

3
4 IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE
5

6
7 I PODACI O KOMISIJI:

8
9 1. Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju:

10
11 26. 04. 2017. godine; Naučno-nastavno veće Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta
12 u Beogradu – 176. sednica
13

14 2. Sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, zvanja, naziva uže
15 naučne oblasti za koju je izabran u zvanje, godinom izbora u zvanje i naziv fakulteta,
16 ustanove u kojoj je član komisije zaposlen:

- 17
18 1. dr Nikola Krstić, red. profesor; Radiološka, ultrazvučna i endoskopska dijagnostika, 2008.
19 godine; Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
20 2. dr Vera Todorović, red. profesor; Bazična i pretklinička stomatologija, 2009. godine;
21 Stomatološki fakultet Pančevo Univerziteta "Privredna akademija", Novi Sad; Medicinski
22 fakultet Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu
23 3. dr Jugoslav Vasić, red. profesor; Opšta hirurgija, anesteziologija, ortopedija, 2000.
24 godine; Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
25 4. dr Danica Marković, vanr. profesor; Histologija i embriologija, 2017. godine; Fakultet
26 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
27 5. dr Marko Daković, docent; Fizička hemija – radiohemija i nuklearna hemija, 2013. godine;
28 Fakultet za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu
29
30

31 II PODACI O KANDIDATU:

32
33 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime:

34
35 Bogomir Bolka, Branislav, Prokić
36

37 2. Datum rođenja, opština, Republika:

38
39 21. 05. 1982., Savski Venac, Beograd, Republika Srbija
40

41 3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze*:

42 -

43 4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka*:

44 -
45
46

47 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:

48
49 "Ispitivanje biokompatibilnosti funkcionalizovanih karbonskih vlakana u potkožnom i
50 mišićnom tkivu kunića"
51
52

53 IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broj strana poglavlja, slika, šema,
54 grafikona i sl.):
55

56 Doktorska disertacija kandidata Bogomira Bolke Prokića, dr vet. med., napisana je na
57 ukupno 205 stranica kompjuterski otkucanog teksta (*Times New Roman*, font 12, prored 1,5) i
58 sadrži sledeća poglavlja: Uvod (dve str.), Pregled literature (57 str.), Cilj i zadaci istraživanja
59 (dve str.), Materijal i metode istraživanja (21 str.), Rezultati istraživanja (65 str.), Diskusija (30
60 str.), Zaključci (3 str.), Literatura (25 str.) i Kratak sadržaj na srpskom i engleskom jeziku.

1 Disertacija je dokumentovana sa 52 tabele, 18 grafikona i 72 slike. Od navedenog broja,
2 poglavlje Rezultati istraživanja sadrži 43 tabele, 13 grafikona i 48 slika (među kojima je 18
3 kompozitnih slika).

4
5 **V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis**
6 **svakog poglavlja disertacije: uvoda, pregleda literature, cilja i zadataka istraživanja,**
7 **materijal i metoda, rezultata, diskusije, spiska referenci):**

8
9 U **Uvodu** doktorske disertacije kandidat je izneo različite stavove o biokompatibilnosti
10 karbonskih vlakana (KV) i značaju razvijanja novih hemijskih metoda u cilju funkcionalizacije
11 poroznih površina ugljeničnih implantata.

12 Biokompatibilnost KV bila je predmet istraživanja brojnih studija, od vremena njihove
13 prve primene u medicini i veterinarskoj medicini (sedamdesetih godina prošlog veka) pa sve
14 do danas. Neki od istraživača zaključili su da su KV biokompatibilna i da podstiču rast tkiva.
15 Međutim, većina radova ne pruža dovoljno podataka o biokompatibilnosti KV i smatra se da je
16 to jedan od ključnih razloga neuspeha u određenim slučajevima njihove kliničke primene.
17 Različiti stavovi o biokompatibilnosti mogu se objasniti upotrebom različitih tipova karbonskih
18 vlakana u pogledu njihovih fizičkih, strukturnih i hemijskih svojstava. Istraživanja su pokazala
19 da ćelijski odgovor na vlaknaste karbonizovane materijale zavisi od stepena kristalizacije
20 materijala. Visokokristalizirana KV sa velikim modulom nisu pogodna za medicinsku upotrebu,
21 dok su amorfná vlakna odlična za implantaciju. Neki radovi su pokazali da toksičnost
22 karbonskih materijala zavisi od dimenzije vlakana i da već nakon 24 h u ćelijskim kulturama
23 karbonske nanotube pokazuju povećanu citotoksičnost u poređenju sa drugim karbonskim
24 vlaknima i nanovlaknima. Stoga se u humanoj i veterinarskoj medicini mogu upotrebljavati
25 samo selekcionirani tipovi KV. Ukoliko se radi o vrsti biokompatibilnih KV, ona nisu biološki
26 aktivna u onoj meri u kojoj su to biostaklo ili biokeramika, tako da modifikacija površine KV
27 stiče sve veću primenu. Načini modifikacije su različiti, od oblaganja keramičkim česticama
28 hidroksiapatita i pirolitičkog karbona radi bolje adhezije za okolnu kost, do modifikacije
29 aktivnih hemijskih grupa na površini KV. Da bi se postigla maksimalna iskoristljivost
30 biokompatibilnih osobina ugljenika, potrebno je razviti nove hemijske metode u cilju
31 funkcionalizacije poroznih površina ugljeničnih implantata. Pažljiva oksidacija poboljšava
32 efekat vlaženja pora i povećava broj mikropora i površinu ugljenika. Za oksidaciju ugljeničnih
33 materijala najčešće se upotrebljava koncentrisana ili razblažena azotna kiselina. Oksidacija
34 površine ugljenika azotnom kiselinom (HNO_3) je vrlo efikasan proces koji se koristi za
35 stvaranje površinskih funkcionalnih, odnosno karboksilnih grupa. Suprotno tome je tretiranje
36 površine karbonskih materijala bazama, kao što je kalijum hidroksid (KOH).

37
38 Poglavlje **Pregled literature** sastoji se iz pet celina: 1) Istorijat - transplantacije, prve
39 upotrebe prirodnih i sintetskih materijala u tkivnoj regeneraciji i pojam biomaterijala; 2)
40 Ugljenični (karbonski) materijali; 3) Karbonska vlakna; 4) Biokompatibilnost materijala
41 uključujući karbonska vlakna; 5) Primena karbonskih vlakana u rekonstrukciji tkiva u humanoj
42 i veterinarskoj medicini.

43 Prvi deo Pregleda literature sadrži istorijske podatke o upotrebi prirodnih i sintetskih
44 materijala u regeneraciji i rekonstrukciji tkiva i pojam biokompatibilnosti.

45 Drudi deo odnosi se na sažet opis karbonskih materijala – posebno grafita i karbona.

46 Treći deo sadrži detaljni opis dosadašnjih saznanja o karbonskim vlaknima,
47 uključujući istorijat, strukturu, načine dobijanja (proizvodnju od PAN-a, katranske smole i
48 otpadnih vlaknastih materijala) i osobine (gustina, čvrstoća, modul elastičnosti i zatezni
49 modul, rezistentnost na koroziju i hemijska stabilnost, električna sprovodljivost, otpornost na
50 zamor, zapaljivost, toplotna sprovodljivost, koeficijent termalne ekspanzije, toksičnost,
51 biološka inertnost i propustljivost za X-zrake).

52 U četvrtom delu razmatraju se pojam biokompatibilnosti generalno, standardi za
53 ispitivanje biokompatibilnosti, testovi biokompatibilnosti i posebno problemi vezani za
54 biokompatibilnost KV. Biokompatibilnost se definiše kao sposobnost materijala da nakon
55 aplikacije obavlja određenu funkciju u organizmu ne izazivajući neželjeni odgovor tkiva
56 domaćina. Ona podrazumeva harmoniju međusobne interakcije tkiva domaćina,
57 implantiranog materijala i funkcije koju obavlja, pri čemu se reakcija tkiva domaćina zadržava
58 u granicama tolerancije. Glavni cilj standardizacije procedura za ispitivanje biokompatibilnosti
59 jeste poboljšanje reproduktivnosti i mogućnost ponavljanja testova, kao i lakša komparacija
60 rezultata dobijenih u različitim laboratorijama. U ugljenične materijale spadaju svi prirodni i

1 veštački proizvodi koji se sastoje od preko 90% ugljenika i koji u osnovi imaju slojevitu,
2 grafitnu strukturu. U poslednjih trideset godina razvijen je niz tehnologija dobijanja
3 savremenih ugljeničnih materijala sa širokim spektrom osobina koje određuju njihovu
4 primenu. Ako se prilikom procesa dobijanja ugljeničnih materijala favorizuje jedna ili više
5 kombinacija specifičnih karakteristika ugljenične strukture, moguće je proizvesti ugljenične
6 materijale sa različitim osobinama. Danas se u medicini koristi niz različitih ugljeničnih
7 materijala. Među ovim materijalima najznačajniji su: elektrografit, elektrografit impregnisani
8 organskim polimerima ili silicijumom, pirokarbon, staklasti ugljenik, ugljenična vlakna i karbon-
9 karbon kompoziti. Od svih reakcija organizma na strano telo najbrži letalni proces je
10 zgrušavanje krvi na površini stranog tela. Krajem šezdesetih godina je slučajno primećeno da
11 površine nekih ugljeničnih materijala imaju dragocenu osobinu da ne izazivaju koagulaciju.
12 Posle ovog otkrića, započela su proučavanja veze između brzine koagulacije krvi na površini
13 ugljeničnih materijala i kristalne strukture, izgleda i hemijskih karakteristika površine.
14 Višegodišnja istraživanja u laboratorijskim uslovima, na životinjama i u kliničkom radu
15 pokazala su da su ugljenični materijali tromboresistentni, mada promene na njihovoj površini
16 koja dolazi u kontakt sa krvlju, nisu još uvek potpuno objašnjene. Ispitivanje
17 biokompatibilnosti ugljeničnih materijala implantiranih u meka tkiva ili kost nisu dala definitivne
18 rezultate. Mnogi autori dobru biokompatibilnost ugljeničnih materijala objašnjavaju činjenicom
19 da je ugljenik jedan od osnovnih sastojaka organskih materija od kojih je izgrađen organizam.

20 U petom delu dat je prikaz dosadašnje primene karbonskih vlakana u regeneraciji i
21 rekonstrukciji tkiva u humanoj i veterinarskoj medicini. Danas se ugljenični materijali koriste u
22 kardiovaskularnoj hirurgiji za izradu srčanih zalistaka, ortopediji [sanacija odlomnih fraktura,
23 zamena delova kosti, hirurgija zglobova (karbonske endoproteze), tetiva i ligamenata
24 (kompletna zamena ili poboljšanje poremećene strukture, elastičnosti i jačine tetiva i
25 ligamenata)], hirurgiji neurokranijuma (sanacija defekta pljosnatih kostiju lica i svoda lobanje),
26 hirurgiji mekih tkiva (rekonstrukcija defekta potkožnog i mišićnog tkiva, hirurgija hernija -
27 izrada karbonskih mrežica i primena u stomatologiji (izrada ležišta nosača zuba).

28
29 Polazeći od svih napred iznetih činjenica, kandidat u poglavlju **Cilj i zadaci**
30 **istraživanja**, ističe da je cilj ove doktorske disertacije bio da se ispita da li se menja
31 biokompatibilnost (procenjena testovima u *in vivo* i *in vitro* uslovima) tzv. funkcionalizovanih
32 karbonskih vlakana tretiranih bazom ili kiselinom, u odnosu na standardna karbonska vlakna.
33 U cilju realizacije ispitivanja postavljeni su sledeći zadaci:

- 34 1. da se odrede fizičko-hemijske karakteristike funkcionalizovanih karbonskih vlakana
35 tretiranih s KOH i HNO₃,
- 36 2. da se ispita citotoksičnost standardnih, netretiranih i funkcionalizovanih karbonskih
37 vlakana na određenim ćelijskim linijama,
- 38 3. da se utvrdi efekat navedenih vlakana na funkciju makrofaga u uslovima *ex vivo*
39 (na ćelijskoj liniji), uključujući fagocitozu fragmenata vlakana i produkciju proinformatornih
40 citokina (faktora tumorske nekroze alfa, TNF- α ; interleukina 1-beta, IL-1 β ; IL-6 i IL-8),
- 41 4. da se MRI dijagnostikom izvrši egzaktna evaluacija tkivnih manifestacija izazvanih
42 implantacijom karbonskih vlakana u potkožno i mišićno tkivo eksperimentalnih životinja,
43 (detekcija implantata, analiza interakcije tkivo-implantat, procena širine polja upale) i obavi
44 komparacija s rezultatima histopatoloških ispitivanja,
- 45 5. da se utvrdi tkivni iritacioni indeks potkožnog i poprečnoprugastog mišićnog tkiva,
46 kao osnovna mera odgovora tkiva na implantirane materijale.

47 Kandidat ističe da ova studija treba da da odgovor na pitanje da li funkcionalizovana
48 karbonska vlakna opravdavaju zahteve biokompatibilnih materijala i da li na osnovu dobijenih
49 rezultata postoji mogućnost kliničke primene funkcionalizovanih ugljeničnih vlakana u sanaciji
50 oštećenja mekog tkiva abdominalnog zida životinja, čime bi se znatno proširio spektar
51 hirurških metoda u lečenju povreda abdominalnog zida u veterinarskoj medicini.

52
53 Poglavlje **Materijal i metode istraživanja**, podeljeno je na 8 podpoglavlja u okviru
54 kojih je kandidat detaljno opisao: 1) karakteristike standardnih komercijalnih KV korišćenih u
55 eksperimentu; 2) dobijanje funkcionalizovanih karbonskih vlakana i njihovu karakterizaciju; 3)
56 eksperimentalne životinje i proceduru implantacije karbonskih vlakana; 4) ispitivanje
57 citotoksičnosti; 5) nuklearnu magnetnu rezonancu; 6) patohistološka ispitivanja, 7)
58 morfometrijska ispitivanja i 7) statističku obradu rezultata.

59 Što se tiče prvog dela Materijala i metoda istraživanja, koji se odnosi na
60 **karakteristike standardnih komercijalnih vlakana** korišćenih u eksperimentu, upotrebljena

1 su komercijalna visokočvrsta KV marke *Torayca* (T300B, 6000-50B, N° 2610622, Japan).
2 Vlakna imaju 6000 filamenata u jednom snopu, zatezna čvrtstoća im je 3.530 MPa tj. 360
3 kgf/mm², zatezni modul 230 GPa tj. 23500 kgf/mm², elongacija 1,5%, masa po jedinici dužine
4 tex 396 g/1000 m i gustina 1,76 g/cm³.

5 U drugom delu koji se odnosi na **dobijanje funkcionalizovanih karbonskih vlakana**
6 **i njihovu karakterizaciju**, opisan je način tretiranja KV u cilju promene površinskih grupa i
7 dobijanja funkcionalizovanih KV, sa KOH – „bazna vlakna”; ili sa HNO₃ – „kisela vlakna”.
8 Takođe detaljno je opisano i pripremanje implantata, sastavljenog od 8 snopova ugljeničnih
9 vlakana, pri čemu je jedan snop sadržao 6000 vlakana, što znači da se u jednom implantatu
10 nalazilo 48000 vlakana. Vlakna su pomoću epoksi-smole fiksirana na jednom kraju u obliku
11 vrha strele da bi se omogućilo lakše tretiranje vlakana reagensima, sušenje, sterilizacija i
12 manipulacija tokom operativnog zahvata. U cilju karakterizacije funkcionalizovanih karbonskih
13 vlakana određivani su tačka nultog naelektrisanja (engl. Point of Zero Charge – PZC)
14 metodom masene titracije, kao i količina kiselih i baznih površinskih grupa metodom
15 kiselo/bazne titracije.

16 U trećem delu opisani su **plan eksperimenta na kunićima** (varijetet činčila), **mesto i**
17 **hirurška tehnika implantacije i monitoring životinja u toku perioda praćenja**. Za
18 implantaciju karbonskih vlakana u potkožno i mišićno tkivo životinja korišćeni su
19 eksperimentalni kunići (varijetet činčila), pol muški, starosti od 3 do 4 meseca, težine oko 2
20 kg. U eksperimentu je bilo ukupno 24 životinje. Životinje sa subkutano i intramuskularno
21 implantiranim KV, podeljene su u IV grupe, u zavisnosti od vremena žrtvovanja nakon
22 implantacije (7, 14, 21 i 28. dan). U svakoj grupi nalazilo se po 3 jedinke, a eksperiment je
23 izveden dva puta, što znači da je u svakoj grupi bilo ukupno do 6 životinja. Implantati su
24 plasirani u leđni mišić (torakalni i lumbalni deo *longissimus dorsi* levo i desno) i potkožno tkivo
25 (neposredno iza poslednjeg rebra u sredini bočnog dela abdominalnog zida, levo i desno).
26 Plasiranje implantata u mišić i potkožno tkivo je izvedeno sa minimalnim stepenom
27 invazivnosti po tkivo, korišćenjem odgovarajućih instrumenata za preparisanje tkiva i
28 postavljanje implantata na željeno mesto. Eksperimentalne životinje su bile pod konstantnim
29 monitoringom tokom pripreme i trajanja operativnog zahvata. U cilju monitoringa korišćen je
30 aparat *Votem v7 Veterinary Monitor* (Votem, Korea). Praćeni su rad srca, respiracija,
31 saturacija, telesna temperatura i krvni pritisak.

32 U četvrtom delu prikazani su materijal i metode rada u vezi sa **ispitivanjem**
33 **citotoksičnosti**. Cilj ovog dela istraživanja je bio da se uporedi citotoksičnost modifikovanih
34 (kiselih i baznih) i standardnih karbonskih vlakana **na humanim fibroblastima pluća**
35 **kontinuirane ćelijske linije MRC-5** (ATTC, Rockville, MA, USA). Citotoksičnost KV
36 određivana je analizom njihovog uticaja na **vijabilnost** (MTT-test) i **adheziju ćelija**
37 (trodimenzionalna-3D kultivacija ćelija u "Matrigel"-u). MTT test je kvantitativna kolorimetrijska
38 metoda koja se koristi za određivanje vijabilnosti ćelija. Ova metoda se zasniva na
39 sposobnosti mitohondrijske dehidrogenaze da redukuje žuti 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-
40 difeniltetrazolijum-bromid (MTT) u ljubičasti formazan. Reakcija se odvija samo u živim
41 ćelijama u kojima su dehidrogenaze aktivne pa je količina dobijenog formazana
42 proporcionalna broju vijabilnih ćelija. Za ovaj esej 3×10^4 MRC-5 ćelija zasejano je u svaki
43 bunarić mikrotitarske ploče površine 1,88 cm². Vlakna (standardna, bazna ili kisela) su dodata
44 u kulture 18 sati nakon zasejavanja u različitim koncentracijama (0,1 mg ili 0,5 mg po mililitru
45 medijuma) u triplikatu. Sledećeg dana (24 sata od početka tretmana) ćelijama je zamenjen
46 medijum i kultivisane su dodatnih 18 sati u standardnim uslovima. Nakon toga, medijum je
47 odstranjen, a ćelije su inkubirane 2 sata na 37°C u MTT rastvoru finalne koncentracije 0,5
48 mg/ml. Po isteku inkubacije, MTT rastvor je uklonjen i dodat je DMSO (dimetil-sulfoksid) koji
49 je omogućio oslobađanje formazana iz ćelija. Apsorbanca je merena u *microplate reader*
50 aparatu tipa *Tecan* (Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland) na talasnoj dužini od 550 nm.
51 Matrigel (engl. Basement Membrane Matrix, *BD Bioscience*) je solubilni ekstrakt bazalne
52 membrane izolovane iz *Engelbreth-Holm-Swarm* (ESH) sarkoma miša, tumora koji je bogat
53 proteinima ekstracelularnog matriksa. Pored laminina, kao glavne komponente, Matrigel
54 sadrži i kolagen tipa IV, heparan-sulfat proteoglikan entaktin/nidogen, faktor transformacije
55 rasta -β (TGF-β), epidermalni faktor rasta (EGF), faktor rasta sličan insulinu (IGF), faktor rasta
56 fibroblasta (FGF), tkivni aktivator plazminogena (TPA) i druge faktore. MRC-5 ćelije (3×10^4)
57 su resuspendovane u Matrigelu zajedno sa KV. Zatim su ćelije zasejane i gajene 30 min. u
58 inkubatoru na 37° C. Nakon toga, ćelijama je dodat medijum za gajenje ćelija. Tri-D strukture
59 su gajene u standardnim uslovima narednih 72 sata. Ćelije su analizirane i fotografisane.
60 Osim napred navedenog, ispitivan je i efekat standardnih i funkcionalizovanih KV na

1 **vijabilnost i funkciju humane makrofagne linije U937** (ATTC, Rockville, MA, USA).
2 Određivani su: **relativna vijabilnost ćelija** u kulturama bojenjem sa tripan-plavim,
3 **internalizacija karbonskih vlakana (% ćelija sa fagocitovanim partikulama, analizom**
4 **nativnih kultura)** i **koncentracija citokina** u supernatantu – **TNF- α , IL-1 β , IL-6 i IL-8**, u
5 supernatantima kultura pomoću *Citomix-a* i protočne citometrije. U bazene plastičnih ploča
6 dodate su 3 različite koncentracije karbonskih vlakana (500, 250 i 125 $\mu\text{g/ml}$) nakon čega su
7 ćelije U937 kultivisane 48 časova. Bazeni sa ćelijama bez KV služili su kao kontrola. Sve
8 kulture su rađene u triplicatima. Kulture su pažljivo isprane radi uklanjanja krupnijih partikula
9 vlakana, a adherentne ćelije su fotografisane pod invertnim mikroskopom i analizirane radi
10 identifikacije ćelija sa fagocitovanim mikropartikulama KV. Nakon toga su sakupljene,
11 centrifugirane i izbrojane. Brojane su vijabilne ćelije korišćenjem 1% rastvora **tripan- plavog**.
12 Relativni **procenat vijabilnih ćelija** u kulturama sa KV izračunat je u odnosu na kontrolne
13 kulture (vijabilnost uzeta kao 100%). Od ćelija su napravljeni citospin-preparati, obojeni po
14 May-Grünwald-Giemsma i analizirani pod svetlosnim mikroskopom radi **procene**
15 **fagocitovanih partikula** KV. Supernatanti su centrifugirani a zatim smrznuti na -70°C do
16 određivanja nivoa citokina. Citokini–**TNF- α , IL-1 β , IL-6 i IL-8**, određeni su u supernatantima
17 pomoću *Citomix-a* i protočne citometrije, kako je već istaknuto ranije.

18 U petom delu poglavlja Materijal i metode, prikazano je praćenje materijala u
19 implantiranim zonama u različitim vremenskim intervalima nakon implantacije na **nuklearnoj**
20 **magnetnoj rezonanci-NMR** (engl. Magnetic Resonance Imaging, MRI). Naime, NMR
21 praćena je pozicija implantata u tkivu i reakcija okolnog tkiva na implantirana vlakna.
22 Implantati ne daju signal na magnetnoj rezonanci jer nemaju pokretne atome vodonika.
23 Stepen reakcije tkiva neposredno uz sam implantat, kao i eventualne promene signala tkiva
24 oko implantata uočavale su se u vidu promene intenziteta signala, hipointenzivnog i
25 hiperintenzivnog. Promena jačine signala zavisi od količine vodonikovih jona u tkivu, tako da
26 se može kontrolisati reakcija okolnog tkiva na implantat, kao i stepen reakcije. Pregled
27 životinja NMR rađen je 1, 2, 3 i 4. nedelje nakon operativnog zahvata, na aparatu 1.5 T
28 imager (*Avanto, Siemens, Nemačka*), komercijalnom zavojnicom za koleno. Korišćene su dve
29 MRI sekvence, *Turbo spin echo T1W* (TR =820 ms, TE =11 ms) i *T2W* (TR = 8620 ms, TE =
30 81 ms), kao i sekvence za optimizaciju protokola snimanja, *T2W TrueFISP*, *T2W SPACE*, i
31 *T1W FLASH*. Životinje su za potrebe pregleda podvrgnute opštoj anesteziji u trajanju od 45
32 minuta. Lekovi korišćeni za indukciju opšte anestezije su Ketamidol 10% (*Richter Pharma AG*)
33 u dozi od 35 mg/kg intramuskularno (im), u kombinaciji sa Ksilazinom (*Xylased 2%, Bioveta*)
34 5mg/kg im. Životinjama je nakon nativnog snimanja dato kontrastno sredstvo Gd-DTPA
35 (*Schering, Nemačka*) u v. *saphena magna* u dozi od 0,2 mmol/kg. Pre snimanja životinja
36 izrađeni su gel-fantomi radi optimizacije tehnike snimanja. Gel-fantomi često služe kao
37 imitacija mekih tkiva na NMR i za ocenu artefakata koje proizvode implantati. Fantomi su
38 izrađeni od 2 % agar-agar gela u plastičnim bocama od 300 ml u koje su postavljeni ispitivani
39 implantati – netretirana KV, vlakna tretirana bazom i vlakna tretirana kiselinom. Sve tri vrste
40 KV su postavljene u uspravan položaj, a fantomi su napravljeni 36 sati pre snimanja NMR.
41 Rezultati ispitivanja NMR poređeni su sa rezultatima histopatološke analize uzoraka tkiva
42 dobijenih nakon žrtvovanja životinja.

43 U šestom delu prikazana su **patohistološka ispitivanja**. Nakon žrtvovanja životinja u
44 svakom od eksperimentalnih termina (7, 14, 21 i 28. dana), uzimani su uzorci tkiva iz
45 odgovarajućih zona implantacije (potkožno tkivo i mišić), kao i kontrolni uzorci tkiva iz zdravih
46 zona udaljenih od mesta implantacije. Prilikom uzimanja potkožnog tkiva sa mesta
47 implantacije, uzimani su i pregledani i uzorci kože iznad mesta implantacije. Materijal za
48 patohistološku analizu pripreman je na standardan način. Uzorci su fiksirani u 4% neutralnom
49 puferisanom rastvoru formaldehida, a potom su dalje pripremani rutinskom procedurom i
50 kalupljeni u parafinu/paraplastu (*Bio-Plast plus, BioOptica, Italy*). Tkivni preseki bojeni su
51 standardnim postupkom bojenja **hematoksilin-eozinom, trihromskim bojenjem po**
52 **Weigert-Van Giesonu, AZAN trihromskim bojenjem i bojenjem po Gordon-Sweetu za**
53 **retikularna vlakna**. Za bojenje su korišćeni komercijalni kitovi proizvođača *Bio-Optica*
54 (*Wiegert-Van Gieson for elastic fibers and connectivum-long method 04-051802; Azan*
55 *trichrome 04-001802; Gordon-Sweet method for reticular fibres 04-040802; Strumentazioni*
56 *Scientifiche, Milano, Italy*) i poštovani su protokoli za upotrebu kitova. Na osnovu celokupnog
57 patohistološkog nalaza, a u skladu sa protokolima međunarodnog standarda ISO 10993-6:
58 2007 i ISO-10993-10: 2002, sa odgovarajućim izmenama, procenjuvan je **indeks tkivne**
59 **iritacije (iritacioni indeks, Irl)**. Primenjeni standardi uključivali su testiranja i procenu lokalne
60 reakcije tkiva na mestu gde je implantiran ispitivani materijal. Semikvantitativna procena

1 histoloških promena mekog tkiva (subkutisa) kod kunića sa implantiranim KV obuhvatala je
2 promenu epitela (od normalnog epitela, preko ćelijske degeneracije, metaplazije i fokalnih
3 erozija, do generalizovanih erozija), procenu stepena infiltracije leukocita, prisustvo
4 vaskularne kongestije i edema. Takođe, registrovano je i prisustvo kapsule, kao i njena
5 debljina. Slična procena odnosila se i na mišićno tkivo. Na osnovu procene svih navedenih
6 parametara izračunat je iritacioni indeks (Irl), kao mera težine oštećenja tkiva na mestu
7 implantacije KV.

8 Sedmi deo odnosi se na **morfometrijska ispitivanja**. Sva merenja izvršena su na
9 mikroskopu *Leica DMSL*, uz pomoć kamere i softverskog sistema *Leica Interactive*
10 *Measurements (Leica Microsystems GmbH, Frangfurt, Germany)*. Morfometrijske metode
11 podrazumevale su određivanje broja inflamatornih ćelija i fibroblasta po jedinici površine tkiva
12 sa implantiranim karbonskim vlaknima, neposredno u zoni implantacije. U slučaju postojanja
13 fibrozne kapsule oko implantiranog materijala, merena je njena debljina, na deset nasumično
14 izabranih mesta i izražavana kao srednja vrednost izvršenih merenja. Te vrednosti poslužile
15 su da se u proceni debljine kapsule i jačine inflamatornog infiltrata u okviru spomenutog ISO
16 standardna izabere određena ponuđena kategorija. Takođe, određivani su broj fragmentata
17 kao i njihova dužina u uzorcima u kojima je registrovana fragmentacija implantiranih vlakana.
18 Ove morfometrijske vrednosti određivane su na celoj površini tkivnog preseka, pri uvećanju
19 20x.

20 Osmi deo odnosi se na **statističku obradu rezultata** istraživanja. Od podataka
21 prikupljenih eksperimentalnim istraživanjem formirana je datoteka u statističkom
22 programskom paketu *SPSS 20 (IBM korp.)* uz pomoć kojeg su podaci i analizirani. Svi
23 rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD. Minimalni nivo statističke značajnosti je
24 ustanovljen na $p < 0,05$. Primenjene su metode deskriptivne i analitičke statistike. Od
25 deskriptivnih statističkih metoda korišćene su mere centralne tendencije i mere varijabiliteta, a
26 od analitičkih statističkih metoda korišćena je, u okviru generalnog linearnog modela, analiza
27 varijanse za ponovljena merenja. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički. U statističkoj
28 obradi koncentracije citokina u supernatantima humane makrofagne linije U937, nakon
29 dodavanja karbonskih vlakana, perimenjeni su ANOVA i Studentov t-test.

30 Sve morfometrijske i stereološke analize dobijene kompjuterizovanim programom
31 (*Leica Interactive Measurements, Leica Microsystems GmbH, Frangfurt, Germany*),
32 obrađene su statističkim programom po Kolmogorov-Smirnovom testu, gde je homogenost
33 varijansi procenjena F-testom. Kraskal-Volisovim testom upoređivane su razlike u dužini
34 fragmentisanih vlakana između grupa. Minimalni nivo statističke značajnosti ustanovljen je na
35 $p < 0,05$.

36
37 U poglavlju **Rezultati**, kandidat je vrlo pregledno i detaljno prikazao rezultate
38 istraživanja, kroz sledeće celine: 1) karakteristike funkcionalizovanih kiselih i baznih
39 karbonskih vlakana; 2) citotoksičnost standardnih i funkcionalizovanih kiselih i baznih
40 karbonskih vlakana, 3) NMR implantirane zone sa karbonskim vlaknima; 4) patohistološka i
41 morfometrijska ispitivanja.

42 Što se tiče **karakteristika funkcionalizovanih kiselih i baznih karbonskih**
43 **vlakana**, PZC određivana je metodom masene titracije, a količina kiselih i baznih površinskih
44 grupa metodom kiselo/bazne titracije, kao što je istaknuto ranije. Rezultati promene
45 površinskih grupa dejstvom HNO_3 i KOH pokazali su značajno izmenjen sadržaj površinskih
46 grupa kod vlakana tretiranih azotnom kiselinom u odnosu na vlakna tretirana kalijum-
47 hidroksidom: kiselina vlakna imala su na svojoj površini 0,5135 mmol/g kiselih grupa, a baznih
48 0,3040 mmol/g; bazna vlakna imala su na svojoj površini 0,1011 mmol/g kiselih grupa, a
49 baznih 0,3843 mmol/g. Odnos kiselih prema baznim površinskim grupama je kod kiselih
50 vlakana bio 1,7, a kod baznih 0,3, dok je PZC za ove dve grupe funkcionalizovanih vlakana
51 bila 5,3 i 8,5.

52 Ispitivanje **citotoksičnosti vlakana** na morfološki izgled humanih **fibroblasta**
53 **kontinuirane ćelijske linije MRC-5**, kojima su dodata karbonska vlakna u različitim
54 koncentracijama (100 $\mu\text{g/ml}$ i 500 $\mu\text{g/ml}$ medijuma za kultivisanje), kao i rezultati
55 kalorimetrijskog MTT, pokazali su da se broj vijabilnih ćelija nije statistički značajno promenio
56 u zavisnosti od vrste i koncentracije prisutnih vlakana, 24 sata nakon dodavanja vlakana u
57 medijum za ćelijsku kulturu. Takođe, sličnu adherenciju fibroblasta za podlogu u 3D
58 strukturama formiranim u Matrigelu, prouzrokovala su i standardna i funkcionalizovana
59 karbonska vlakna: MRC-5 ćelije su adherirale i za kiselo- i bazno- modifikovana KV oko kojih
60 su formirale tzv. „ćelijski omotač“, a slično su se ponašale i ćelije u odnosu na standardna KV.

1 Međutim, drugačiji rezultati u pogledu citotoksičnosti dobijeni su ispitivanjem
2 **vijabilnosti ćelija u kulturi humane makrofagne linije U937**, nakon dodavanja KV različite
3 vrste i koncentracije. Relativna vijabilnost ćelija bila je veoma slična kontrolnim vrednostima i
4 nepromenjena u kulturama humane makrofagne linije U937, nakon dodavanja 125 µg/ml
5 karbonskih vlakana, bilo da se radilo o standardnim vlaknima (98,2±3,9%), ili vlaknima
6 tretiranim kiselinom (95,1±6,6) ili bazom (94,0±5,1) u odnosu na kontrolne vrednosti.
7 Međutim, dodavanjem vlakana u koncentraciji od 250 µg/ml ili 500 µg/ml, dolazi do statistički
8 značajnog linearnog smanjenja relativne vijabilnosti ćelija u kulturama sa dodatim
9 standardnim, kiselim ili baznim KV, s tim što vijabilnost ćelija generalno rapidno opada nakon
10 primene vlakana u koncentraciji od 500 µg/ml u odnosu na kontrolne vrednosti. Uočljivo je da
11 do najvećeg smanjenja vijabilnosti humanih makrofaga linije U937 prilikom primene KV u
12 koncentraciji od 250 i 500 µg/ml, dolazi nakon dodavanja baznih, potom kiselih i na kraju
13 standardnih karbonskih vlakana. Tako je npr. vijabilnost makrofaga nakon dodavanja 250
14 µg/ml baznih vlakana 76,3±4,9%, a nakon dodavanja 500 µg/ml istog tipa KV svega 22,2±
15 2,4%. Smanjenje vijabilnosti statistički je značajno za svaku grupu KV kod obe primenjene
16 doze u odnosu na kontrolne vrednosti, a u pogledu baznih KV i u odnosu na standardna KV.

17 Rezultati **internalizacije karbonskih vlakana** u kulturama humane makrofagne linije
18 U937, pri koncentraciji vlakana od 250 µg/ml kulture, pokazali su da je statistički znatno veći
19 broj makrofagnih ćelija fagocitovao vlakna tretirana bazom (34,9±3,8%), u odnosu na
20 fagocitozu standardnih KV (17,3±4,7%), pri čemu je postojala i statistički značajna razlika
21 između broja ćelija sa fagocitovanim partikulama baznih KV u odnosu na kisela, u korist
22 baznih vlakana (34,9±3,8% : 22,3±4,9%; p<0,05).

23 Rezultati su pokazali povećanu **koncentraciju proinflammatoryh citokina** TNF-α i
24 IL-1β u supernatantima kulture humanih makrofaga linije U937 nakon dodavanja standardnih
25 ili kiselih KV u koncentraciji od 125 µg/ml u odnosu na kontrolne vrednosti, dok je
26 dodavanje baznih KV u istoj koncentraciji uslovlilo smanjenu produkciju ovih citokina u odnosu
27 na vrednosti za kisela i standardna KV. U istoj koncentraciji, standardna KV su dovela do
28 statistički beznačajnog smanjenja IL-6 i statistički značajnog smanjenja IL-8, a kisela i bazna
29 KV do izrazito visoko statistički značajnog povećanja produkcije proinflammatoryh citokina IL-6
30 i IL-8 u odnosu na kontrolne vrednosti. Pri tome, vlakna tretirana kiselinom bila su snažniji
31 stimulator produkcije IL-8 iz makrofaga u odnosu na vlakna tretirana bazom, dok u odnosu na
32 produkciju IL-6 nije bilo razlike u stepenu stimulacije produkcije ovog citokina između kiselih i
33 baznih KV.

34 Rezultati koncentracije ispitivanih citokina nakon dodavanja standardnih, kiselih ili
35 baznih KV u koncentraciji od 250 µg/ml u kulture humanih makrofaga ćelijske linije U937,
36 znatno su se razlikovali u odnosu na efekte koje su izazivala vlakna dodata u koncentraciji od
37 125 µg/ml. Naime, ukoliko se dodaju vlakna ma koje vrste u ovoj koncentraciji, vrednosti
38 koncentracija produkovanog IL-1β bile su vrlo slične kontrolnim vrednostima. Ipak, sa niskom
39 statističkom značajnošću (p<0,05), standardna vlakna su smanjivala produkciju ovog
40 interleukina u odnosu na kontrolne vrednosti (75±8 pg/ml : 108±32 pg/ml), a bazna
41 povećavala, pri čemu je postojala niska statistička značajnost između vrednosti koncentracije
42 ovog interleukina pri primeni baznih vlakana u odnosu na standardna (113±12 pg/ml : 75±8
43 pg/ml, p<0,05). Međutim, produkcija IL-6 i IL-8 snažno je stimulirana pod uticajem
44 standardnih KV u koncentraciji od 250 µg/ml, a višestruko inhibirana nakon dodavanja kiselih
45 ili baznih KV u istoj koncentraciji, u odnosu na kontrolne vrednosti. Sve razlike bile su
46 statistički visoko značajne. Takođe, postojala je statistička značajnost razlika između
47 koncentracije IL-8 uslovljene primenom baznih i kiselih KV u odnosu na standardna. Što se
48 tiče koncentracije TNF-α, standardna KV u koncentraciji od 250 µg/ml nisu dovela do
49 promene koncentracije ovog citokina u supernatantu humane makrofagne ćelijske linije U937
50 u odnosu na kontrolne vrednosti, dok su kisela, a naročito bazna KV u istoj koncentraciji,
51 dovela do smanjenja koncentracije ovog citokina; pri tome, smanjenje sekrecije u prisustvu
52 baznih KV bilo je desetostruko manje u poređenju sa kontrolnim vrednostima.

53 **Rezultati ispitivanja NMR** reakcija mišićnog i potkožnog tkiva na implantate od
54 kiselih i baznih KV 7, 14, 21. i 28. dana nakon implantacije, pokazali su slično hiperintenzivno
55 područje oko mesta intramuskularne ili subkutane implantacije standardnih i baznih KV koje
56 se redukuje progresivno sa protokom vremena operacije, osim na neposrednoj površini
57 implantirane zone. Za razliku od toga, hiperintenzivno područje oko subkutane ili
58 intramuskularne aplikacije kiselih KV je jače u odnosu na isto oko aplikacije baznih KV, ali se
59 takođe redukuje progresivno sa protokom vremena posle implantacije. **Kontrastno snimanje**

1 **NMR** je poboljšalo pregled i potvrdilo nalaze dobijene konvencionalnim snimanjem.
2 Intravenska aplikacija kontrastnog sredstva u *v. auricularis* sprovedena je 21. dana nakon
3 operacije. Kontrastno sredstvo bilo je bazirano na gadolinijum-kompleksu, intravaskularnom
4 ekstracelularnom sredstvu, napravljenom da ograniči područja pojačane propustljivosti krvnih
5 sudova. Područja inflamacije su generalno hipointenzivna u poređenju sa okolnim tkivom,
6 osim u slučajevima nastale hemoragije gde oksihemoglobin iz eritrocita može dati blago
7 hiperintenzivnu sliku. Nakupljanje kontrasta u pojedinim tkivima je znak loše prokrvljenosti i
8 detektuje se kao zona signala jakog intenziteta, pošto gadolinijum značajno pojačava T1
9 relaksaciju zbog paramagnetičkog efekta. Posledično, široko polje pojačanog signala oko
10 intramuskularne ili potkožne implantacije kiselih karbonskih vlakana ukazuje na jaču
11 inflamaciju oko ovih implantata, dok nešto manje područje oko implantata baznih karbonskih
12 vlakana ukazuje na slabiju inflamatornu reakciju lokalizovanu pretežno na površini implantata.

13 Rezultati **patohistoloških i morfometrijskih ispitivanja** pokazali su stepen tkivne
14 iritacije kod subkutane ili intramuskularne aplikacije karbonskih vlakana tokom perioda
15 praćenja, kao i stepen fragmentacije karbonskih vlakana.

16 Praćenjem Irl kod potkožne aplikacije **standardnih KV** tokom eksperimenta,
17 pokazano je da je Irl potkožnog tkiva bio statistički značajno veći u 21. danu u odnosu na 7.
18 dan. Između ostalih merenja nije bilo statistički značajne razlike u obe ispitivane grupe
19 (subkutana i intramuskularna aplikacija standardnih KV). U slučaju intramuskularne aplikacije
20 standardnih vlakana, Irl je bio značajno veći kod intramuskularne aplikacije 7. dana nakon
21 implantacije u poređenju sa subkutanom aplikacijom, dok je 21. dana bio značajno veći kod
22 subkutane u odnosu na intramuskularnu aplikaciju u istom terminu.

23 Kod subkutane imlantacije **kiselih KV**, iritacioni indeks imao je najveću vrednost u
24 21. danu nakon implantacije i bio je statistički značajno veći nego u ostalim merenjima. Kod
25 intramuskularne aplikacije ovih vlakana najveća vrednost Irl bila je 7. dana nakon implantacije
26 i bila je statistički značajno veća nego 14. i 28. postimplantacionog dana. Nakon 7. dana od
27 implantacije kiselih KV, iritacioni indeks mišićnog tkiva bio je statistički značajno veći u
28 poređenju sa potkožnim tkivom (intramuskularna: subkutanom aplikaciji). U ostalim merenjima
29 nije bilo statistički značajne razlike između upoređenih grupa.

30 Kod subkutane implantacije **baznih KV** dobijena je statistički značajna razlika u
31 vrednostima Irl između 14. i 21. i 14. i 28. dana nakon implantacije (vrednost Irl veća je u 28.
32 danu u odnosu na 14. i 21. dan). Između ostalih merenja nije bilo statistički značajne razlike.
33 Za razliku od toga, prilikom intramuskularne aplikacije baznih KV, nije dobijena statistički
34 značajna razlika u vrednostima Irl mišićnog tkiva u različitim periodima posmatranja nakon
35 implantacije. Međutim, vrednosti Irl bile su statistički značajno veće 7. i 14. dana nakon
36 intramuskularne implantacije baznih KV u poređenju sa subkutanom aplikacijom istog tipa
37 vlakana, dok 21. i 28. dana nakon implantacije nije bilo statistički značajne razlike u vrednosti
38 Irl u zavisnosti od mesta implantacije.

39 Prilikom **poređenja rezultata istraživanja standardnih, kiselih i baznih KV u**
40 **pogledu vrednosti Irl tkiva prilikom njihove subkutane ili intramuskularne aplikacije,**
41 primenjena je, u okviru generalnog linearnog modela, analiza varijanse za ponovljena
42 merenja. Faktor „merenje“ imao je 4 gradacije: 1 - 7. dan, 2 - 14. dan, 3 - 21. dan i 4 - 28.
43 dan. Faktor „vrsta karbonskih vlakana“ imao je tri gradacije 1 - standardna KV i 2 - kiselina KV
44 i 3 - bazna KV.

45 Analizom varijanse za ponovljena merenja dobijena je visoko statistički značajna
46 razlika u vrednostima Irl subkutanog tkiva kod implantacije karbonskih vlakana po faktoru
47 merenje ($F_{\text{merenje}} = 23,306$; $p < 0,001$), tj. u zavisnosti od posmatranog perioda nakon
48 implantacije, i statistički značajna razlika po faktoru „vrsta karbonskih vlakana“ ($F_{\text{KV}} = 5,234$; p
49 $= 0,019$) i u interakciji oba faktora ($F_{\text{merenje+KV}} = 2,967$; $p = 0,016$). **Iritacioni indeks potkožnog**
50 **tkiva** kod subkutane aplikacije kiselih karbonskih vlakana bio je visoko statistički značajno
51 veći 21. dana nakon implantacije u poređenju sa istim indeksom kod subkutane aplikacije
52 baznih vlakana. U ostalim merenjima nije bilo statistički značajne razlike.

53 Analizom varijanse za ponovljena merenja dobijena je visoko statistički značajna
54 razlika u vrednostima **iritacionog indeksa mišićnog tkiva** kod primene karbonskih vlakana
55 kako u zavisnosti od posmatranog perioda nakon implantacije (po faktoru „merenje“) ($F_{\text{merenje}} =$
56 $5,786$; $p = 0,002$), tako i u zavisnosti od vrste karbonskih vlakana (faktor „vrsta karbonskih
57 vlakana“) ($F_{\text{KV}} = 16,857$; $p < 0,001$) i u interakciji oba faktora ($F_{\text{merenje+KV}} = 7,511$; $p < 0,001$). U
58 7. danu nakon intramuskularne implantacije, vrednosti iritacionog indeksa mišićnog tkiva bile
59 su statistički značajno veće kod implantacije kiselih karbonskih vlakana u odnosu na
60 standardna i bazna karbonska vlakna implantirana na identičan način. U drugom merenju, 14.

1 dana nakon intramuskularne implantacije, nije bilo statistički značajne razlike u Irl mišićnog
2 tkiva u zavisnosti od vrste implantiranih KV, dok su 21. i 28. dana nakon intramuskularne
3 implantacije, statistički značajno veće vrednosti Irl bile u grupi sa implantiranim kiselim KV u
4 poređenju sa grupom kod koje su implantirana standardna KV.

5 Patohistološkim **pregledom uzoraka srca, pluća, slezine, jetre i regionalnih**
6 **limfnih čvorova** kod životinja sa implantiranim standardnim i funkcionalizovanim KV u
7 različitim vremenima praćenja posle implantacije, nisu nađene patološke promene. Takođe,
8 treba istaći da nije primećena fagocitoza fragmenata vlakana od strane makrofagnog
9 retikuloendotelnog sistema slezine, jetre i limfnog čvora, što znači da nije bilo sistemske
10 diseminacije vlakana.

11 U cilju **procene stepena fragmentacije KV** različitih grupa, implantiranih subkutano
12 ili intramuskularno, izmerena je dužina svih fragmenata vlakana prisutnih na tkivnim
13 presecima posmatranih životinja iz odgovarajuće grupe, a taj broj kretao se prosečno od 2121
14 vlakana (grupa standardnih KV implantiranih subkutano) do 8475 vlakana (grupa kiselih KV
15 implantiranih intramuskularno). Ukupno je premerena dužina enormnog broja fragmenata
16 karbonskih vlakana – 27428 kod posmatranih životinja. Statistička obrada rezultata pokazala
17 je da su najviše bila fragmentisana intramuskularno aplikovana kisela (medijana dužine
18 fragmenata iznosila je 41,61 μm) i standardna KV (medijana dužine fragmenata je 41,17 μm),
19 a najmanje subkutano aplikovana standardna KV (medijana dužine fragmenata je 93,19 μm).
20 Generalno, intramuskularna aplikacija KV, bez obzira na tip, uslovlila je jaču fragmentaciju
21 (manja medijana dužine fragmenata) u odnosu na subkutano. To znači i da je u okviru svake
22 od ispitivanih grupa KV (standardna, kisela i bazna) intramuskularna aplikacija uslovlila
23 kidanje vlakana na manje fragmente u odnosu na potkožnu aplikaciju. Kraskal-Volisovim
24 testom dobijena je visoko statistički značajna razlika u dužini vlakana između upoređenih
25 grupa ($H = 3413,009$; $p < 0,001$). Između svih 6 upoređenih grupa postoji visoko statistički
26 značajna razlika u dužini vlakana, izuzev između kiselih i standardnih KV implantiranih i.m.
27 (testiranje međugrupnih razlika Man-Vitni U testom). Subkutano, najviše su bila
28 fragmentisana bazna KV, a medijana dužine fragmenata bila je statistički značajno manja u
29 odnosu na iste vrednosti kod kiselih i standardnih vlakana. Intramuskularno, najviše su bila
30 fragmentisana kisela KV, i ta fragmentacija (procenjena na osnovu dužine fragmenata i
31 upoređena preko medijane), bila je statistički značajno veća u odnosu na fragmentaciju
32 baznih KV aplikovanih na isti način.

33 Rezultati ispitivanja **NMR-om poređeni su sa rezultatima histopatološke analize**
34 uzoraka tkiva dobijenih nakon žrtvovanja životinja. Pažljivom komparacijom deskriptivne
35 analize zone implantacije KV na NMR, sa vrednostima iritacionog indeksa tkiva u kojima su
36 implantirana KV (dobijenim semikvantitativnom patohistološkom analizom promena u tkivu po
37 preporukama ISO standarda), konstatovano je da su se rezultati međusobno delimično slagali
38 u pogledu odgovora periimplantne zone prilikom intramuskularne ili subkutane aplikacije.
39 Generalno, postojala je intenzivnija reakcija tkiva kod primene kiselih KV u odnosu na bazna i
40 standardna nakon hirurške intervencije pri obe vrste implantacije, a naročito kod
41 intramuskularne. Međutim, dok je NMR konstatovano generalno smanjivanje inflamatorne
42 reakcije protokom vremena nakon implantacije, naročito u pogledu baznih KV,
43 patohistološkom procenom Irl, konstatovan je niz već opisanih promena u kretanju odgovora
44 tkiva na implantirani materijal u zavisnosti od načina implantacije i vremena posmatranja, koji
45 je bio daleko složeniji od nalaza dobijenih NMR, a ponekad i drugačiji: 1) kod subkutane
46 aplikacije baznih KV, indeks iritacije tkiva rastao je sa protokom vremena i bio daleko veći 21.
47 i 28. dana u odnosu na početne termine praćenja, 2) kod aplikacije standardnih i kiselih KV,
48 indeks iritacije tkiva bio je veći kod subkutane aplikacije u odnosu na intramuskularnu 21.
49 dana nakon implantacije.

50 U Poglavlju **Diskusija**, kandidat je dobijene rezultate svojih istraživanja upoređio sa
51 rezultatima sličnih istraživanja drugih autora i izneo svoja razmišljanja i objašnjenja za svaki
52 od nalaza u doktorskoj disertaciji.

53 U poglavlju **Literatura**, kandidat je dao spisak koji sadrži 275 navoda iz literature. Ti
54 navodi odnose se na značajne radove o osobinama, proizvodnji i primeni karbonskih vlakana
55 u humanoj i veterinarskoj medicini, od pionirskih istraživanja u ovoj oblasti do najaktuelnijih
56 savremenih istraživanja.

57
58
59 **VI ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj**
60 **disertaciji):**

1 Na osnovu rezultata istraživanja izvedeni su sledeći zaključci.

2 1. Značajno je izmenjen sadržaj površinskih grupa kod KV tretiranih azotnom
3 kiselinom u odnosu na vlakna tretirana kalijum-hidroksidom: kisela KV imala su na svojoj
4 površini više kiselih grupa, a bazna KV baznih. Tačka nultog naelektrisanja bila je manja kod
5 kiselih KV u odnosu na bazna.

6 2. Dodavanjem u kulture humanih fibroblasta kontinuirane ćelijske linije MRC-5
7 karbonskih vlakana u dozi od 100 i 500 $\mu\text{g/ml}$, ne dolazi do značajnih razlika u stepenu
8 citotoksičnosti (vijabilnosti ćelija i ćelijske adhezije) u zavisnosti da li su primenjena
9 standardna ili funkcionalizovana KV.

10 3. Ćelijska vijabilnost bila je nenarušena u kulturama humane makrofagne linije U937
11 ukoliko su se dodavala KV u koncentraciji od 125 $\mu\text{g/ml}$, bilo da se radilo o standardnim KV, ili
12 vlaknima tretiranim kiselinom ili bazom. Međutim, dodavanjem vlakana u koncentraciji od 250
13 $\mu\text{g/ml}$ ili 500 $\mu\text{g/ml}$, dolazilo je do značajnog dozno-zavisnog linearnog smanjenja vijabilnosti
14 ćelija kod sve tri primenjene grupe vlakana tokom vremena praćenja; pri tome najveće
15 smanjenje vijabilnosti izazivaju bazna KV i to smanjenje je značajno veće od smanjenja
16 vijabilnosti pod uticajem standardnih karbonskih vlakana.

17 4. Internalizacija vlakana dodatih u kulture humane makrofagne linije U937 u dozi od
18 250 $\mu\text{g/ml}$, zavisila je od toga da li su primenjena standardna ili funkcionalizovana KV. Znatno
19 veći broj makrofagnih ćelija fagocitovao je vlakna tretirana bazom, u odnosu na fagocitozu
20 standardnih i kiselih KV.

21 5. Postojala je povećana koncentracija proinflammatoryh citokina TNF- α i IL-1 β u
22 supernatantima kulture humanih makrofaga linije U937 nakon dodavanja standardnih ili
23 kiselih KV u koncentraciji od 125 $\mu\text{g/ml}$ u odnosu na kontrolne vrednosti, dok je dodavanje
24 baznih KV u istoj koncentraciji uslovalo smanjenu produkciju ovih citokina u odnosu na
25 vrednosti za kisela i standardna KV. U istoj koncentraciji, standardna KV su uslovala značajno
26 smanjenja sekrecije IL-8, a kisela i bazna KV izrazito povećanje sekrecije IL-6 i IL-8 u odnosu
27 na kontrolne vrednosti. Pri tome, vlakna tretirana kiselinom bila su snažniji stimulator
28 sekrecije IL-8 iz makrofaga u odnosu na vlakna tretirana bazom, dok u odnosu na produkciju
29 IL-6 nije bilo razlike u stepenu stimulacije sekrecije ovog citokina između kiselih i baznih KV.

30 6. Standardna KV dodata u kulture humanih makrofaga ćelijske linije U937 u
31 koncentraciji od 250 $\mu\text{g/ml}$ smanjivala su sekreciju IL-1 β u odnosu na kontrolne vrednosti, a
32 bazna povećavala. Međutim, produkcija IL-6 i IL-8 snažno je stimulirana pod uticajem
33 standardnih KV, a višestruko inhibirana nakon dodavanja kiselih ili baznih KV u navedenoj
34 koncentraciji. Standardna KV nisu dovela do promene u koncentraciji TNF- α , dok su kisela, a
35 naročito bazna KV dovela do smanjenja koncentracije ovog citokina; pri tome, smanjenje
36 koncentracije TNF- α u prisustvu baznih KV desetostruko je bilo manje u poređenju sa
37 kontrolnim vrednostima.

38 7. Pregled nuklearnom magnetnom rezonancom životinja sa potkožnim i
39 intramuskularnim implantatima karbonskih vlakana pokazao je da je hiperintenzivna zona oko
40 intramuskularnih implantata od kiselih KV jača u odnosu na istu oko baznih KV, ali se
41 redukuje progresivno sa protokom vremena posle operacije. Reakcija potkožnog tkiva oko
42 implantata je u suštini slična – izražena reakcija oko kiselih implantata i nešto slabija reakcija
43 oko baznih implantata, sa redukcijom signala tokom progresije postoperativnog perioda.

44 8. Najveći odgovor tkiva procenjen preko vrednosti Irl *pri subkutanoj aplikaciji* KV,
45 postojao je 21. dana nakon implantacije standardnih i kiselih KV, a 21. i 28. u slučaju
46 implantacije baznih KV, u odnosu na ostale termine merenja. Pri tome, Irl potkožnog tkiva kod
47 subkutane aplikacije kiselih KV bio je značajno veći 21. dana nakon implantacije u poređenju
48 sa istim indeksom kod subkutane aplikacije baznih KV.

49 9. Kod *intramuskularne aplikacije* kiselih KV, vrednosti Irl bile su značajno veće 7.
50 dana od implantacije u odnosu na ostale termine merenja. Postojao je znatno veći tkivni Irl
51 kod intramuskularno aplikovanih kiselih KV u odnosu na standardna KV 7, 21. i 28.
52 postoperativnog dana, a značajna razlika u veličini ovog indeksa registrovana je između
53 kiselih i baznih KV u 7. postoperativnom danu, u korist kiselih vlakana.

54 10. Poređenjem *subkutane i intramuskularne aplikacije* KV, izvodi se zaključak da je
55 7. dana nakon implantacije Irl značajno veći prilikom intramuskularne aplikacije *standardnih,*
56 *kiselih i baznih vlakna* u poređenju sa subkutanom aplikacijom istih tipova vlakana, dok je 21.
57 danu Irl značajno veći kod subkutane aplikacije u odnosu na intramuskularnu.

58 12. Najviše su bila fragmentisana intramuskularno aplikovana kisela i standardna KV,
59 a najmanje subkutano aplikovana standardna KV. Intramuskularna aplikacija uslovala je
60 kidanje vlakana na manje fragmente u odnosu na potkožnu aplikaciju KV. Subkutano, najviše

1 su bila fragmentisana bazna KV i razlika je bila značajna u odnosu na standardna i kisela KV,
2 dok su intramuskularno najviše bila fragmentisana kisela KV, a ta fragmentacija bila je veća u
3 odnosu na fragmentaciju baznih KV aplikovanih na isti način.

4 13. Nalazi na NMR i patohistološka procena odgovora potkožnog i mišićnog tkiva na
5 implantaciju KV, podudarali su se delimično.

6 14. Sve primenjene analize u cilju procene biokompatibilnosti standarnih i
7 funkcionalizovanih karbonskih vlakana rasvetlile su različite aspekte biokompatibilnosti
8 implantiranih materijala i ni jedna nije bila „superiorna“ u odnosu na druge.

9 15. S obzirom na različit odgovor makrofaga *in vitro* na KV dodata u ćelijsku kulturu, u
10 smislu ćelijske vijabilnosti, kao i funkcije – internalizacije vlakana (fagocitoze/frustrirane
11 fagocitoze) i produkcije proinflamatornih i antiinflamatornih citokina, u budućnosti bi mogla da
12 se razmatra mogućnost da se pre implantacije ispita funkcija makrofaga pacijenta kome treba
13 da se ugradi implantat u dodiru sa KV *in vitro*, a da se potom vlakna funkcionalizuju u
14 određenom pravcu, kako bi se sprečila infekcija ili hronična inflamacija, koje su najčešći
15 uzročnici odbacivanja implantata. To bi otvorilo nove perspektive u terapijskoj predikciji i utro
16 put personalizovanoj implantnoj terapiji.

17 18 19 **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li** 20 **su dobijeni rezultati u skladu sa postavnjenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li** 21 **zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):**

22
23 Komisija smatra da su dobijeni rezultati ispitivanja prikazani u ovoj doktorskoj
24 disertaciji u skladu sa postavljenim ciljevima i zadacima istraživanja i da zaključci proizilaze iz
25 dobijenih rezultata.

26 27 28 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

29 30 **1. Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme?**

31
32 Doktorska disertacija kandidata dr vet. med. Bogomira Bolke Prokića napisana je u
33 skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme.

34 35 **2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?**

36
37 Doktorska disertacija kandidata dr vet. med. Bogomira Bolke Prokića sadrži sve
38 elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju.

39 40 **3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?**

41
42 Ovom doktorskom disertacijom po prvi put je ispitana na kompleksni način
43 biokompatibilnost karbonskih vlakana promenom na njima kiselih i baznih površinskih grupa
44 (funkcionalizovana KV). Sve primenjene analize u cilju procene biokompatibilnosti standarnih
45 i funkcionalizovanih karbonskih vlakana rasvetlile su različite aspekte biokompatibilnosti
46 implantiranih materijala i ni jedna nije bila „superiorna“ u odnosu na druge. Po prvi put u
47 literaturi detaljno je ispitana fragmentacija KV u potkožnom i mišićnom tkivu, uključujući i
48 bazno i kiselo promenjena vlakna, kao i njihov uticaj na vijabilnost i funkciju humanih
49 makrofaga u ćelijskoj kulturi–fagocitozu, sintezu i sekreciju proinflamatornih citokina. Na
50 osnovu rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji, u budućnosti bi mogla da se razmatra
51 mogućnost da se pre implantacije ispita funkcija makrofaga pacijenta kome treba da se ugradi
52 implantat, u dodiru sa KV *in vitro*, a da se potom vlakna funkcionalizuju u određenom pravcu
53 (u smislu promene površinskih kiselih i baznih grupa), kako bi se implantat bolje „prihvatio”,
54 što bi otvorilo nove perspektive u terapijskoj predikciji i utro put personalizovanoj implantnoj
55 terapiji.

56 57 **IX PREDLOG:**

58
59 **Na osnovu ukupne ocene disertacije, komisija predlaže (odabrati jednu od tri**
60 **ponuđenih mogućnosti):**

1 Na osnovu ukupne ocene disertacije, komisija predlaže da se doktorska disertacija
2 prihvati a kandidatu Bogomiru Bolki Prokiću, dr vet. med., odobri odbrana.

3
4 DATUM
5 8. jun 2017. godine

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

6
7 _____
8 dr Nikola Krstić, red. profesor,
9 mentor
10 Fakultet veterinarske medicine
11 Univerziteta u Beogradu

12 _____
13 dr Vera Todorović, red. profesor
14 komentor
15 Stomatološki fakultet Pančevo
16 Univerziteta "Privredna akademija",
17 Novi Sad
18 Medicinski fakultet VMA
19 Univerziteta odbrane u Beogradu

20 _____
21 dr Jugoslav Vasić, red. profesor
22 Fakultet veterinarske medicine
23 Univerziteta u Beogradu

24 _____
25 dr Danica Marković, vanr. profesor;
26 Fakultet veterinarske medicine
27 Univerziteta u Beogradu

28 _____
29 dr Marko Daković, docent
30 Fakultet za fizičku hemiju
Univerzuiteta u Beogradu