i dvostrano HAP-modifikovanih legura dovodeći ih na nivo koji je prema ISO 10993-5 prihvatljiv. Kultivacija L929 ćelija sa Ti, Ti-Ca i Ti-HAP je dovela do aktivacije gena za sve tri ispitivane kaspaze. Pokazano je statistički značajno inhibitorno delovanje kondicioniranog uzorka Ti-HAP (Ti-HAP-KM) na proliferaciju PBMNC u poređenju sa kontrolnim uzorcima i kondicioniranim Ti-Ca uzorkom (Ti-Ca-KM). Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM statistički značajno inhibiraju produkciju IL-1 β . Kondicionirani medijum nemodifikovane legure (Ti-KM) u oba ispitivana termina kondicioniranja (3 dana i 7 dana), indukuje statistički značajno višu produkciju TNF- α u odnosu na kontrolni KM, Ti-HAP-KM i Ti-Ca-KM. Trodnevno kondicionirani uzorci Ti-KM, Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM statistički značajno inhibiraju produkciju IL-10. Ti-KM deluje stimulatorno na produkciju IL-2.

C. Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Ispitivanje citokompatibilnosti legura titana čija je površina modifikovana hemijskom obradom i deponovanjem hidroksiapatitne prevlake plazma metodom, putem indirektnog uticaja (kondicioniranog medijuma) testiranih legura kao i putem direktnog citotoksičnog delovanja, a polazeći od kriterijuma ISO 10993-5, okarakterisalo je nemodifikovanu leguru i jednostrano HAP-modifikovanu leguru kao ne-citotoksične (redukcija vijabilnosti manja od 30%). Prema istim kriterijumima dvostrano HAP-modifikovana legura je klasifikovana u kategoriju blago-umereno citotoksičnih (redukcija vijabilnosti 30%-55%). Ovaj nalaz je u saglasnosti sa rezultatima istraživanja drugih autora i publikovanim podacima o biokompatibilnosti hidroksiapatitnih obloga na titanski substrat (Huang S i sar 2008, Huang Y i sar, 2015). Detektovano je statistički značajno povećanje produkcije ROS pod uticajem sve tri ispitivane legure u poređenju sa kontrolnim ćelijama (bez prisustva legure). Produkcija ROS je određivana primenom protočne citofluorimetrije, obeležavanjem L929 ćelija bojom DCFH-DA. Međutim,

analizom srednjeg inteziteta fluorescence uočava se čak statistički značajno manja produkcija ROS u L929 ćelijama inkubiranim u prisustvu Ti-HAP u poređenju sa ćelijama inkubiranim u prisustvu Ti-Ca,Ti, kao i kontrolnim ćelijama. Ovaj nalaz je u skladu sa rezultatima istraživanja Fouda i sar, 2009. koji pokazuju da oblaganje titanovih implantata hidroksiapatitom može da inhibira stvaranje kiseoničnih i nitrokiseoničnih jedinjenja i da olakša proces zarastanja nakon ugradnje implantata. Pokazano je da se citotoksičnost dvostrano modifikovane legure (Ti-HAP2) može značajno smanjiti nakon kondicioniranja u medijumu u trajanju od 24 sata dovodeći je na nivo koji je prema ISO 10993-5 prihvatljiv. Dobijeni rezultati da kondicioniranje smanjuje citotoksičnost su u saglasnosti sa hipotezom da solubilne komponente HAP obloge mogu biti odgovorne za efekat citotoksičnosti. Ovom procedurom bi se mogle ukloniti rastvorljive toksične komponente (Magić M i sar. 2017). Stomatološki materijali koji sadrže HAP menjaju inflamatorni odgovor na mestu implantacije (Rydén L i sar. 2017). Zbog toga je analizirana i produkcija citokina od strane stimulisanih PBMNC. Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM statistički značajno inhibiraju produkciju IL-1 β , pro-inflamacijskog citokina koji učestvuje u regulaciji imunskog i zapaljenskog odgovora i može imati značajnu ulogu u aktivaciji T ćelija. Trodnevni Ti-HAP-KM statistički značajno inhibira produkciju TNF- α i u poređenju sa kontrolnom legurom (Ti-KM) i u poređenju sa Ti-Ca-KM. Rad Jacobi-Gresser i sar. iz 2013. je razmatrao genetičke i imunske parametre koji mogu biti markeri neuspeha dentalnih implantata od titana, i pokazao je da su kod pacijenata sa gubitkom implantata značajno povećane koncentracije TNF- α i IL-1 β , pro-inflamacijskih citokina, u kultuirama ćelija pune krvi inkubiranih u direktnom kontaktu sa česticama Ti dioksida. Dugoročno oslobađanje IL-1 i TNF- α podstiče inflamatorne i osteolitičke procese koji dovode do povećanog rizika od nastanka peri-implantitsa i gubitka implantata (Jacobi-Gresser i sar, 2013). Rezultati rada Hamleta i Ivanovskog, 2011, na modelu RAW 264.7 ćelijske linije, pokazuju da direktni kontakt sa nanostrukturnom Ca-fosfatnom oblogom legure titana (Ti6Al4V) dovodi do izrazitog smanjenja genske ekspresije pro-inflamacijskih citokina i hemokina. Smanjenje ekspresije gena potvrđeno je za TNF α i CCL5 i na proteinskom nivou. Ovi autori su pretpostavili da inhibicija produkcije pro-inflamacijskih citokina može na taj način olakšati zarastanje kosti i oseointegraciju što je u ovom istraživanju uočeno i klinički.

Trodnevni Ti-KM, Ti-Ca-KM i Ti-HAP-KM statistički značajno inhibiraju produkciju IL-10 u poređenju sa kontrolnim medijumom. IL-10 inhibira sintezu citokina sa pro-inflamacijskim delovanjem kao što su IL-6, IL-1 β . IL-2, IFN γ i TNF α . Sedmodnevni KM kontrolne legure Ti povećava produkciju IL-2, TNF α i IFN γ što je u saglasnosti sa smanjenom produkcijom IL-10. Ovi rezultati ukazuju da oblaganje Ti legure hidroksiapatitom značajno smanjuje produkciju citokina sa pro-inflamacijskim delovanjem (TNF- α) ali ne dovodi do povećanja produkcije IL-10 (citokina sa anti-inflamacijskim delovanjem), pa bi oblaganje legure titana HAP-om moglo da pojača anti-inflamacijska i osteoprotektivna svojstva legura Ti mehanizmima koji ne zavise od IL-10.

D. Objavljeni rad koji čini deo doktorske disertacije

- Magić M, Čolović B, Jakanović V, Vasilijić S, Marković M, Vučević D, et al. Cytotoxicity of a titanium alloy coated with hydroxyapatite by plasma jet deposition. *Vojnosanit Pregl* [Internet]. 2017 [cited 2018 May 7];(00):97–97. Available from: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0042-84501700097M>

E. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija **UTICAJ RAZLIČITIH MODIFIKACIJA POVRŠINE TITANA FIZIČKIM I HEMIJSKIM METODAMA NA NJEGOVU CITOKOMPATIBILNOST I IMUNOMODULACIJSKA SVOJSTVA** dr Marka Z. Magića predstavlja značajan naučni doprinos u proceni biokompatibilnosti modifikacija površina titana koje se mogu primeniti u implantologiji. Modifikacije površine legure titana hemijskom obradom i deponovanjem hidroksiapatitne prevlake inovativnom plazma metodom, kao i fizičko-hemijska karakterizacija tako dobijenih prevlaka izvršena je u Institutu Vinča. Ova doktorska disertacija predstavlja opsežno i sveobuhvatno istraživanje direktne i indirektno citotoksičnosti *in vitro*, kao i ispitivanja imunomodulacijskih svojstava legura titana. Rezultati merenja citotoksičnosti modifikovanih površina titanovih legura su pokazali da nemodifikovana legura (Ti), legura modifikovana hemijskim tretmanom sa NaOH i $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ i naknadnim termalnim tretmanom (Ti-Ca) i legura na koju je jednostrano naneta prevlaka HAP-a (Ti-HAP) mogu da se okarakterišu kao necitotoksične, dok se legura na koju je dvostrano naneta prevlaka HAP-a (Ti-HAP2) može okarakterisati kao blago-umereno citotoksična. Dobijeni rezultati ukazuju da se citotoksičnost Ti-HAP2 legure može znatno smanjiti do necitotoksičnog nivoa prethodnim kondicioniranjem u medijumu za kultivaciju ćelija ili drugim vodenim rastvorim, što može biti od značaja za *in vivo* primenu u implantologiji. Pokazana inhibicija produkcije IL-1 β i TNF- α pod uticajem kondicioniranih medijuma sa oblogom hidroksiapatita i hemijskom obradom površine titana u odnosu na leguru titana, može ukazivati na veću stopu preživljanja ovako modifikovanih površina implantata u *in vivo* sistemu. Dobijeni rezultati ukazuju na pravilan pristup u proceni biokompatibilnosti i stepena imunomodulacije datih legura. Doktorska disertacija dr Marka Z. Magića urađena je prema svim principima naučnog istraživanja sa precizno postavljenim ciljevima i sveobuhvatnim pristupom rešavanju svake faze istraživanja. Ova doktorska disertacija se odlikuje savremenom metodologijom rada, adekvatno prikazanim i diskutovanim rezultatima i jasno uobličeniim zaključcima. Na osnovu svega gore navedenog, Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Marka Z. Magića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora stomatoloških nauka.

U Beogradu, 25.06.2018. godine

Članovi Komisije:

Prof. Dr Aleksa Marković, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Akademik Miodrag Čolić, Profesor emeritus, Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane u Beogradu

Dr Božana Čolović, Naučni saradnik, Institut za nuklearne nauke Vinča