

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 07.09.2017. godine, broj 5940/12 imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Analiza preživljavanja autoložnih adipocita u rekonstruktivnoj i plastičnoj hirurgiji“**

kandidata mr dr Violeta Skorobać Ašanin. Mentor je Prof. dr Jelena Sopta.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Svetislav Tatić - redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Institut za patologiju
2. Prof. dr Milan Jovanović –vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Klinika za opekotine, plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju Klinički centar Srbije, Beograd
3. Prof. dr Dušan Marić- vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, Institut za zdravstvenu zaštitu dece i omladine Vojvodine

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

## IZVEŠTAJ

### A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija mr sci. dr Violete Skorobać Ašanin napisana je na 117 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci, literatura i biografija. U disertaciji se nalazi ukupno 9 grafikona, 30 tabela i 21 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

**Uvod** je napisan na 26 strana i sastoji se od 12 poglavlja.

U **uvodu** je naveden značaj masnog tkiva u plastičnoj i rekonstruktivnoj hirurgiji za nadoknadu mekotkivnih defekata i kako se istorija autologne transplantacije masti razvijala u skladu sa razvojem tehnologije transplantacije masti. Kandidat navodi da u poslednje dve dekade, sa otkrivanjem velikih resursa matičnih ćelija u masnom tkivu, ovo autologno tkivo dobilo je i na regenerativniom značaju. Predstavljena je morfologija masnog tkiva, njegova podela kao i značajnost u organizmu kojom doprinosi njegova velika sekretorna aktivnost. Shodno njegovoj naizgled jednostavnoj histološkoj građi kandidat nas je uveo i u prepoznavanje ovog tkiva kao jednog od najvećih i najznačajnijih endokrinih organa sa višestruko razvijenim regulatornim mehanizmima za funkcionisanje drugih sistema. Savremena dostignuća u ispitivanju i pronalaženju značajnosti ECM ( ekstracelularnog matriksa), kao i unutar nje SVF ( stromalne vaskularne frakcije) upućuje na višestruku značajnost ovih elemenata masnog tkiva, ne samo u procesu preživljavanja masti već i kao bogati resurs mezenhimnih matičnih ćelija. U sledećim poglavljima kandidat nas upozna sa istorijatom aloplastičnih materijala koji se koriste u svrhu nadognade tkiva, ali istovremeno i objašnjava njihovu limitiranost u odnosu na region, kvalitet tkiva, nesavršenost sklada sa ostalim delovima tela, kao i komplikacijama koji autologni transplantati mogu da izazovu. Upozna nas sa prednostima autolognog masnog tkiva za rekonstrukciju i nadoknadu mekotkivnih defekata, ali istovremeno govori i o značajnost obezbeđivanja njegovog preživljavanja, odnosno smanjivanja procenta njegove resorpcije.

Sa takvim saznanjem masno tkivo bi se postavilo kao ultimativni autologni filer u plastičnoj i rekonstruktivnoj hirurgiji.

**Ciljevi rada** su precizno i jasno definisani. Sastoje se od: preoperativnog i postoperativnog ispitivanja morfologije i volumetrije masnog tkiva recipijentnog regiona pomoćnim dijagnostičkim metodama magnetne rezonance kao i njihova uporedna analitika, zatim ispitivanje morfoloških i volumetrijskih karakteristika ćelija donorskog masnog tkiva kao i masnih ćelija recipijentnog regiona, ispitivanje postoperativno strukture subkutano transplantiranih adipocita histološkim i imunohistohemijskim analizama i njihovo poređenje sa histološkim karakteristikama pre transplantacije.

Poglavlje **Materijal i metode** napisano je na 12 strana. U ovom poglavlju detaljno je opisano mesto, period i tip istraživanja, kao selekcija ispitanika sa faktorima za uključivanje u studiju. Precizno je definisan način uzorkovanja tkiva po hronološkim fazama. Opisana su antropološka merenja kao metod praćenja pacijenta, kao i način i tehnike praćenja rezultata vizualizacijom - fotografisanjem i magnetnom rezonancom. Nevedena je metodološki precizna analiza bioloških parametara kroz histološka i imunohistohemijska bojenja, radi utvrđivanja morfoloških, volumetrijskih i funkcionalnih karakteristika masnog tkiva iz donorskog regiona i šest meseci kasnije iz recipijentnog regiona potkolenice. Svi instrumenti merenja koji su korišćeni u istraživanju su detaljno opisani. Jasno su navedene hirurške procedure uzimanja i pripremanja masnog tkiva, kao i same tehnike infiltracije u region potkolenice. U ovom delu je i detaljno opisan način kako zaštititi potkolenice od povećanog otoka kao i transplantate od pomeranja. Detaljno je opisana postoperativna procedura kao i način uzorkovanja tkiva iz recipijentnog regiona potkolenice šest meseci nakon operacije. U ovom poglavlju je i opisana statistička metodologija sa kojom će se obrađivati rezultati istraživanja.

Svi delovi istraživanja su sprovedeni u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobreni su i od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

U poglavlju **Rezultati** su prikazani na 32 strane. Rezultati su detaljno su opisani i jasno predstavljeni kroz tabele, grafikone i fotografije.

**Diskusija** je napisana na 20 strana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

**Zaključci** na jednoj strani sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata ovog rada.

Podlavlje **Literatura** na 14 strana sadrži spisak od 157 referenci.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

Kandidat je od svih ispitanika u svojoj studiji izdvojio metodološki homogenu grupu 67 ženskih ispitanika, bele rase sa hipoplazijom Tip III obe potkolenice. Studija je rađena multidisciplinarnim pristupom koja je uključila klinički status, radiološku dijagnostiku, histološka i imunohistohemijska ispitivanja. Klinički svi pacijenti su antropološki mereni obimi potkolenica, fotografisani pre operacije, jedan, tri i šest meseci nakon operacije. Merenja obima su vršena na tračno određenim nivoima potkolenice ispod kolena, sredina lista, iznad gležnja i gležanj. Prikazani rezultati pokazuju značajnost u promeni obima potkolenica obostrano i na svim nivoima. Na fotografijama se uočava promene oblika i građe potkolenice sa postignutom obostranom simetrijom i usklađivanje sa oblikom i izgledom natkolenice. Takođe su promene dimenzija i građe potkolenice praćena i prikazana pre i šest meseci nakon operacije pomoćnom dijagnostičkom metodom magnetne rezonance na kojima se prikazuje. Kandidat je prikazao da kod većine pacijenta postoperativno dolazi do povećanja obima listova sa приметnom razlikom u sadržaju masti između i unutar skeletnih mišića. Mast je prisutna u mišićima, kako inter, a tako i intramuskularno. Karakterističan je MR prikaz intramuskularne masti koja daje sliku nalik peru. Takođe je i od velikog značaja i povećanje debljine potkožnog masnog tkiva potkolenice. Opisane promene bile su najizraženije u m. soleus-u i medijalnoj glavi m. gastrocnemius-a. takođe je naglašeno da na nalazu magnetne rezonance ni na jednom ispitaniku nisu viđene značajne zone edema i atrofije.

Rezultati istraživanja ukazuju na to da je došlo do značajne promene obima na svim nivoima potkolenica i da je ona povezana sa količinom infiltrirane masti u svim praćenim regionima. Klinički gledano svi ispitanici su imali dominantnu desnu stranu i imali su manji list leve potkolenice i za istu promenu obima infiltrirana im je veća količina masti.

Rezultati praćenja bioloških parametara različito pripremljenih adipocita iz donorskog

regiona metodom propiranja i centrifugiranja, kao i iz recipijentnog regiona uzetog uzorka nakon šest meseci, rađena je histološkim bojenjem i histovolumetrijskim merenjem veličine adipocita, broja, prečnika i površine krvnih sudova. Dok je funkcija adipocita iz proprane i centrifugirane masti donorskog tkiva i uzorak masnog tkiva iz recipijentnog regiona praćena i poređena kroz ekspresiju različitih faktora rasta: vaskularno endotelnog faktora rasta VEGF, trombocitnog faktora rasta PDGF i epidermalnog faktora rasta EGF. Proprana mast je ubacivana isključivo u mišiće potkolenice-region lista. Površina adipocita nakon operacije, kao i korelacija prečnika krvnih sudova i promene obima je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti, što ide u prilog hipotezi "Što je više masti ubrizgano u mišiće, obim lista je veći". Za razliku od centrifugirane masti gde ni jedna morfološka karakteristika, kao i količina ne utiče na promenu obima potkolenice.

Kandidat za analizu preživljavanja transplantirane masti je koristila uporednu analitiku podatka morfoloških karakteristika ćelija masti u obradi centrifugom i masti uzete iz recipijentnog regiona. Uočena je visoko statistički značajna razlika uzoraka masti iz recipijente regije koja ima višestruko veću površinu krvnih sudova od centrifugirane masti, kao i manju površinu adipocita. Takođe, u komparativnoj analitici ove dve masti, jasno je prikazano da veći prečnik krvnog suda u centrifugiranoj masti dao neznatno ali manji broj krvnih sudova u recipijentnoj regiji. Kao što je i površina adipocita iz centrifugirane masti manja od recipijentne regije i ima značajni uticaj na četvorostruko manji prečnik krvnih sudova u recipijentom regionu potkolenice.

U funkcionalnom ispitivanju sva tri faktora rasta masnog tkiva različito obrađenog iz donorskog regiona i uzorka masnog tkiva iz recipijentnog regiona i njegovog uticaja na promenu obima rezultati su pokazali da pri različitim obradama masti dolazi do promene ekspresije faktora rasta od slabe ka umerenoj i od umerene ka izraženoj ekspresiji. Kandidat je pokazao da PDGF centrifugirane masti sa svojom slabom i umerenom ekspresijom nema značajnog uticaja na promenu obima potkolenice u svim njenim regionima sem u regionu lista desno 6m nakon operacije, gde se nalazi na granici konvencionalnog nivoa značajnosti. Za razliku od PDGF-a, VEGF je pokazao značajnost u promeni obima potkolenice i to obostrano u regionu lista, pre i 6m posle operacije, obostrano iznad gležnja. Uticaj EGF-a na promenu obima potkolenice pokazao je povećanje obima u regionu iznad oba gležnja i ispod kolena, lista levo, a smanjena

ekspresija EGF-a bila je udružena sa povećanjem obima kolena desno, dok nije imao uticaj na promenu obima u nivou gležnja. Rezultati su potvrdili da različita obrada masti menja jačinu ekspresije faktora rasta, tako da proprana mast je veoma siromašna ispitivanim faktorima rasta, dok se pojačanom obradom centrifugiranjem masti jačina ekspresije povećava. Sam proces preživljavanja menja ekspresiju ispitivanih faktora rasta, tako da je u uzorku iz recepijentnog regiona šest meseci nakon implantacije došlo po povećanja ekspresije PDGF sa umerene na izraženu, VEGF sa slabe na umerenu, dok je EGF pokazao pad ekspresije sa umerene na slabu. Analizom uticaja faktora rasta na promenu obima potkolenice smo pokazali da promena ekspresije PDGF i VEGF nema uticaja na promenu obima, dok EGF sa smanjenjem ekspresije je uticao na povećanje obima potkolenice.

### **C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

Sva dosadašnja istraživanja su u analizama preživljavanja autolognih adipocita metodološki pratili pacijente fotografisanjem ili volumetričkim merenjima samo jednog obima, a to je nivo lista, broj pacijenata je bio mali, različitih rasa, vrsta deformiteta i mekotičnog oštećenja potkolenice je etiološki bio različit (Mundinger i Vogel, 2016; Hoppmann i sar., 2013; Mojallal i sar., 2008; Stamos, 2001; de Pedroza, 2000; Pereira, 1996). U ovom istraživanju kandidat je izdvojio homogenu grupu pacijentkinja sa istim deformitetom potkolenice, a transplantacija autolognom masnim tkivom je rađena čitavom dužinom potkolenice. Pri tome su ispitanici praćeni antropološkim merenjem, fotografisanjem, magnetnom rezonancom i histološkim i imunohistohemijskim ispitivanjem. Većina autora govori o visokom stepenu resorpcije masti od 17 do 85% (Hall i sar., 2015; Herold i sar., 2013; Keyhan i sar., 2013; Gentile i sar., 2012; Yoshimura i sar., 2010; Erol i sar., 2008; Yoshimura i sar., 2008). Ovim metodološkim pristupom kandidat je pokazao da u njenom istraživanju stepen resorpcije je iznosio od 14.18% do 26.75%. Ona navodi da u procesu preživljavanja masti učestvuju: način uzimanja i obrade masti, veličina kanila i njihovih otvora, jačine vakuma pri aspiraciji masti. Veće ćelije proprane masti nisu narušile svoj integritet samim uzimanjem i njihov način pripreme je adekvatan za implantaciju u dobro vaskularizovan mišić lista, pri tome veličina transplantata nije veća od 2mm, ubacuje se pri retrogradnom izvlačenju kanile i raspoređuje se u više nivoa između mišića

ili mišićnih vlakana. Da bi kontakt sa recipijentnim regionom bio bolji kandidat napominje da je masaža izuzetno bitna jer su graftovi onda u punom kontaktu sa bogatom vaskularizacijom recipijentnog regiona. Takođe napominje da u procesu centrifugiranja na 2700 rpm/3min se vitalnost ćelija ne gubi, da je integritet ćelije očuvan ali da je površina manja, broj krvnih sudova je gotovo isti ali je prečnik i površina manja, što odgovara injektiranju manjim kanilama od 1,2 mm u potkožno masno tkivo potkolenice. Manje ćelije u tanji potkožni sloj bivaju implantirane između dermalnog i fascijalnog vaskularnog plexusa potkolenice, koji će omogućiti da mali graftovi prežive. Povećanje pritiska u recipijentnom regionu ugrožava lokalnu cirkulaciju, a samim tim i onemogućava preživljavanje adipocita (Tan i sar., 2016; Mundinger i Vogel, 2016). Zbog toga kandidatkinja navodi da je umerena kompresija potkolenice neophodna u postoperativnom toku, elastičnim samolepljivim flasterima i kompresivnim čarapama, kao i umerena fizička aktivnost. Istraživanje dokazuje da pri transplantaciji masti dolazi do skoka faktora rasta VEGF, PDGF i EGF-a kao proizvod hipoksije tkiva i poremećaja u ekstracelularnom matriksu gde adipocitne matične ćelije započinju izlučivanje faktora rasta (Elias i sar., 2013; Fukumura i sar., 2003; Aoki i sar., 2003; Hurtly i sar., 2001; Nishimura i sar., 2000). Dobijeni rezultati se uklapaju u navedene studije i podržavaju stavove o uticaju ispitivanih faktora na adipogenezu. S tim da se u istraživanju navodi da EGF kao regulator metabolizma u masnom tkivu može imati pro ili antilipogeno dejstvo.

Zadovoljiti proporcije tela prilikom rekonstrukcije pojedinih delova je ultimativno u plastičnoj i rekonstruktivnoj hirurgiji. Korišćenje aloplastičnih materijala ne zadovoljavaju antropološke mere i sklad donjih ekstremiteta, posebno moguće komplikacije kao što su dehiscencija rane, nekroze tkiva, razvijanje kompartment sindroma, mišićne ishemije ili pak odbacivanje implantanta (Erol i sar., 2008; Cuenca-Guerra i sar., 2009) nameće neophodnost korišćenja autolognog masnog tkiva u svrhu rekonstrukcije deformiteta potkolenice. Ovo istraživanje je imalo svoje prednosti ali i limitacije. Jedna od važnijih je da faktori rasta započinju svoju ekspresiju od petog do sedmog dana, tako da bi značajnost bila veća da su uzorci uzimani nakon mesec dana i nakon tri meseca, a ne samo nakon šest meseci. Međutim dovodi se u pitanje neophodnost dodatnih intervencija kod pacijenata koji su zadovoljni postignutim rezultatom. Takođe period praćenja nije bio dug, jer zbog zadovoljstva rezultatom se pacijenti nisu pojavljivali na kontrolama nakon šest meseci. Međutim, imajući u vidu da je ovo istraživanje

prevazišlo dosadašnja istraživanja po mnogim parametrima smatramo da je studija pružila dovoljno novih informacija vezanih za proces preživljavanja autolognih adipocita u potkolenici.

#### **D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

1. Skorobac Asanin V, Sopta J. Lower Leg Augmentation with Fat Grafting, MRI and Histological Examination. *Aesthetic Plast Surg.* 2017;41(1):108-116.

#### **E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija „**Analiza preživljavanja autolognih adipocita u rekonstruktivnoj i plastičnoj hirurgiji**” dr Violete Skorobać Ašanin predstavlja originalni naučni doprinos jer je prva studija koja je sprovedena kroz multidisciplinarni pristup u analiziranju preživljavanja transplantiranog masnog tkiva. Kao takva ona objedinjuje i komparira makroskopske i mikroskopske karakteristike donorske i recipijentne regije, uključujući morfometrijska ispitivanja adipocita i vaskularnih elemenata masnog tkiva, kao i imunohistohemijsku ekspresiju faktora rasta. Jedna od najvećih prednosti ovog aktuelnog istraživanja je naturalistički, klinički uzorak, čime je postignuta značajna validnost ne samo u strogo istraživačkom već i u aplikativnom, kliničkom smislu. Njegova prednost se ističe u unakrsnom analiziranju radiološkog, histološkog i imunohistohemijskog i kliničkog ispitivanja. Studija je pokazala bitnost svih elemenata pri procesu transplantacije, od načina uzimanja i obrade masti, preko načina infiltracije masti u recipijentni region do postoperativnog toka i obezbeđivanja recipijentnog regiona od povećanog otoka i pomeranja transplantanata, a zarad obezbeđivanja boljeg preživljavanja autolognih adipocita. Opisane korelacije u studiji mogu predstavljati dalju osnovu za nova istraživanja koja se mogu odnositi na druge faktore rasta, ostale regije tela ili ovde neispitivane histološke karakteristike masnog tkiva.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.



Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Violete Skorobać Ašanin i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 20.09. 2017.

Članovi Komisije:

Prof. Svetislav Tatić

---

Prof. dr Milan Jovanović

---

Prof. dr Dušan Marić

---

Mentor:

Prof. dr Jelena Sopta

---

