



Образац 3

УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ БАЊА ЛУКА

Примљено: 18.06.2018.		
Орг. јед.	Број	Прилог
18/4. 40/18		

ИЗВЈЕШТАЈ *о оијени урађене докторске дисертације*

І ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

Наставно-научно вијеће Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци, на сједници одржаној 11.06.2018. године, донијело је одлуку број: 18/3.411/2018 о именовању Комисије за оцјену и одбрану урађене докторске дисертације мр сц. Огњенке Јанковић под називом „Биокомпатибилност наноструктурних биоматеријала на бази калцијум алумината“.

Именована је комисија у сљедећем саставу:

1. Предсједник:
Доц. др Смиљана Параш
Звање: доцент
Ужа научна област: Биологија ћелије
Институција: Универзитет у Бањој Луци, Природно-математички факултет
2. Члан:
Проф. др Славољуб Живковић
Звање: редовни професор
Ужа научна област: Болести зуба
Институција: Универзитет у Београду, Стоматолошки факултет, ментор и члан
3. Члан:
Доц. др Ирена Кузмановић Радман
Звање: доцент
Ужа научна област: Болести зуба
Институција: Универзитет у Бањој Луци, Медицински факултет, студијски програм стоматологија, члан.
4. Резервни члан:
Доц. др Адријана Арбутина
Звање: доцент
Ужа научна област: Ортопедија вилица
Институција: Универзитет у Бањој Луци, Медицински факултет, резервни члан

Након детаљног прегледа урађене докторске дисертације кандидата мр сц. Огњенке Јанковић чланови Комисије подносе Наставно-научном вијећу Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци и Сенату Универзитета у Бањој Луци сљедећи извјештај:

II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

Огњенка (Славко) Јанковић.

Рођена 28.06.1982. године у Високом, Босна и Херцеговина. Универзитет у Бањој Луци, Медицински факултет, Студијски програм стоматологија, кандидаткиња је завршила 2009. године са просјечном оцјеном 9,46, те стекла звање доктора стоматологије. Исте 2009. године, кандидаткиња је уписала послиједипломски студиј на Медицинском факултету у Бањој Луци, где је 2011. године положила све испите предвиђене планом и програмом постдипломских студија, са просјечном оцјеном 10,0. Магистарски рад под називом: „Испитивање квалитета рубног заптивања самонагризајућих течних композитних материјала“ успјешно је одбранила 26.4.2013. године на Медицинском факултету, Универзитета у Бањој Луци и тиме стекла звање магистра стоматолошких наука из области Болести зуба.

III УВОДНИ ДИО ОЦЈЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Наслов докторске дисертације мр сц. Огњенке Јанковић је:

„Биокомпабилност наноструктурних биоматеријала на бази калцијум алумината“.

Тема докторске дисертације је прихваћена од стране Наставно-научног вијећа Медицинског факултета, Универзитета у Бањој Луци одлуком број:18/3.108/2016 од 10.02.2016. Сенат Универзитета у Бањој Луци одлуком број: 02/04-3.536-79/16 од 02.03.2016. године дао је сагласност на Извјештај о оцјени услова и подобности теме за израду докторске дисертације на Медицинском факултету у Бањој Луци кандидаткиње мр сц. Огњенке Јанковић под називом „Биокомпабилност наноструктурних биоматеријала на бази калцијум алумината“.

Садржај докторске дисертације је изложен у слједећим поглављима:

- 1) Увод (стр. 1-33),
- 2) Хипотеза (стр. 34),
- 3) Циљ рада (стр. 35),
- 4) Материјал и методе (стр. 36-57),
- 5) Резултати истраживања (стр. 58-89),
- 6) Дискусија (стр. 90-109),
- 7) Закључак (стр. 110) и
- 8) Литература (стр.111-132).

Докторска дисертација је написана латиничним писмом, фонтом *Times New Roman*, величина 12. Дисертација је написана на укупно 132 странице, формата А4. На почетку дисертације налази се 5 страница које нису нумерисане, а односе се на наслов дисертације, резиме (на српском и на енглеском језику), захвалницу и на садржај докторске дисертације. Дисертација садржи 11 табела и 45 слика. Укупан фонд кориштене литературе чини 241 литературни извор.

У првој целини (стр.1-33) истакнут је разлог због којег је ово истраживање предузето, константна настојања научних истраживања да се открију нови

биоматеријали који ће, уз посједовање биокомпабилности, биоактивности и биоиндуктивности, измјенама у саставу и побољшаним карактеристикама, превазиђи уочене недостатке постојећих. Укратко је представљен предмет истраживања и истакнут значај биокомпабилности материјала, те описани тестови којима се биокомпабилност процјењује. Указано је на значај калцијум алуминатних цемената од њиховог појављивања па до данас, предности ових материјала и примјену у медицини и различитим областима стоматологије.

Такође, истакнуто је да упркос томе што је последњих десетак година нешто већи акценат стављен на истраживања калцијум алуминатних цемената, шире примјена ових материјала у стоматолошкој пракси захтијева додатна испитивања новијег датума. Истакнут је и све већи утицај нанотехнологије и наноматеријала у медицини.

У другој цјелини (стр.34) представљена је хипотеза спроведеног истраживања која указује да наноматеријали на бази калцијум калцијум алумината не испољавају токсичне ефекте на ћелије живог ткива и да наноматеријали на бази калцијум алумината имају повољан ефекат на репараторне способности пулпе.

Циљеви истраживања су дати у **трећој цјелини** (стр.35). Циљеви истраживања су прецизно постављени како би се испитала биокомпабилност наноструктурних биоматеријала на бази калцијум алумината у *ин витро* условима (примјеном МТТ и Комет теста на хуманим плућним фибробластима) и *ин виво* условима примјеном поткожне имплантације полиетиленских тубица и директним прекривањем пулпе пацова испитиваним цементом).

У четвртој цјелини (стр.36-57) представљена је основна методологија истраживања. У оквиру овог дијела детаљно је описан процес синтезе нових калцијум алуминатних система, примијењени тестови при испитивању цитотоксичности и генотоксичности материјала, одобрани узорак за *ин виво* студије поткожне имплантације и директног прекривања пулпе као и критеријуми за њихов избор, кориштени материјал и детаљна методологија рада током истраживања.

Резултати истраживања и тестирање хипотезе чине садржај **пете цјелине** (стр. 58-89). У оквиру овог дијела дисертације, систематично су приказани резултати по фазама истраживања. Детаљно су приказани резултати испитивања цитотоксичности и генотоксичности калцијум алуминатних система, као и резултати поткожне имплантације и директног прекривања пулпе пацова калцијум алуминатима.

Шеста цјелина у овој докторској дисертацији (стр. 90-109) представљена је дискусијом добијених резултата истраживања и њиховом компарацијом са већ постојећим сличним истраживањима у овој научној области. Представљени су и образложени доприноси овог рада биокомпабилности новосинтетисаних калцијум алумината.

У седмој цјелини (стр. 110) ове дисертације, кандидаткиња је на јасан и систематичан начин представила синтезу сазнања и научних чињеница изнесених у оквиру дисертације, добијених на основу резултата истраживања и тестирања хипотезе.

Осма цјелина (стр.111-132) ове дисертације представља списак кориштене литературе у оквиру спроведеног истраживања, а у оквиру израде ове дисертације.

IV УВОД И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

IV 1. Разлог због којег је истраживање предузето, проблем, предмет, циљеви и хипотеза истраживања

У оквиру увода и прегледа литературе јасно су и логичким редослиједом описаны основни појмови о *проблему* који се истражује, почев од појаве калцијум алуминатних система почетком 20. вијека па све до истраживања нових калцијум алумината заснованих на нанотехнологијама, који задржавају позитивна својства комерцијалних калцијум силиката, али без њихових негативних својстава, што представља *предмет* овог *истраживања*. С обзиром на све већу примјену наноматеријала у медицини, као и све учесталију употребу калцијум алумината у рестауративној стоматологији и ендодонтији неопходно је трагати за новосинтетисаним наноструктурним биоматеријалима на бази калцијум алумината, што представља и *разлог* због којег је истраживање предузето.

Основни циљ истраживања је био:

Испитати биокомпактабилност наноструктурних биоматеријала на бази калцијум алумината у *ин витро* и *ин виво* условима.

Ближи циљеви истраживања су били:

1. Испитати биокомпактабилност наноструктурног биоматеријала на бази калцијум алумината у *ин витро* условима, применом МТГ теста на хуманим плућним фибробластима.
2. Испитати биокомпактабилност наноструктурног биоматеријала на бази калцијум алумината у *ин витро* условима, применом Комет теста на хуманим плућним фибробластима.
3. Испитати биокомпактабилност наноструктурног биоматеријала на бази калцијум алумината у *ин виво* условима, на експерименталним животињама, имплантацијом материјала у поткожно ткиво пацова.
4. Испитати биокомпактабилност наноструктурног биоматеријала на бази калцијум алумината након директног прекривања експониране пулпе пацова (*ин виво* тестови).

На основу проблема, предмета и циљева истраживања, као и резултата претходних сличних истраживања, постављена је *хипотеза истраживања* која гласи:

1. Наноматеријали на бази калцијум калцијум алумината не испољавају токсичне ефекте на ћелије живог ткива.
2. Наноматеријали на бази калцијум алумината имају повољан ефекат на репараторне способности пулпе

IV 2. Преглед претходних истраживања

Преглед релевантне литературе даје ширу слику теме докторске дисертације. Употребу неког денталног материјала у клиничкој пракси, добрим дијелом диктирају његове механичке и физичко-хемијске карактеристике: снага везе за тврда зубна ткива, вријеме стврђавања материјала, pH вриједност, рентген контрасност, растворљивост, отпорност на притисак, тврдоћа, затезна чврстоћа, ресорпција воде и дезинтеграција. У оквиру почетног дијела прегледа литературе приказане су релевантне и актуелне референце које указују да су примјеном различитих метода испитивања калцијум алуминатни цементи потврдили примјерене физичко-хемијске карактеристике [1-3], сличне комерцијалним калцијум силикатним цементима [4,5] или чак супериорније у односу на калцијум силикате [6-8].

Покушај комбинације трикалцијум алумината са трикалцијум силикатима резултирао је бољим физичко-хемијским особинама (убрзаним процесом хидратације, краћим временом стврђавања, већом отпорношћу на притисак), биоактивношћу и биокомпактабилношћу (стимулативни учинак на раст L929 ћелија)

у односу на чисте трикалцијум силикате, показала је студија групе кинеских научника. [9].

Биокомпактабилност је есенцијална особина сваког материјала који се користи у стоматологији, а подразумијева способност материјала да након апликације обавља одређену функцију у организму, не изазивајући при томе нежељени одговор ткива домаћина [10].

У досадашњим истраживањима рађеним на култури ћелија, аутори су примјењивали различите методе за процјену цитотоксичности (агар и филтер дифузиони тест, алмар плаво, трипан плаво, неутрал црвено, LDH, MTT тест, пропидијум јодид тест, тестови инкорпорације радиоизотопа, мјерење количине протеина запаљења и протеина индикатора ћелијског стреса (HCPs), тест детерминације глутатиона, одређивање типа ћелијске смрти) и генотоксичности материјала (Комет тест, Амесов тест), при чему су калцијум алуминатни цементи показали висок степен биокомпактабилности. [11,12].

Емануел Силва и сар. су истраживали цитотоксичност, антимикробну активност и физичко-хемијске карактеристике калцијум алумината (EndoBinder) и МТА. Цитотоксичност је испитивана на фибробластима (3T3), примјеном три теста за испитивање цитотоксичности: XTT, NR и CVDE. Антимикробна активност је утврђивана против *Enterococcus faecalis*, *Staphilococcus aureus*, *Candida albicans*, а од физичко хемијских карактеристика је одређиван pH, растворљивост и ресорпција воде. Према њиховим резултатима, ни EndoBinder ни МТА нису показали цитотоксичност. Оба материјала су дјеловала инхибиторно на тестиране микробиолошке узрочнице. Показали су алкалан pH, EndoBinder је показао мању растворљивост у односу на МТА, док се у погледу ресорпције воде нису разликовали. [13].

Еид и сар. су потврдили слична остеогена/дентиногена својства калцијум алуминосиликатног цемента са WMTA и закључили да овај цемент може бити потенцијална замјена за комерцијално доступне трикалцијум силикатне цементе. За евалуацију промјена у mRNA је кориштена ћелијска линија налик одонтобластима пацова Мурина соја. [14].

Ли и сар. су упоређивали ћелијски одговор матичних ћелија људске пулпе на примјену калцијум алуминатног цемента Quick-Set и WMTA. За процјену ћелијске одрживости и пролиферације је примијењено 6 различитих тестова (за испитивање интегритета плазма мембрane, цурења цитосолних ензима, активности каспазе-3, за ране апоптозе, оксидативни стрес, метаболичке активности митохондрија (MTT) и интрацелуларног садржаја ДНК). Резултати су показали да су оба материјала у првих 24h испољавали цитотоксичне ефекте с тим да је Quick-Set био релативно мање цитотоксичан од WMTA у овој фази. Након два циклуса старења, профили цитотоксичности два хидраулична цемента се нису разликовали [15].

У студији Клаудије и сар. EndoBinder је потврдио цитокомпактабилност исту као WMTA, без обзира на додатак различитих рентген контрастних средстава. Цитотоксичност је процјењивана употребом MTT теста, мјерењем активности алкалне фосфатазе, мјерењем укупне производње протеина и посматрањем ћелијске морфологије (СЕМ). [16].

Студија на култури ћелија, у којој је калцијум алуминатни цемент САС постављен у директан контакт са остеобластима на 10 дана је дала добре резултате. САС је проузроковао повећање броја ћелија (установљено након Трупан плавог бојења), већу ћелијску одрживост (MTT тест) и већу активност алкалне фосфатазе у односу на МТА [17].

Поједини истраживачи су процјену биокомпактабилности калцијум алумината вршили у условима *in vivo*, на експерименталним животињама.

Занимљиво истраживање о биокомпактабилности калцијум алуминатног цемента

Quick-Set у компарацији са MTA, рађено на премоларима паса, су реализовали Кохоут и сар. На 42 доња премолара су урађени приступни кавитети и потом, очишћени, обликовани и оптурисани канали коријена зуба овим материјалима. Одмах потом су, на истим зубима, урађене остеотомије и апикотомије. Пси су жртвованы након 90 дана, а зуби и околна ткива су уклоњени и припремљени за хистолошки анализу. Након 3 мјесеца, Quick-Set и бијели MTA су показали подједнаке ефекте: одличан квалитет кости, формирање новог цемента на површини материјала и регенерацију пародонталног лигамента.[18].

Студија Крамера и сар. је једна од ријетких у којој су калцијум алуминати примијењени у поступку лијечења пулпе. Калцијум алуминатни цемент Quick-Set је при томе, након пулпотомије пацова, потврдио сличан дентиногени потенцијал MTA-у. Констатовано је одсуство бактерија у свим зубима, очуван виталитет зуба и формиран дентински мост код већине зуба. [19].

У студијама које су биокомпабилност испитивале, примјеном методологије поткожне имплантације полиетиленских тубица на леђима пацова, калцијум силикатни и калцијум алуминатни цементи су показивали или идентичне резултате [20], или су калцијум алуминати имали за нијансу већи степен биокомпабилности тј. потпуно одсуство инфламаторног одговора, док је на мјесту примјене калцијум силикатна констатовано присуство благе инфламаторне реакције [21].

Литература цитирана у IV 2.

- [1] Pameijer CH, Zmener O, Serrano SA, Godoy FG. Sealing properties of a calcium aluminate luting agent. Amer jour of dent. 2010;23(2):121-4.
- [2] Jefferies SR, Fuller AE, Boston DW. Preliminary Evidence That Bioactive Cements Occlude Artificial Marginal Gaps. Jour of Esthet and Rest Dent.2015;27(3):155–166.
- [3] Luz AP, Pandolfelli VC. Physical properties and hydration evolution of dispersant containing calcium aluminate cement compositions for endodontic applications. Cerâmica. 2014;(60):366-370.
- [4] Garcia Lda F, Chinelatti MA, Rossetto HL, Pires-de-Souza Fde C. Solubility and desintegration of new calcium aluminate cement (EndoBinder) containing different radiopacifying agents. J Endod. 2014;40(2):261-5.
- [5] Aguilar FG, Garcia LFR, Rossetto HL, Pardini LC, Fernanda de Carvalho Panzeri, Pires-de-Souza FCP. Radiopacity Evaluation of Calcium Aluminate Cement Containing Different Radiopacifying Agents. JOE. 2011;37(1):67-71.
- [6] Pires-de-Souza Fde C, Moraes PC, Garcia Lda F, Aguilar FG, Watanabe E. Evaluation of pH, calcium ion release and antimicrobial activity of a new calcium aluminate cement. Braz Oral Res. 2013;27(4):324-30.
- [7] Garcia Lda FR, Rossetto HL, De Carvalho Panzeri F, Pires-de-Souza Fde. Shear bond strength of novel calcium aluminate-based cement (EndoBinder) to root dentine. Eur J Dent. 2014;8(4):498–503.
- [8] Garcia LFR, Aguilar FG, Sabino MG, Rossetto HL, Pires de-Souza FCP. Mechanical and microstructural characterisation of new calcium aluminate cement (EndoBinder). Advan in Appl Ceram. 2011;110(8):469-475.
- [9] Liu WN, Chang J, Zhu YQ, Zhang M. Effect of tricalcium aluminate on the properties of tricalcium silicate–tricalcium aluminate mixtures: setting time, mechanical strength and biocompatibility. IEJ. 2011;(44):41–50.
- [10] Soares DG, Rossetto HL, Basso FG, Scheffel DS, Hebling J, Costa CAS. Chitosan-collagen biomembrane embedded with calcium-aluminate enhances dentinogenic potential of pulp cells. Braz. Oral Res. 2017;30(1):e54.
- [11] Bakopoulou A, Mourelatos D, Tsifsgoglou AS, Giassin NP, Mioglou E, Garefis P. Genotoxic and cytotoxic effects of different types of dental cement on normal cultured human lymphocytes. Mutation Res. 2009;672:103-112.
- [12] Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Efect of

- post-polymerization treatments of citotoxicity of two denture base acrylic resins. *J Appl Oral Sci.* 2006;14:203-207.
- [13] Silva EJ, Herrera DR, Rosa TP, Duque TM, Jacinto RC, Gomes BP, et al. Evaluation of cytotoxicity, antimicrobial activity and physicochemical properties of a calcium aluminate-based endodontic material. *J Appl Oral Sci.* 2014;22(1):61-7.
- [14] Eid AA, Niu LN, Primus CM, Opperman LA, Pashley DH, Watanabe I, et al. In Vitro Osteogenic/Dentinogenic Potential of an Experimental Calcium Aluminosilicate Cement. *J Endod.* 2013;39(9):1161-6.
- [15] Niu L, Watson D, Thamess K, Primus CM, Bergeron BE, Jiao K, et al. Effects of a discoloration-resistant calcium aluminosilicate cement on the viability and proliferation of undifferentiated human dental pulp stem cells. *Sci Reports.* 2015;5:171-177.
- [16] Huck C, Barud HS, Basso FG, Costa CAS, Hebling J, Garcia LFR. Cytotoxicity of New Calcium Aluminate Cement (EndoBinder) Containing Different Radiopacifiers. *Braz Dent J.* 2017;28(1):57-64.
- [17] Spinola de Castro-Raucci LM, Regina de Oliveira I, Teixeira LN, Adalberto Luiz Rosa AL, Tambasco de Oliveira P, Jacobovitz M. Effects of a novel calcium aluminate cement on the early events of the progression of osteogenic cell cultures. *Braz. Dent. J.* 2011;22(2).
- [18] Kohout GD, He J, Primus CM, Opperman LA, Woodmansey KF. Comparison of Quick-Set and mineral trioxide aggregate root-end fillings for the regeneration of apical tissues in dogs. *J Endod.* 2015;41(2):248-52.
- [19] Kramer PR, Woodmansey KF, White R, Primus CM, Opperman LA. Capping a Pulpotomy with Calcium Aluminosilicate Cement: Comparison to Mineral Trioxide Aggregates. *J Endod.* 2014;40(9): 1429–1434.
- [20] Garcia Lda FR, Huck C, Menezes de Oliveira L, de Souza PP, de Souza Costa CA. Biocompatibility of new calcium aluminate cement: tissue reaction and expression of inflammatory mediators and cytokines. *J Endod.* 2014;40(12):2024-9.
- [21] Aguilar FG, Garcia FR, Pires-de-Souza FCP. Biocompatibility of New Calcium Aluminate Cement (EndoBinder). *JOE.* 2012;38(3):367-371.

IV 3. Допринос тезе у решавању изучаваног предмета истраживања

Наноматеријали представљају будућност и прекретницу у лијечењу, нарочито кад су у питању ткивни инжињеринг и регенеративна медицина. Материјали добијени посебним методама синтезе као што је хидротермална сол гел метода и метода самосагоревајућих таласа имају додатну вриједност, јер су, доказано, биоактивнију у односу на материјале прозведене другим методама синтетисања. Испитивање биокомпабилности новосинтетисаних наноструктурних биоматеријала на бази калцијум алуминатних система примјеном 4 различите методе тестирања пружа јаснију слику о цитокомпабилности и генокомпабилности ових материјала, њиховој ткивној подношљивости и утицају ових материјала на зубну пулпу. Резултати мр сц. Огњенке Јанковић добијени у овој докторској дисертацији доприносе и охрабрују да се наставе истраживања овог материјала у будућности другим експерименталним и клиничким студијама и отварају пут потенцијалној клиничкој примјени новосинтетисаних наноматеријала базираних на калцијум алуминатима у различитим областима стоматологије.

IV 4. Научни и прагматични допринос дисертације

До сада није публикован рад који се бави испитивањем биокомпабилности новосинтетисаних наноструктурних калцијум алумината произведених хидротермалном сол гел методом и методом самосагоревајућих таласа. Калцијум алуминатни цемент ($\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 + \text{CaCO}_3 + \text{Bi}_2\text{O}_3$), овом тезом испитиван, је у ствари мјешавина названа *ALBO-MCCA* синтетисана по рецептури *В.Јокановића* у Институту за нуклеарне науке Винча и ово је прво истраживање

биокомпабилности овог материјала. С овим је дат значајан научни допринос дисертације у истраживању новосинтетисаних калцијум алумината и ширењу већ постојећих знања о калцијум алуминатима. *Прагматични допринос дисертације* Свакодневна стоматолошка пракса и проблеми који се јављају током лијечења зуба показују да још увек постоји проблем у избору материјала и да потрага за идеалним материјалом још увек заокупља стоматолошку науку иструку. Новосинтетисани биоматеријали би требало да испуне велика очекивања и терапеута и пацијената у смислу потпуног биолошког и функционалног опоравка, а ово истраживање је потврдило и убрзalo њихову примјену у бројним индикацијама у савременој стоматологији.

V МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

V 1.Материјал и критеријуми

Материјал и методе рада који су коришћене у овој дисертацији су усклађене са постављеним циљевима и приказане на двадесет и једној страници. За *ин витро* студију испитивања цитотоксичности материјала одабран је МТТ тест а *критеријум* је био једноставно извођење теста, прецизност и репродуктивност. Тест је реализован на Институту за онкологију у Београду, у складу са препорукама међународног ISO стандарда (ISO 10993-5:2009, Part 5: Test for cytotoxicity: *in vitro* method). За *ин витро* студију испитивања генотоксичности материјала одабран је Комет тест, јер представља брз и осјетљив метод за испитивање интегритета ДНК на нивоу појединачне ћелије. Овај дио експеримента такође је реализован на Институту за онкологију у Београду према препорукама међународног стандарда ISO/DIS 10993-3 (Test for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity). За *ин виво* студије поткожне имплантације и директног прекривања пулпе пацова за узорак су одобрани пацови *Wistar* соја јер не могу повраћати и стога су чест почетни модел за испитивања токсичности и канцерогености стоматолошких материјала, односно због велике сличности њихових и људских молара. Овај дио експеримента је обухватао 36 пацова (18 са поткожним имплантатима и 18 пацова код којих је извршено директно прекривање пулпе, тј. 72 зуба) и реализован је у Виваријуму Природно математичког факултета у Бањалуци. Пацови су били старости 10-11 седмица, просјечне тежине 190-280 g и држани су у плексиглас кавезима. Читав период трајања експеримента су имали слободан приступ храни и води, 12-то часовну смјену свјетла и мрака, температура ваздуха се кретала 20-23°C, а влажност 60%±10%. Омогућен им је период адаптације од 30 дана након чега је започет третман.

V 2. Кратак увид у метод истраживања

У овој студији цитотоксична активност испитиваних цемената калцијум алуминатног цемента (CA), калцијум силикатног цемента (CS), калцијум силикатног хидроксиапатита (CS-HA) и минерал триоксид агрегата (MTA Angelus) је одређивана у условима *ин витро* МТТ тестом. У раду је кориштена нормална ћелијска линија набављена од ATCC-а (American Type Culture Collection) и то MRC-5 (нормални хумани фибробласти плућа). MRC-5 ћелијска линија је настала из нормалног плућног ткива мушки фетуса старог 14 недеља. Представља добар избор за тестирање цитотоксичности супстанци, захваљујући великој осјетљивости. Ћелије су гајене у једнослојној култури у комплетном хранљивом медијуму на температури 37 °C у ваздуху обогаћеном са 5 % CO₂ и засићеном воденом паром. Поступак рада је укључивао:

- Припрему цемената
- Припрему хранљиве подлоге (RPMI 1640 медијум у који је додато 3 mmol/L l-

- glutamina, 100 mg/mL streptomicina, 100 IU/mL penicillina, 10 % FCS-а и 25 mM Hepesa, подешеног на pH вриједност 7.2 бикарбонатним раствором)
- Засађивање **MRC-5** ћелија у микротитарске плоче са 96 отвора са равним дном
 - Додавање ћелија у отворе плоча да би финалне концентрације биле у опсегу 4,2-66,7 mg/mL
 - Инкубацију ћелија 72 h на температури 37 °C у ваздуху засићеном воденом паром и 5 % CO₂
 - Фотографисање ћелија на инвертном микроскопу
 - Додавање раствора **MTT-а** (5 mg/ml у PBS-у)
 - Прекид редукције **MTT-а** у обојени формазан додавањем 100 µl 10% SDS-а и мјерење апсорбантце на 570 nm, 24h касније.

Преживљавање ћелија је процјењивано као однос броја преживелих ћелија у узорку третираном испитиваним агенсом и броја ћелија у контролном узорку у коме су ћелије расле само у присуству храњиве подлоге. Након сваког од 3 циклуса тестирања ћелија одређивана је **IC50** –мјера интензитета цитотоксичног дејства једињења.

У оквиру испитивања генотоксичног потенцијала калцијум алуминатних система кандидаткиња се опредијелила за алкалну верзију Комет теста. Комет тест је адекватан и савремен метод процјене генотоксичности и посједује многобројне предности у поређењу са другим тестовима: брузу анализу, једноставност, високу осјетљивост, не захтијева велики број ћелија по узорку (<10,000), примјењив је на готове све еукариотске ћелије, флексибилност. У раду је кориштена нормална ћелијска линија MRC-5, нормални хумани фибробласти плућа. У оквиру реализације Комет теста урађено је следеће:

- Припрема реагенаса, односно пуфера за лизу, електрофорезу и неутрализацију и раствора за бојење (Etidijum Bromid).
- Припрема слајдова за SCGE/Komet test
- Третман ћелија
- Електрофореза микрогел слајдова у алкалним условима (pH>13).
- Евалуација ДНК оштећења флуоресцентним микроскопом
- Квантификација SCGE података посебним системом за анализу слике (Комет 5 софтвер) повезаним са камером у циљу квантитативне и квалитативне процјене ДНК оштећења
- Анализа 50-100 насумично изабраних ћелија по узорку

У *ин виво* студији поткожне имплантације пацови су подијељени у двије експерименталне групе (I и II). Након увођења пацова у општу анестезију (Кетамин 90 mg/kgtt и Ксилазин 5 mg/kgtt) код свих животиња је урађена инцизија и формирана 2 ћепа дубине 15 mm у које су аплициране стериилне полиетиленске тубице. I група десно: тубица до пола испуњена са ALBO-СА, лијево са MTA; II група десно: тубица до пола испуњена са ALBO-CSHA, лијево са MTA. Празна половина ћевчице је представљала негативну контролу, а MTA позитивну контролу. По 6 пацова сваке групе је жртвовано у 3 опсервационе периода (7, 15, 30 дана). Узорци поткожног ткива са полиетиленским тубицама су похрањени у 10 % формалин и достављени лабораторији Завода за патологију, Клиничког центра у Бањалуци. Патохистолошки су анализирани: инфламација, крварење, фиброзна капсула и интегритет ткива око имплантираног материјала.

У *ин виво* студији директног прекривања пулпе пацови су подијељени у двије експерименталне групе (A и B). Након увођења пацова у општу анестезију (Кетамин

50 mg/kgtt) урађена је препарација кавитета на оклузалној површини некариозних првих и других горњих молара, трепанација кавума пулпе оштром сондом и аплициран материјал за ДПП (група А десно: на оба горња молара ALBO-CA, лијево: MTA; група Б десно: ALBO-CS, лијево: први горњи молар ALBO-CSHA, други горњи молар MTA. Кавитети су дефинитивно рестаурисани композитом (Tetric Ceram). По 6 пацова сваке групе је жртвовано у 3 опсервационе периода (7, 15, 30 дана). Извршена је декапитулација, а потом узорци достављени лабораторији Завода за патологију на даљу патохистолошку анализу. Анализиран је инфламаторни одговор пулпе, присуство бактерија, а узимано је у обзир и формирање дентинског моста, као могући показатељ успјешности терапије.

*Промјена у односу на план истраживања који је представљен у пријави ове докторске дисертације се односи на увођење *in vitro* студије испитивања генотоксичности материјала примјеном Комет теста.*

Сви испитивани параметри пружајуовољно елемената који чине ово истраживање квалитетним.

Статистичка обрада података је била адекватна. Средње вриједности и стандардне девијације резултата МТТ теста су рађене у Microsoft Excel-u. За статистичку обраду резултата Комет тестије кориштен Comet Assay IV (Perceptive Instruments), а за статистичку анализу добијених резултата поткожне имплантације и ДПП-е је примијењен параметријски Dunn's test и Wilkoksonov непараметријски тест за зависне узорке. Резултати су приказани табеларно и на сликама.

Анализирајући обрађени материјал, описане методе и материјал истраживања, а имајући у виду досадашња искуства и достигнућа у овој области комисија констатује да су примијењене методе адекватне, а испитивани параметриовољно обрађени и објективно тумачени.

VI РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

VI 1. Резултати истраживања

Добијени резултати ове докторске дисертације приказани су на 31 страници, а анализирани су кроз дискусију на 19 страница. У првој фази истраживања извршена је процјена цитотоксичности калцијум алуминатног цемента CA, калцијум силикатног цемента CS, калцијум силикатног хидроксиапатита CS-HA и MTA (MTA Angelus) према MRC-5 ћелијама примјеном МТТ теста. Цитотоксичност елуата испитиваних цемената је тестирана у пет опадајућих концентрација 66,7 mg/ml, 33,3 mg/ml, 16,7 mg/ml, 8,3 mg/ml и 4,2 mg/ml. CA, CS и MTA нису испољили цитотоксичне ефекте те је констатован веома висок проценат преживљавања ћелија и при највећој примијењеној концентрацији ових материјала (66,7 mg/mL): за CA 89,5 %, за CS 85,1%, а за MTA 90,8 %. Најснажније цитотоксично дејство је испољио CS-HA са $IC_{50}=41,28$ након првог циклуса тестирања; $IC_{50}=49,35$ након другог циклуса; односно $IC_{50}=49,27$ након трећег понављања МТТ теста. Кандидаткиња је логички и јасно продискутовала резултате ове фазе истраживања, те их упоредила са сличним истраживањима која су рађена до данас.

У другој фази истраживања је извршена процјена генотоксичног ефекта калцијум алуминатног цемента CA и калцијум силикатног хидроксиапатита CS-HA према MRC-5 ћелијској линији примјеном алкалне верзије Комет тестија. Екстракт калцијум алуминатног цемента није испољио генотоксични ефекат тј. проценат оштећења DNK и при највећој примијењеној концентрацији цемента је износио 9,6 % и остао на нивоу нетретираних контролних ћелија. Екстракт калцијум силикатног

хидроксиапатитног цемента је показао генотоксични потенцијал при концентрацијама $\geq 12,5 \text{ mg/mL}$.

Резултати треће фазе истраживања, поткожне имплантације полиетиленских тубица, код пацова, су показали да је запаљенска реакција код свих испитиваних материјала и њихових контрола била најизраженија у првих 7 дана поткожне имплантације, док након 15, а нарочито након 30 дана долази до пада у интензитету запаљења. Калцијум алуминатни цемент CA је показао упоредив резултат са калцијум силикатним цементима, изузев првог опсервационог периода, након 7 дана, када је уочена слабије изражена запаљенска реакција код CA у односу на MTA. Васкуларна конгестија је, као и запаљенска реакција, била најизраженија након 7 дана, након 15 дана је била слабија, а након 30 дана минимална или одсутна. Након 7 и након 15 дана је уочена мања васкуларна конгестија на мјесту имплантације CA у односу на CSHA и MTA. Код свих испитиваних материјала и њихових контрола је запажено повећање дебљине фиброзне капсуле у функцији времена, најтања је била након 7 дана. Након 30 дана најдебља фиброзна капсула је констатована код CA. Највећа нарушеност структуре везивног ткива код свих испитиваних материјала је констатована након 7 дана, након 15 дана је била мања, а након 30 је регистрована минимална нарушеност структуре или комплетно очување. CA је по питању интегритета везива имао упоредив резултат са калцијум силикатима.

Резултати четврте фазе овог истраживања, директног прекривања пулпе пацова Wistar соја наноструктурним CA, CS, CSHA и MTA су показали да бактерије нису биле присутне ни у једном узорку. Кандидаткиња је јасно и логичким редослиједом приказала добијене вриједности инфламаторног одговора пулпе и формирања дентинског моста. Најслабији инфламаторни одговор пулпе зуба пацова је проузроковао CA код кога је запаљење пулпе било одсутно у чак 66,67 % случајева, слиједи га CSHA (66,7 %) који је имао сличне процентуалне вриједности инфламације пулпе као и CA, с том разликом што је показао мало већу заступљеност присуства великог броја полиморфонуклеарних леукоцита (11,1%). Материјал MTA је следећи по висини инфламаторног одговора (60,95%) будући да има већи проценат инфламаторног одговора пулпе у односу на CA и CSHA, сличне вриједности присуства малог броја полиморфонуклеарних леукоцита (22,4%), сличан или већи проценат присуства великог броја полиморфонуклеарних леукоцита (11,1%) и једини је имао присуство некрозе пулпе (5,55%). Утврђене су разлике у висини инфламаторног одговора пулпе између CA и MTA као и између CSHA и MTA. Највиши инфламаторни одговор пулпе је проузроковао CS (55,56%), који је имао и највећи проценат присуства малог броја полиморфонуклеарних леукоцита (38,89%). Постојале су разлике у висини инфламаторног одговора пулпе између CA i CS, као и између CS i CSHA. Анализа формирања дентинског моста на зубима пацова након 30 дана показала је да су сва 4 испитивана материјала у највећем проценту довела до формирања дентинског моста. Највећу учесталост формирања дентинског моста је имао материјал CA (72,22 %) док је формирање дентинског моста изостало у 27,78 % случајева. Након примјене MTA до формирања дентинског моста је дошло у 61,11% случајева, док су најмању способност формирања дентинског моста показали CS и CSHA код којих је исти формиран у 55,56 % случајева. Постојала је разлика у формирању дентинског моста између CA i CS, између CA i CSHA, као и код MTA у односу на CS i CSHA. На основу добијених резултата цитотоксичности и генотоксичности као и резултата поткожне имплантације и ДПП-е кандидаткиња је извела сљедеће закључке:

-Наноструктурни биоматеријал на бази калцијум алумината није испољио цитотоксичност на хуманим плућним фибробластима. Констатован је веома висок проценат преживљавања ћелија (89,5 %) и при највећој примијењеној концентрацији материјала.

-Наноструктурни биоматеријал на бази калцијум алумината није показао генотоксични потенцијал на хуманим плућним фибробластима. Проценат оштећења ДНК при свим примијењеним концентрацијама је био на нивоу нетретираних контролних ћелија.

-Наноструктурни биоматеријал на бази калцијум алумината је потврдио биокомпатибилност у *ин виво* условима, на експерименталним животињама, имплантацијом материјала у поткожно ткиво пацова.

-Поткожна имплантација наноструктурних биоматеријала на бази СА је послиje 7 дана изазвала умјерену запаљенску реакцију везивног ткива, послиje 15 дана је дошло до значајнијег опадања интензитета запаљенске реакције и формирања танке капсуле, а послиje 30 дана је уочена дебела фиброзна капсула са благо нарушеним интегритетом везивног ткива.

-Након ДПП наноструктурним биоматеријалом на бази калцијум алумината код већине испитиваних узорака зуба је констатовано одсуство запаљења или свега неколико присутних раштрканих упалних ћелија. Бактерије нису биле присутне нити у једном узорку.

-Наноструктурни биоматеријал на бази калцијум алумината је индуковао стварање комплетног дентинског моста.

VI 2. Критичност и коректност тумачења резултата

Резултати истраживања су приказани на прегледан начин. Они су јасно и објективно тумачени, а кандидаткиња је показала објективан и критички став у процјени ових резултата, посебно у дијелу који се односи на компарацију са резултатима сличних истраживања. Дискусија резултата показује да је кандидат способан да прикупи, обради, презентује резултате на врло прегледан начин, као и да на јасан и своеобухватан начин разматра приказане резултате и упореди их с литературним подацима.

VI 3. Теоријски и практични допринос дисертације и нови истраживачки задаци

Основни теоријски допринос дисертације је следећи:

Ова докторска дисертација проширује постојећа знања о калцијум алуминатним цементима.

Основни практични допринос дисертације је следећи:

Захваљујући посебном начину синтезе добијена је структура материјала сачињена од три хијерархијска нивоа (агломерати, честице и кристалити). Агломерати су величине честице од 117-477 nm, а честице кристалита су величине 20 nm. Оваква структура материјала не доводи до деструкције ткива, с обзиром да димензије агломерата нису компарабилне са порама унутар ћелијске мемране. С друге стране, познато је да је величина честица праха главни фактор који утиче на степен хидратације цемента, односно на његову чврстоћу и везивање. Честице мање величине обезбеђују већу површину доступну за хидратацију те поспјешују рано очвршћавање материјала. С тим у вези, наноструктура ових нових биоактивних материјала обезбеђује изражену активност честица која је важна за брже везивање, што је у односу на МТА значајна предност. Ови материјали такође показују бОља реолошка својства и лакше руковање, што је значајно са аспекта њихове клиничке примјене. Очекује се да ће резултати ове студије, између остalog, бити употребљени за унапријеђење протокола директног прекривања пулпе зуба.

Основни правци даљих истраживања:

Резултати ове дисертације, дају одговоре на постављени проблем истраживања, али и указују на наредне правце истраживања. Одсуство цитотоксичног и генотоксичног потенцијала калцијум алуминатног цемента као и његово задовољавајуће биолошко понашање у поткожном ткиву и пулпи пацова охрабрује да се наставе истраживања овог материјала у будућности и другим експерименталним и клиничким студијама.

VII ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ

Докторска дисертација мр сц. Огњенке Јанковић под називом „Биокомпатибилност наноструктурних биоматеријала на бази калцијум алумината“ израђена је у складу са образложењем које је кандидат приложио приликом пријаве теме.

Докторска дисертација је урађена према правилима и принципима научно истраживачког рада и резултат је оригиналног научног рада кандидата. Резултати добијени примјеном МТТ и Комет теста јасно су указали на одсуство цитотоксичног и генотоксичног ефекта новосинтетисаних наноструктурних калцијум алумината и представљају значајан научни допринос. Такође, резултати су јасно показали да наноструктурни биоматеријал на бази калцијум алумината ткива веома добро толеришу приликом поткожне имплантације, а након поступка ДПП је индуковао формирање комплетног дентинског моста. Кандидаткиња је на основу резултата поставила оквир за даља истраживања. Поред тога кандидаткиња је прецизно и логички анализирала предложену тему истраживања и довела податке у везу са постављеном хипотезом. Такође, кандидаткиња је тему ове дисертације, кроз јасно и концизно писање учинила интересантном и корисном и за истраживаче и за практичаре. Дисертација представља оригинални допринос стоматолошкој науци, јер проширује постојећа знања о биокомпатибилности наноструктурних калцијум алуминатних система.

Чланови Комисије, на основу укупне оцјене докторске дисертације једногласно дају позитивну оцјену о завршеној докторској дисертацији под називом: „Биокомпатибилност наноструктурних биоматеријала на бази калцијум алумината“ мр сц. Огњенке Јанковић и предлажу члановима Наставно-научног вијећа Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци и Сенату Универзитета у Бањој Луци да прихвате овај Изјештај и омогуће кандидату да своју докторску дисертацију јавно брани.

ПОТПИС ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Датум: 12.06.2018.

1.
Доц. др Смиљана Параш, предсједник

2.
Проф. др Славољуб Живковић, ментор и члан
3.
Доц. др Ирена Кузмановић Радман, члан

4.
Доц. др Адријана Арбутина, резервни члан