

Nastavno-naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Na I sednici Nastavno-naučnog veća Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu od 22.10.2015. godine, imenovana je komisija u sastavu:

Prof. dr Đurica Grga, Stomatološki fakultet, Beogradu

Prof. dr Vesna Danilović, Stomatološki fakultet, Beograd

Dr Milica Manojlović-Stojanoski, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerzitet u Beogradu

Dr Verica Milošević, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerzitet u Beogradu

za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom **UTICAJ AMELOGENINA, FAKTORA RASTA I NOVIH NANOSTRUKTURNIH MATERIJALA NA BAZI KALCIJUM SILIKATNIH CEMENATA NA REGENERACIJU PULPE.**

Kandidat: dr Marijana Popović Bajić

Mentor: prof. dr Slavoljub Živković

Imenovana komisija je proučila tekst doktorske disertacije i Nastavno- naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu podnosi sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Marijane Popović Bajić pod nazivom UTICAJ AMELOGENINA, FAKTORA RASTA I NOVIH NANOSTRUKTURNIH MATERIJALA NA BAZI KALCIJUM SILIKATNIH

CEMENATA NA REGENERACIJU PULPE je napisana na 139 strana i sadrži 13 tabela, 13 grafikona, 42 slike i 250 referenci iz savremene naučne literature. Tekst disertacije uključuje: sažetak na srpskom i engleskom jeziku, uvod, pregled literature, radnu hipotezu, ciljeve istraživanja, materijal i metode, rezultate, diskusiju, zaključke i literaturu.

U **uvodu** je kratko predstavljena naučna problematika ove teze koja se odnosi na pojedina neresena pitanja, vezana za terapijski postupak direktnog prekrivanja pulpe, ali i na primenu novih bioaktivnih materijala koji mogu delovati na osnovne faktore regeneracije i time stimulisati regenerativne aktivnosti oštećene pulpe. Opisan je način delovanja biomaterijala na bazi kalcijum silikatnih sistema, faktora rasta, amelogenina i novih nanostrukturnih materijala na regeneraciju pulpe.

U **pregledu literature** su predstavljena savremena istraživanja u lečenju obolele pulpe terapijskim postupkom direktnog prekrivanja pulpe, odnosno prikazani rezultati primene novih biomaterijala koji mogu stimulisati regenerativnu aktivnost oštećene pulpe.

Ovo poglavlje obuhvata dosadašnja saznanja o pulpodentinskom kompleksu i reparativnoj dentinogenezi, kao i istraživanja o bioaktivnosti materijala koji se koriste za direktno prekrivanje pulpe. Jasno i pregledno je predstavljen biomimetički terapijski pristup i moguća primena amelogenina-gleđnog proteina u tkivnoj regeneraciji, odnosno primena novih koncepata aktivne regeneracije i tkivnog inženjeringa, sa ciljem unapređenja terapijskih rezultata. Značajan segment ovog poglavlja je posvećen istraživanjima o ulozi faktora rasta kao signalnih molekula u pulpodentinskom kompleksu i njihovom snažnom bioaktivnom potencijalu u jako malim koncentracijama. U pregledu literature su predstavljena i aktuelna naučna saznanja o razvoju nanomedicine i sve veća primena novih nanostrukturnih biomaterijala u razvoju individualne terapije tkivnim inženjeringom. Poseban osvrt je dat na mehanizam delovanja eksperimentalnih nanostrukturnih materijala na bazi kalcijum silikatnih sistema.

Ciljevi istraživanja su jasno i precizno definisani. Osnovni cilj istraživanja bio je da se u *in vivo* uslovima ispita uticaj gleđnog proteina -EMDOGAIN-a, faktora rasta- PRF-a, BIODENTIN-a i dva

nova nanostrukturalna biomaterijala na bazi kalcijum silikatnih sistema nakon direktnog prekrivanja eksponirane pulpe zuba vijetnamskih svinja.

U poglavlju **materijal i metodologija** jasno je opisana metodologija i eksperimentalni model ovog istraživanja, kao i kompletna hirurška procedura na životinjama. Takođe je predstavljen kompletan prikaz testiranih materijala za direktno prekrivanje pulpe. Opisan je sastav gotovih preparata BIODENTIN-a i EMDOGAIN GEL-a i način njihove primene, a detaljno je opisana i sinteza fibrina bogatog trombocitima (PRF-a) iz krvne plazme, kao i sinteza novih nanostrukturnih biomaterijala na bazi aktivnih kalcijum silikatnih sistema (ALBO MPCA I i ALBO MPCA II). U delu koji opisuje eksperimentalni protokol na životinjama, detaljno je opisana operativna procedura direktnog prekrivanja pulpe i aplikacije testiranih materijala u zube vijetnamskih svinja. Takođe je vrlo jasno i precizno opisana procedura uzimanja i pripreme uzoraka za histološku analizu (mekih i tvrdih zubnih tkiva) kao i histološke ocene za svaki traženi parametar.

U statističkoj obradi podataka navedeni su statistički testovi koji su korišćeni u analizi rezultata ovog eksperimenta.

Rezultati istraživanja su prikazani tabelarno i grafički i na velikom broju slika sa odgovarajućim objašnjenjima svake od histoloških promena u pulpnom tkivu zuba (na mestu perforacionog otvora), za svaki od testiranih materijala. U prvom delu su predstavljeni rezultati analize formiranja dentinskog mosta na zubima posle direktnog prekrivanja pulpe testiranim materijalima, u drugom delu rezultati morfološke reorganizacije pulpnog tkiva, a u trećem delu rezultati inflamatorne reakcije pulpe zuba eksperimentalnih životinja. Četvrti deo u poglavlju rezultata je obuhvatio analizu prisustva bakterija nakon direktnog prekrivanja pulpe zuba testiranim materijalima, a peti rezultate histomorfometrijske analize (volumenska gustina dentinskog mosta, volumenska gustina pulpnog tkiva, volumenska gustina krvnih sudova, površina dentinskog mosta, površina pulpe, površina krvnih sudova).

U rezultatima su detaljno izloženi histološki parametri u korelaciji sa materijalom i pulpnim odgovorom na testirane materijale, kao i kvalitet, debljina, lokalizacija i stuktura novoformiranog kalcifikovanog tkiva u predelu pulpne rane.

U **Diskusiji** su naučnom analizom dobijenih rezultata objašnjeni uočeni efekti, odnosno reakcije pulpnog tkiva zuba na delovanje testiranih materijala. Ukazano je da svi testirani materijali poseduju bioinduktivni potencijal, tj. indukuju stvaranje dentinskog mosta i sledstvenu regeneraciju eksponiranog pulpnog tkiva. Data su vrlo jasna objašnjenja bioinduktivnog potencijala za svaki od korišćenih materijala u skladu sa nalazima i podacima iz literature, kao i vrlo kritična poređenja dobijenih rezultata u ovom istraživanju sa rezultatima iz dostupne literature sa sličnom problematikom.

Na osnovu iznetih i diskutovanih rezultata predstavljeni su **zaključci** koji su u stvari jasan odgovor na postavljene ciljeve. Korišćena literatura sadrži spisak od 169 referenci iz savremene i relevantne naučne literature vezane za ovu oblast, a koja je citirana u rukopisu teze.

B. Opis postignutih rezultata

Dobijeni rezultati ove doktorske teze su pokazali da svi testirani materijali poseduju određenu bioaktivnost i bioinduktivni potencijal koji omogućava formiranje dentinskog mosta, odnosno regeneraciju oštećenog pulpnog tkiva. Reakcija pulpe zuba posle direktnog prekrivanja je uglavnom ukazala na potpuno odsustvi ili blagu zapaljensku reakciju sa malo ćelija zapaljenja.

Kompletan dentinski most bio je formiran u najvećem broju uzoraka posle direktnog prekrivanja novosintetisanim materijalima na bazi kalcijum silikatnih sistema (ALBO MPCA I) i fibrina bogatog trombocitima (PRF) koji u sebi sadrži veliki izvor faktora rasta.

Najveća debljina i najbolja organizacija novoformiranog kalcifikovanog tkiva kompletnog dentinskog mosta je uočena posle direktnog prekrivanja pulpe zuba novosintetisanim materijalima na bazi kalcijum silikata (ALBO MPCA I i ALBO MPCA II).

Najslabija inflamatorna reakcija u pulpi eksponiranih zuba je zabeležena nakon direktnog prekrivanja novim materijalima na bazi kalcijum silikata (ALBO MPCA I) i EMDOGAIN-om, a najizraženija u uzorcima gde je direktno prekrivanje pulpe realizovano materijalima sa faktorima rasta (PRF).

Najveća volumenska gustina novoformiranog dentinskog mosta kao i najveća prosečna površina novog dentina uočena je posle DPP novosintetisanim materijalima na bazi kalcijum silikata (ALBO MPCA I), a najveća volumenska gustina novoformiranih krvnih sudova u pulpi konstantovana je posle DPP zuba Biodentinom.

Ukupni rezultat ove doktorske teze ukazuje na činjenicu da su efekti materijala na bazi faktora rasta (PRF), materijala na bazi gleđnih proteina (EMDOGAIN), odnosno materijali na bazi kalcijum silikatnih cemenata (BIODENTIN) kao i novosintetisani nanomaterijali na bazi kalcijum silikata ukazali na izuzetan bioinduktivni potencijal. Dobijeni nalazi su vrlo komparabilni sa rezultatima najefikasnijeg materijala za DPP MTA-om, koji se smatra zlatnim standardom za ovaj terapijski postupak.

C. Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Rezultati ove doktorske disertacije proistekli su iz eksperimentalne in vivo studije na animalnom modelu, primenom terapijskog postupka direktnog prekrivanja pulpe različitim bioaktivnim i bioinduktivnim materijalima.

Testirani materijali EMDOGAIN, PRF, BIODENTIN i novosintetisani nanostrukturni materijali pripadaju grupi bioaktivnih materijala, koje odlikuje oslobađanje biološki aktivnih jona koji indukuju procese reparativne dentinogeneze.

Kompletan dentinski most u ovom istraživanju uočen je u skoro svim uzorcima gde je pulpa prekrivana novosintetisanim materijalima na bazi kalcijum silikata ALBO MPCA I i ALBO MPCA II, kao i u uzorcima kontrolne grupe gde je pulpa prekrivana MTA-om. Prosečna debljina novoformiranog dentinskog mosta bila je veća kod novosintetisanih eksperimentalnih materijala (ALBO MPCA I-296 μ m, ALBO MPCA II- 336 μ m), u odnosu na kontrolni materijal (MTA-262 μ m).

U sintezi novih eksperimentalnih materijala ispitivanih u ovom istraživanju korišćena je sol-gel metoda, koja po podacima iz literature daje bioaktivnije materijale u odnosu na materijale istog sastava dobijene drugim metodama sintetisanja (Li P.& De Groot K, 1994). Kontinuirano oslobađanje kalcijumovih jona iz ovih materijala se smatra ključnim za indukciju formiranja čvrstog tkiva (Gandolfi MT et al, 2012). Visoka koncentracija kalcijuma na mestu aplikacije aktivira stem ćelije, osteoblaste i fibroblaste i uslovljava njihovu migraciju, čime postaje moćan regulator ćelijske proliferacije, diferencijacije i mineralizacije (Sangwan et al, 2013.). Osim toga i struktura novih kalcijum silikatnih sistema sa nanočesticama uređenim na tri hijerarhijska nivoa (aglomerati- nekoliko mikrometara, partikule- 117-477nm i kristaliti- 19,9nm) obezbeđuju evidentnu aktivnost, jer manje čestice i povećana ukupna površina igraju važnu ulogu u fizičkim i hemijskim svojstvima cementa (Saghiri, 2012.)

Na bioaktivnost materijala na bazi kalcijum silikata i debljinu dentinskog mosta mogla su uticati i rendgen kontrastna sredstva, koja ulaze u osnovni sastav ovih materijala. Barijum sulfat, koji je dodat nosintetisanom materijalu ALBO MPCA II (veća debljina dentinskog mosta) je bezbedniji za kliničku upotrebu jer je inertan i ne modifikuje hidratacione karakteristike kalcijum silikatnih materiala (Camilieri, 2010). Uticaj bizmut oksida, kao rendgen kontrastnog sredstva (MTA, ALBO MPCA I) na humane ćelije je kontroverzan. Dok pojedini istraživači negiraju uticaj ovog elementa na biokompatibilnost cementa (Torabinejad et al, 2010) , drugi ističu da on utiče na citotoksičnost ćelija pulpe (Gandolfi, 2010).

U sastavu nosintetisanih materijala ALBO MPCA I i ALBO MPCA II nalaze se i joni Si, koji osim što imaju ulogu u bioaktivnosti materijala (Huan Z et al. 2009), oni indukuju i proces mineralizacije stimulišući proliferaciju i diferencijaciju ćelija sličnih odontoblastima. Visoke koncentracije Si (>30ppm) mogu inhibirati razvoj osteoklasta i procese resorpcije, ali i povećati nivo alkalne fosfataze i time uticati na aktivniju mineralizaciju kalcifikovanog tkiva (Pietak AM, 2007)

Prosečna debljina dentinskog mosta kod zuba gde je direktno prekrivanje realizovano Biodentinom, iznosila je 206 μ m, u grupi gde je korišćen PRF 158 μ m, a u grupi sa EMDOGAIN-om 143 μ m.

Potvrđeno je takođe da gleđni proteini učestvuju u odontogenezi, tj recipročno ektodermalno mezenhimalnoj signalizaciji koja kontroliše ovaj proces (Hammarström L, 1997), jer kao mineralizacioni markeri u odontoblastima predstavljaju glavne nekologene proteine kosti i dentina (Weishaupt P, 2008). EMDOGAIN sadrži i faktore rasta (TGF β 1 i koštani morfogenetski protein) koji aktivno učestvuju u ćelijskoj signalizaciji i stimulisanju formiranja tkivnog matriksa i njegove mineralizacije (Kawase T, 2002). Nakamura i sar 2001. su takođe potvrdili efekte EMDOGAIN-a u direktnom prekrivanju pulpe zuba kod 11 vijetnamskih svinja. Oni su zaključili da je već nakon dve nedelje kod polovine uzoraka došlo do stvaranja novog tkiva nalik osteodontinu, a da je nakon osam nedelja u većini uzoraka došlo do kompletnog zatvaranja perforacije. Ustanovljeno je, takođe, da amelogenin, kao glavna komponenta EMDOGAIN-A, dovodi do povećanja koncentracije faktora rasta poreklom iz trombocita (PDGF) koji inhibira proliferaciju epitela i utiče na regeneraciju parodontalnih tkiva.

PRF kao derivat krvne plazme, dobijen je posebnim metodološkim postupkom, i sadrži mnoštvo faktora rasta (PDGF, TGF β , IGF, EGF, BMP) koji kao medijatori direktno ili indirektno regulišu rast ćelija i tkiva. Potvrđeno je takođe da primena pojedinih faktora rasta (posebno TGF β) stimuliše diferencijaciju odontoblasta i dovodi do oslobađanja endogenih faktora rasta sadržanih u organskom matriksu dentina, koji potom dodatno stimulišu dentinogenezu (Tziafas, 1994). Rezultati istraživanja Danilović i sar, 2008. gde je plazma bogata trombocitima aplikovana na amputiranu pulpu zuba majmuna su takođe pokazali da se u zonama novostvorenog dentinskog mosta uočava najveći broj ćelija sličnih odontoblastima.

Rezultati ove studije su delimično saglasni sa nalazima studije Danilović i sar 2008. Naime, i ako je došlo do formiranja kalcifikovanog tkiva u skoro svim uzorcima nakon DPP PRF-om, debljina kompletnog dentinskog mosta je bila najmanja, a morfološka reorganizacija pulpnog tkiva najzastupljenija upravo kod ovog materijala. U studiji Orhan-a i sar 2012, na eksperimentalnom

modelu pacova je takođe posle direktnog prekrivanja pulpe PRF-om i EMDOGAIN-om uočen najtanji dentinski most. Dentinski most je bio registrovan u 60% slučajeva dok su nalazi ove doktorske studije potvrdili prisustvo reparatornog dentina kod svih uzoraka, ali je struktura i morfologija tog dentina bila atipična i nepravilana.

Novija istraživanja pokazuju da su inflamatorni procesi važan preduslov za regeneraciju Pulpodentinski kompleks reaguje na medijatore inflamacije u zavisnosti od doze, pri čemu male doze povoljnije deluju na reparatorne procese, dok velike doze uzrokuje jak inflamatorni odgovor koji može dovesti do tkivnog oštećenja (Cooper et al. 2010).

Rezultati ove studije su takođe pokazali da je i primena BIODENTINA za DPP uzrokovala formiranje dentinskog mosta, odnosno dentinskih ostrvaca u oko 30% slučajeva. BIODENTIN ima sposobnost da stimuliše sekreciju TGF β 1 iz ćelija pulpe koji potom indukuje reparativnu dentinogenezu (Laurent P, 2012.) Laurent i sar su 2012 potvrdili statistički značajno veću količinu TGF β 1 u humanoj kulturi ćelija nakon aplikacije BIODENTINA u odnosu na intaktne humane ćelije pulpe. Tran i sar 2012. su dokazali da nakon aplikacije Biodentina na pulpu pacova, dolazi do stvaranja centara mineralizacije već nakon 7 dana, a da se reparativni dentin jasno uočava posle 2 nedelje.

U najnovijij studiji Nowicka i sar 2015, histološkom analizom je potvrđeno da BIODENTIN nakon direktnog prekrivanja pulpe zuba 44 intaktna treća molara indikovanih za ekstrakciju dovodi do formiranja kalcifikovanog tkiva i dentinskog mosta u 50% uzoraka nakon 6 nedelja.

Odgovor pulpnog tkiva na aplikovani materijal započinje akutnim zapaljenjem (koje ne mora biti zastupljeno u svim slučajevima) ali podrazumeva vaskularnu reakciju sa infiltracijom neutrofila čiji proteolitički enzimi oštećuju lokalno tkivo (Leprince i sar 2012.)

Aplikacija svih eksperimentalnih materijala testiranih u ovom istraživanju rezultirala je zapaljenskom reakcijom koja je po svom intenzitetu bila slična reakciji nastaloj nakon aplikacije kontrolnog materijala (MTA). U najvećem broju uzoraka zapaljenska reakcija je ocenjena kao blaga, uz prisustvo manjeg broja ćelija zapaljenja lokalizovanih u blizini implantiranog

materijala. Ovakav nalaz upućuje na dobru toleranciju aplikovanih materijala od strane tkiva domaćina. Dobijeni rezultati su u skladu sa nalazima drugih autora koji su se bavili biokompatibilnošću kalcijum silikatnih cemenata (Shahravan et al.2011, Accorinte et al. 2008, Zarrabi et al 2010), EMDOGAIN-a (Nakamura et al 2001& 2002, Olsson H et al. 2005, Fransson H et al 2011, Al-Hezaimi K. et al2013), odnosno BIODENTINA (Laurent et al 2012, Tran XV et al. 2012) i PRF(Orhan et al 2012, Hiremath et al 2012).

D. Objavljeni i saopšteni radovi koji čine deo doktorske disertacije

- Naučne publikacije u časopisima međunarodnog značaja (SCI)
 1. **Popović Bajić Marijana**, Prokić Branislav, Prokić Bogomir Bolka, Jkanović Vukoman, Danilović Vesna, Živković Slavoljub (2013) Histological Evaluation of Direct Pulp Capping with Novel Nanostructural Materials Based on Active Silicate Cements and Biodentine on Pulp Tissue, ACTA VETERINARIA-BEOGRAD, vol. 63, br. 2-3, str. 347-360 (Kategorija M23)
 2. **Popović Bajić Marijana**, Danilović Vesna, Prokić Branislav, Prokić Bogomir Bolka, Manojlović Milica, Živković Slavoljub (2015). Histological effects of enamel matrix derivative on exposed dental pulp= Histološki efekti gleđnih proteina na eksponiranu pulpu zuba. Srpski arhiv za celokupno lekarstvo. 143(7-8): 397-403. DOI: 10.2298/SARH1508397P (Kategorija M23)
- Naučne publikacije u časopisima nacionalnog značaja
 1. **Popović Bajić Marijana**, Danilović Vesna, Prokić Branislav, Prokić Bogomir Bolka, Jkanović Vukoman, Živković Slavoljub. Direktno prekrivanje pulpe Biodentinom. Stomatološki glasnik Srbije. 2014;61(2) 67-74. (Kategorija M52)
- Radovi objavljeni na skupovima međunarodnog značaja
 1. **Popović Bajić Marijana**, Danilović Vesna, Prokić Branislav, Milošević Verica, Živković Slavoljub. Histological effects of Emdogain Gel on exposed dental

pulp.20th Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS)-Bukurešt, 2015.
oralna prezentacija (Kategorija M34)

2. **Popović Bajić Marijana**, Jokanović Vukoman, Danolović Vesna, Živković Slavoljub.
Histological Evaluation of Direct Pulp Capping with Novel Nanostructural Materials based on Active Silicate Cements on Pulp Tissue. 47th Meeting of the Continental European Division of the International Association for Dental Research (CED-IADR)- Belek-Antalija 2015.- poster prezentacija (Kategorija M34)

E. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija "**UTICAJ AMELOGENINA, FAKTORA RASTA I NOVIH NANOSTRUKTURNIH MATERIJALA NA BAZI KALCIJUM SILIKATNIH CEMENATA NA REGENERACIJU PULPE**" dr Marijane Popović Bajić predstavlja značajan i originalan naučni doprinos u istraživanjima regenerativnih efekata novih materijala na pulpno tkivo eksperimentalnih životinja u terapijskom postupku direktnog prekrivanja pulpe.

Imajući u vidu da još uvek na tržištu ne postoji idealan materijal za direktno prekrivanje pulpe, ova disertacija je dala veoma interesantna i značajna naučna saznanja o efektima materijala na bazi kalcijum silikata, materijala na bazi glednih proteina, materijala bogatih faktorima rasta, odnosno efektima novosintetisanih nanostrukturnih materijala na regenerativne sposobnosti oštećenog pulpnog tkiva.


U radu su primenjene savremene eksperimentalne metode provere novih materijala koje odgovaraju postavljenim ciljevima, a dobijena saznanja mogu značajno uticati na razvoj novih, ali i pravilan izbor najefikasnijih materijala u terapiji oštećenog pulpodentinskog kompleksa.

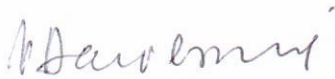
Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog i eksperimentalnog istraživanja, sa precizno definisanim ciljevima, originalnim naučnim pristupom, aktuelnom metodologijom rada, adekvatno prikazanim i diskutovanim rezultatima i jasno uobličanim zaključcima.

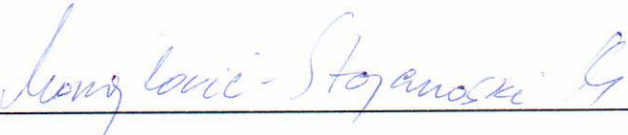
Na osnovu svega navedenog, a imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija jednoglasno i sa zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati pozitivan izveštaj doktorske disertacije dr Marijane Popović Bajić pod nazivom " **UTICAJ AMELOGENINA, FAKTORA RASTA I NOVIH NANOSTRUKTURNIH MATERIJALA NA BAZI KALCIJUM SILIKATNIH CEMENATA NA REGENERACIJU PULPE**" i odobri njenu javnu odbranu.

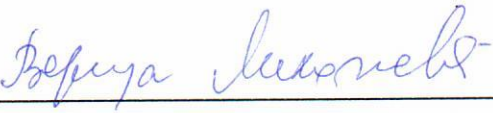
Beograd, 29.oktobar 2015.

Članovi komisije:

1. 

Prof. dr Đurica Grga
Stomatološki fakultet, Beograd
2. 

Prof. dr Vesna Danilović
Stomatološki fakultet, Beograd
3. 

Dr Milica Manojlović-Stojanoski
naučni savetnik, Institut za biološka
istraživanja " Siniša Stanković", Beograd
4. 

Dr Verica Milošević
naučni savetnik, Institut za biološka
istraživanja "Siniša Stanković", Beograd