

# **Nastavno-naučnom veću Stomatološkog fakulteta**

## **Univerziteta u Beogradu**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj 29.09.2020. imenovana je komisija u sastavu:

1. Prof. dr Ivana Šćepan, redovni profesor, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Tamara Perić, vanredni profesor, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Doc. dr Zorana Stamenković, docent, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu
4. Prof. dr Marija Đurić, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom:

"ISPITIVANJE ČELIJSKIH MEHANIZAMA UKLJUČENIH U MORFOLOŠKE PROMENE  
TEMPOROMANDIBULARNOG ZGLOBA PACOVA SA EKSPERIMENTALNO IZAZVANOM  
LATERALNOM DEVIJACIJOM MANDIBULE"

Kandidat: dr Vanja Stojić

Mentori: prof. dr Branislav Glišić i prof. dr Jelena Roganović

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

## **IZVESTAJ**

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

Doktorska disertacija "Ispitivanje čelijskih mehanizama uključenih u morfološke promene temporomandibularnog zgloba pacova sa eksperimentalno izazvanom lateralnom devijacijom mandibule" dr Vanje Stojić napisana je na 75 strane i razvrstana u 8 poglavlja: Uvod, Radna hipoteza, Ciljevi studije, Metodologija, Rezultati, Diskusija, Zaključci, Literatura. Disertacija sadrži 11 tabela, 5 grafikona, 16 slika i 155 bibliografskih jedinica.

**Uvod** se sastoji iz 3 dela. Prvi deo se bavi anatomskom građom temporomandibularnog zgloba (TMZ), funkcijama i kretanjama u zglobu, kao i karakteristikama i funkcijama komponenti temporomandibularnog zgloba. Drugi deo opisuje temporomandibularne disfunkcije (TMD), njihovu zastupljenost, etiologiju, simptome i znake, kao i podelu. Takođe je opisan i bočni ukršteni zagrižaj, njegova zastupljenost i etiologija sa akcentom na unilateralni bočni ukršteni zagrižaj sa funkcionalnom lateralnom devijacijom mandibule, njegovim uticajem na koštane i mišićne strukture TMZ. U daljem tekstu kandidat opisuje različite eksperimentalne modele za izazivanje lateralne devijacije mandibule zastupljene u literaturi, kao i upotrebu pacova kao eksperimentalne životinje. U trećem delu kandidat razmatra celularne i molekularne mehanizme koji se nalaze u osnovi fizioloških, kao i patoloških procesa na nivou TMZ. Opisane su višestruke uloge i značaj vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) u angiogenezi, remodelovanju kosti i hrskavice, kao i u degenerativnim procesima koji se odvijaju u TMZ. Takođe su opisane uloge i značaj azot monoksida i izoformi enzima azot monoksid sintaze u fiziološkim, ali i u zapaljenskim procesima. Ističe se značaj oksidativnog stresa i superoksid dizmutaze (SOD) za funkciju mastikatornih mišića i TMZ, kao i u patogenezi temporomandibularnih disfunkcija. Kandidat ističe da u literaturi nema podataka o stvaranju azot monoksida i antioksidativom statusu u TMZ tokom funkcionalne lateralne devijacije.

**Radna hipoteza** glasi: „Eksperimentalno izazvana lateralna devijacija mandibule na modelu pacova u periodu rasta dovodi do promena u rastu i morfologiji cele mandibule, ali i do promena u sinovijalnoj membrani i maseteričnom mišiću TMZ koje su na ćelijskom nivou praćene povećanjem ekspresije vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF), neuralne azot monoksid sintaze (nNOS) i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite“.

**Ciljevi studije** su obuhvatali utvrđivanje morfometrijskih promena u rastu i razvoju mandibule, histomorfometrijskih parametara kosti kondila, koncentracija VEGF i nNOS, aktivnosti SOD i analizu korelacije dobijenih parametara pacova eksperimentalne i kontrolne grupe.

Poglavlje **Metodologija** sadrži detaljan opis eksperimentalnog dela studije. U prvom delu su opisane eksperimentalne životinje, grupe, eksperimentalna procedura i uzimanje uzoraka. Drugi deo ovog poglavlja opisuje korišćeni eksperimentalni model lateralne devijacije, njegovu konstrukciju, postavku i ulogu. Treći deo ovog poglavlja bavi se opisom snimanja lobanje pacova kompjuterizovanom tomografijom (CT), određivanjem referentnih

tačaka i ravni na CT slikama, definisanjem linearnih i angularnih rastojanja koja su merena na referentnim CT slikama. Snimanje mikrokomputerizovanom tomografijom (micro CT) kondila mandibule, određivanje regiona interesa, kao i definisanje trabekularnih morfometrijskih parametara je opisano u četvrtom delu. Kandidat u petom delu opisuje histološku i histomorfometrijsku analizu kondila, pripremu i bojenje kondila Goldnerovom metodom, kompjutersku analizu slika histoloških preparata, određivanje regiona na preparatu, kao i definisanje načina iskazivanja dobijenih rezultata. U šestom delu je opisana analiza uzoraka tkiva TMZ imunoesejskom metodom – ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) za određivanje koncentracije VEGF i nNOS, kao i spektrofotometrijsko određivanje inhibitorne aktivnosti SOD .

**Rezultati** se sastoje iz 4 dela, rezultata dobijenih CT analizom, micro CT analizom, histomorfometrijom, i spektrofotometrijom i ELISA metodom. Svi rezultati su podeljeni u tri grupe (kontrolu grupu, radnu i balansnu stranu mandibule eksperimentalnih pacova) i iskazani kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna devijacija sa statistički značajnom razlikom od  $p < 0,05$ . U prvom delu su prikazane slike rekonstruisanih lobanja pacova eksperimentalne i kontrolne grupe, kako bi se vizuelno prikazala razlika u veličini i morfologiji lobanja eksperimentalnih i kontrolnih pacova. Rezultati angularnih i linearnih merenja dobijenih CT analizom su predstavljeni tabelarno i protumačeni u tekstu. Drugi deo ovog poglavlja sadrži tabelarno iskazane rezultate dobijene micro CT analizom celog kondila i kocke iz posteriornog regiona kondila, slike rekonstruisanih kondila pacova kontrolne i eksperimentalne grupe u sagitalnoj, horizontalnoj i frontalnoj ravni. Takođe su prikazane rekonstruisane kocke iz posteriornog regiona kondila pacova kontrolne i eksperimentalne grupe. Rezultati histomorfometrije koji čine treći deo ovog poglavlja, i obuhvataju količinu novostvorene kosti i hrskavice, kao i veličinu šupljina koštane srži su predstavljeni tabelarno, a njihova zastupljenost po regionima kondila putem grafikona. U sklopu ovog dela su prikazane i slike histoloških preparata kondila pacova kontrolne i eksperimentalne grupe pod različitim uveličanjima. Četvrti deo predstavljaju vrednosti koncentracija VEGF i nNOS, kao i aktivnosti SOD u kondilu, maseteričnom mišiću i sinovijalnoj membrani dobijeni ELISA metodom i spektrofotometrijom. Ovi rezultati su predstavljeni grafikonima i protumačeni u tekstu.

U poglavlju **Diskusija** kandidat tumači dobijene rezultate, upoređuje ih sa rezultatima ranijih studija, ističe sličnosti, ali i razlike. Kandidat je detaljno objasnio i doveo u korelaciju makro i mikro promene koje su nastale na kondilu i mandibuli usled lateralne devijacije

mandibule, sa ćelijskim promenama na nivou tkiva TMZ. Takođe kandidat diskutuje o lateralnoj devijaciji kao faktoru rizika za nastanak TMD.

**Zaključci** ove studije su jasno i koncizno formulisani, i pružaju odgovore na postavljene ciljeve i radnu hipotezu. Zaključeno je da lateralna devijacija mandibule kod pacova u periodu intenzivnog rasta dovodi do promena u morfologiji kondila i mandibule, gradi kondila i njegovim mehaničkim osobinama, kao i koncentracijama VEGF i nNOS, i aktivnosti SOD u tkivima TMZ, koji imaju značajnu ulogu u patogenezi ovih promena.

**Literatura** je savremena i sveobuhvatna, i sadrži 155 bibliografskih jedinica.

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

CT analiza lobanja pacova je pokazala da su lobanje pacova eksperimentalne grupe manje i asimetrične u odnosu na lobanje pacova kontrolne grupe. Prednja i zadnja dužina mandibule su veće na balansnoj strani, dok je zadnja visina ramusa mandibule manja u odnosu na radnu stranu mandibule pacova eksperimentalne grupe. Uglovi koje zaklapaju kondilarni i koronoidni nastavak donje vilice sa mandibularnom ravni su veći na radnoj strani u odnosu na balansnu stranu mandibule eksperimentalnih životinja. Iz ovoga se može zaključiti da je na balansnoj strani izraženiji sagitalni rast, a na radnoj strani mandibule eksperimentalnih životinja vertikalni rast zbog čega dolazi do nastanka mandibularne asimetrije.

Micro CT analizom je utvrđeno da kondili eksperimentalnih životinja imaju niže vrednosti odnosa koštanog i tkivnog volumena, debljine koštanih gredica, broja koštanih gredica, zatvorene poroznosti i gustine povezanosti pora u odnosu na kondile životinja kontrolne grupe. Vrednosti razdvojenosti koštanih gredica, stepena konveksnosti-konkavnosti koštanih gredica, strukturalnog indeksa modela koštanih gredica, totalne i otvorene poroznosti su veće kod pacova eksperimentalne grupe u odnosu na pacove kontrolne grupe, dok u vrednostima stepena anizotropije i fraktalne dimenzije nema statistički značajne razlike. Ovo ukazuje da kondili eksperimentalnih životinja u odnosu na kontrolne životinje imaju manju količinu kosti u kondilu, veće šupljine koštane srži, manje kompleksnu unutrašnju strukturu, manju jačine i čvrstoću kosti.

Histomorfometrija je pokazala da je na kondilu radne strane eksperimentalnih životinja formirano najmanje hrskavice, ali najviše nove kosti, posebno u anteriornom i superiornom regionu u poređenju sa kondilom balansne strane eksperimentalnih životinja i kondilom životinja kontrolne grupe. Takođe je utvrđeno da je površina šupljina koštane srži veća u kondilima eksperimentalnih životinja u poređenju sa kondilima životinja kontrolne grupe.

Koncentracija VEGF je veća u kondilu i maseteričnom mišiću pacova eksperimentalne grupe u odnosu na pacove kontrolne grupe. Koncentracija nNOS je veća u maseteričnom mišiću i sinovijalnoj membrani pacova eksperimentalne grupe u odnosu na pacove kontrolne grupe. Aktivnost superoksid dizmutaze je veća u maseteričnom mišiću, a manja u sinovijalnoj membrani eksperimentalnih životinja u odnosu na životinje kontrolne grupe.

### **C. Uporedna analiza rezultata prikazanih u ovoj disertaciji sa rezultatima iz literature**

Brojne studije su ispitivale dešavanja na nivou temporomandibularnog zgloba u toku lateralne devijacije mandibule. Ovo istraživanje je pokazalo da usled lateralne devijacije mandibule dolazi do asimetričnog razvoja lobanje pacova eksperimentalne životinje sa dužom balansnom stranom mandibule i višom radnom stranom mandibule, što potvrđuje tvrdnje ranijih studija koje su se bavile ovom problematikom (C. Liu et al., 2007; Nakano et al., 2004). Novitet ove studije u odnosu na prethodne koje su proučavale uticaj lateralne devijacije na morfologiju mandibule je to što su analizirane i angularne mere, koje daju dodatan uvid u pravac rasta mandibule na radnoj i balansnoj stranu, kao i razvitak mandibularne asimetrije. Rezultati histomorfometrije ukazuju na veće stvaranje kosti u posteriornom regionu balansne strane i anteriornom i superiornom regionu radne strane, što se da objasniti različitim položajem kondila u glenoidnim jamama (Hesse et al., 1997). Pri lateralnoj devijaciji mandibule, kondil balansne strane postavljen je anteriornije i inferiornije kao kod propulzije mandibule (Rabie et al., 2003), a kondil radne strane posteriornije i superiornije, kao kod retropulzije mandibule (Ingervall et al., 1972). Veća debljina hrskavice na kondilu balansne strane se objašnjava protrudovanim položajem kondila (Shen & Darendeliler, 2005), dok do stvaranja manje količine hrskavice na radnoj strani dolazi usled limitiranog posteriornog pomeranja kondila (Cholasueksa et al., 2004).

Trabekularni morfometrijski parametri ukazuju da je u kondilima eksperimentalnih životinja došlo do degradacije kosti kondila u vidu smanjenje odnosa koštanog i tkivnog volumena, broja i debljine koštanih gredica, povećanje šupljina koštane srži, što utiče na smanjenje jačine i čvrstoće kosti, što je u literaturi zabeleženo kod osteoporoze (Nazarian et al., 2008). Strukturalni indeks modela koštanih gredica i stepen konveknosti-konkavnosti koštanih gredica su veći kod kondila eksperimentalnih životinja, što se ogleda manjom otpornosti na opterećenje i većoj sklonosti ka frakturi kondila (Koolstra & van Eijden, 2005; Wu et al., 2015). Veće vrednosti totalne i otvorene poroznosti kosti kondila eksperimentalnih životinja su znak degradacije kosti kondila i potvrđuju histomorfometrijske nalaze, koji su pokazali da su šupljine koštane srži veće u kondilima eksperimentalnih životinja u odnosu na kontrolne životinje. Ranije studije čiji je predmet proučavanja bio prinudni obrnuti preklap sekutića i jednostrano žvakanje, su dokazale da nepravilni okluzalni odnosi dovode do aktivacije kataboličkih procesa u kondilu (Y. D. Liu et al., 2014; Poikela et al., 2000; Zhang et al., 2016).

U literaturi nema podataka o nivou VEGF i nNOS, kao i o aktivnosti SOD u tkivima TMZ pri lateralnoj devijaciji mandibule. Rezultati ove studije ukazuju na povećanu koncentraciju VEGF u kondilu i maseteričnom mišiću pacova eksperimentalne grupe, što se može dovesti u vezu sa smanjenim stvaranjem i resorpcijom kosti, povećanim kataboličkim aktivnostima hondrocita, kao i oštećenjem mišića (Farias-Neto et al., 2012; Helmrich et al., 2013; Hu & Olsen, 2016). Povećana ekspresija nNOS u maseteričnom mišiću pacova eksperimentalne grupe se može dovesti u vezu sa nastankom mialgija i miopatija (Fanin et al., 2009; Jensen et al., 2015), a povećana ekspresija u sinovijalnoj tečnosti sa patofiziologijom sinovijalne inflamacije (Alpaslan et al., 2000). Pojačana aktivnost SOD je ustanovljena u maseteričnom mišiću kod pacova eksperimentalne grupe, za šta je u literaturi dokazano da dovodi do disfunkcije orofacijalnih mišića (Pereira et al., 2014).

Napomena: kompletni bibliografski podaci za pomenute navode iz literature dati su u doktorskoj disertaciji kandidata.

#### **D. Objavljeni radovi koji čine sastavni deo teze**

1. **Stojić Vanja**, Glišić Branislav, Đukić Ljiljana, Prokić Bogomir, Janović Aleksa, Stamenković Zorana, Milutinović-Smiljanić Sanja, Danilović Vesna, Brković Božidar, Roganović Jelena (2020). Mandibular lateral deviation induces alteration in

vascular endothelial growth factor expression and oxidative stress/nitric oxide generation in rat condyle, synovial membrane and masseter muscle. Archives of Oral Biology, vol. 110, February, art. No. 104599. (M22, IF 1.931)

## **E. Provera originalnosti doktorske disertacije**

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije "Ispitivanje ćelijskih mehanizama uključenih u morfološke promene temporomandibularnog zgloba pacova sa eksperimentalno izazvanom lateralnom devijacijom mandibule", autora dr Vanje Stojić, konstatujemo da utvrđeno podudaranje teksta iznosi 23%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je citata, ličnih imena, bibliografskih podataka o korišćenoj literaturi, tzv. opštih mesta i podataka, kao i prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja, koji su proistekli iz njene disertacije što je u skladu sa članom 9. Pravilnika.

Na osnovu svega iznetog, a u skladu sa članom 8. stav 2. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, izjavljujemo da izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije, te se propisani postupak pripreme za njenu odbranu može nastaviti.

## **F. Zaključak**

Doktorska disertacija "Ispitivanje ćelijskih mehanizama uključenih u morfološke promene temporomandibularnog zgloba pacova sa eksperimentalno izazvanom lateralnom devijacijom mandibule" dr Vanje Stojić predstavlja originalan i značajan naučni doprinos u rasvetljavanju ćelijskih mehanizama koji dovode do makro i mikro promena na nivou mandibule i temporomandibularnog zgloba usled funkcionalne lateralne devijacije mandibule. Radna hipoteza i ciljevi istraživanja su precizno i jasno definisani. Metodologija rada je savremena i u skladu sa principima naučnog rada. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da funkcionalna lateralna devijacija dovodi do ćelijskih promena u tkivima temporomandibularnog zgloba, morfoloških promena na nivou kondila i nastanka mandibularne asimetrije. Imajući u vidu ove rezultate, može se zaključiti da unilateralni

ukršteni zagrižaj sa funkcionalnom lateralnom devijacijom mandibule predstavlja faktor rizika za nastanak temporomandibularne disfunkcije, čime se ističe značaj rane dijagnostike i korekcije ove nepravilnosti u cilju prevencije nastanka temporomandibularne disfunkcije.

Uvidom u dostavljeni tekst disertacije, komisija jednoglasno predlaže Nastavno-naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati pozitivan izveštaj o doktorskoj disertaciji dr Vanje Stojić pod naslovom "Ispitivanje ćelijskih mehanizama uključenih u morfološke promene temporomandibularnog zgloba pacova sa eksperimentalno izazvanom lateralnom devijacijom mandibule".

U Beogradu, \_\_\_\_\_

Članovi komisije

---

Prof. dr Ivana Šćepan

---

Prof. dr Tamara Perić

---

Doc. dr Zorana Stamenković

---

Prof. dr Marija Đurić