

Наставно-научном већу Медицинског факултета Универзитета у Београду

На седници **Наставно-научног већа** Медицинског факултета Универзитета у Београду, одржаној 31.5.2022.год., именована је комисија за оцену завршене докторске дисертације под насловом:

„Анализа квалитета виличних костију код типа 2 дијабетеса и алкохолне цирозе јетре: анатомска и микроструктурна анализа“

кандидата др Теодоре Родић, запослене на Медицинском факултету Универзитета у Београду. Ментор је доц. др Петар Миловановић.

Комисија за оцену завршене докторске дисертације именована је у саставу:

1. Проф. др Марија Ђурић, професор Медицинског факултета Универзитета у Београду,
2. Проф. др Јелена Сопта, професор Медицинског факултета Универзитета у Београду,
3. Доц. др Мирослав Васовић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

На основу анализе приложене докторске дисертације, комисија за оцену завршене докторске дисертације једногласно подноси Научном већу Медицинског факултета следећи

ИЗВЕШТАЈ

А) Приказ садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација др Теодоре Родић написана је на енглеском језику на укупно 94 стране и подељена је на следећа поглавља: увод, циљ истраживања, материјал и метод, резултати, дискусија, закључци и литература. У дисертацији се налази укупно 35 табела и 24 панел-слике које укључују слике, графиконе и цртеже. Докторска дисертација садржи сажетак на енглеском и српском језику, биографију кандидата, податке о комисији, изјаве захвалности и изјаве о ауторству.

У **уводу** су описане хијерархијска организација кости и квалитет кости. На адекватан начин и у потпуности су дефинисани тип 2 дијабетеса (Т2ДМ) и његов утицај на квалитет кости, патофизиолошки процеси који доводе до промене квалитета кости вилица у Т2ДМ. Наведен је до данас познати утицај лекова у Т2ДМ на квалитет виличне кости уз навођење савремених референци. Написано је какав је процес клиничког одлучивања за пацијент Т2ДМ у оралнохируршкој пракси. Алкохолна цироза јетре (АЦЈ) је дефинисана патохистолошки и клинички. Приказани су утицај АЦЈ на квалитет кости и

ефекат АЦЈ на квалитет кости доње вилице. Наведено је какав изазов представљају пацијенти са АЦЈ у оралнохируршкој пракси. Наведене одељке прате оригиналне и јасне слике које поткрепљују текст.

Циљеви рада су прецизно дефинисани. Извршено је поређење микроструктуре, састава и ћелијских својства кости доње вилице између особа са Т2ДМ-оми здравих особа контролне групе. Испитано је да ли се коштане карактеристике пацијената са Т2ДМ разликују у зависности од начина лечења (орални антидијабетици (ОАД) или инсулин) и да ли зависе од посматраног региона доње вилице. Циљ је био и да се упореде микроструктура, састав и ћелијска својства кости доње вилице између појединаца са АЦЈ-е и здравих особа контролне групе, као и да се испита да ли се коштане карактеристике разликују зависно од посматраног региона доње вилице.

У поглављу **материјал и методе** је наведено да се ради о опсервационој кадаверичној студији која је спроведена на Медицинском факултету Универзитета у Београду. Микроструктура кости региона ангулуса и безубог алвеоларног гребена доњег првог молара је била процењена помоћу микрокомпјутеризоване томографије (*Skyscan 1172 micro-CT, Bruker, Kontich, Белгија*) у резолуцији од 10 μ m. Одвојено је анализиран кортикални и трабекуларни одељак кости. 3Д квантитативни параметри микроархитектуре кости су дефинисани у табели. Морфологија остеона (број остеона и дебљина њиховог зида) су биле анализирани у софтверу за обраду слика (*Image J, Fiji*). Процена коштане минерализације је била извршена квантитативним имидингом повратним распршењем електрона (*qBEI*). Приказан је оригиналан графикон са тумачењем параметара *qBEI* мерења. Састав минералне и органске фазе кости, који указује на механичка својства коштано-матрикса, је био одређен Раман спектроскопијом (*inVia, WiRE 5.1., Renishaw*). Карактеристике ћелија и узорака коштано-ткива су биле испитане применом хистоморфометрије. Исечци ткива су били обојени толумидин плавим и Масон-Голднер трихромним бојењем. Индекси коштаних ћелија и ткива, који указују на својства коштаних ћелија и односе између активних и неактивних површина костију, су били утврђени коришћењем система за хистоморфометрију *OsteoMeasure (Osteo Metrics, Atlanta, GA, USA)*. Сви параметри везани за коришћене методологије су јасно дефинисани у табелама.

Ова студија је спроведена у складу са Хелсиншком декларацијом, а одобрена је и од стране Етичког комитета, Медицинског факултета Универзитета у Београду. Предложени истраживачки приступ и методологија су савремени и прикладни за темељно истраживање квалитета кости на више нивоа посматрања.

У поглављу **резултати** детаљно су описани и јасно представљени сви добијени резултати.

Дискусија је написана јасно и прегледно, уз приказ података других истраживања са упоредним прегледом добијених резултата докторске дисертације.

Закључци сажето приказују најважније налазе који су проистекли из резултата рада.

Кориштена литература садржи списак од 112 референци.

Б) Провера оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Анализа квалитета виличних костију код типа 2 дијабетеса и алкохолне цирозе јетре: анатомска и микроструктурна анализа” др Теодоре Родић, утврђено подудараре текста износи 51%.

Доминантан део (43%) подударности последица је претходно публикованих резултата докторандових истраживања који су проистекли из ове докторске дисертације. Од тога је софтвер препознао исти текст на два различита линка издавача, у једном са 29% преклапања а у другом са 14% преклапања.

Преосталих 8% подударности су у доброј мери последица тога што су у анализу подударности укључене и обавезне изјаве које се прилажу уз тезу (изјава о ауторству итд.), које су наравно идентичне код свих докторанада; осим тога, постоје подудараре имена комплексних хистоморфометријских или других техничких параметара који се користе у истраживањима, неких цитата, општих места и података, случајних преклапања неких од бројева, или сличности у примени статистичких тестова, што је у складу са чланом 9. Правилника.

В) Кратак опис добијених резултата

Упоређени су параметри коштане микроструктуре, хемијског састава и ћелија код особа са Т2ДМ и здравих контрола у зависности од региона доње вилице. У ангулусу доње вилице Т2ДМ је показала нижу порозност лингвалног кортекса ($p=0.004$). У трабекуларној кости ангулуса доње вилице, већа дебљина трабекула ($p=0.008$), мањи број минерализованих остеоцитних лакуна ($p=0.049$) и мање лакуне ($p=0.03$) су нађени у Т2ДМ групи. Више пакета хиперминерализоване кости је нађено у букалном кортексу ангулуса доње вилице ($p=0.034$) у подгрупи Т2ДМ леченој инсулином у поређењу са подгрупом Т2ДМ леченој ОАД-има. У региону молара, нађена је већа хетерогеност садржаја калцијума у трабекуларној кости лечених инсулином у поређењу са контролом ($p=0.015$) и подгрупом леченом ОАД-има ($p=0.019$). Такође, трабекуларна кост у региону молара је показала нижу фракталну димензију ($p=0.028$) и већи број остеокласта у Т2ДМ у поређењу са контролном групом ($p=0.042$). Лингвални кортекс у региону молара није показао промене у Т2ДМ. Букални кортекс у региону молара је имао нижи број минерализованих лакуна остеоцита ($p=0.04$) и виши однос карбоната према фосфатима у Т2ДМ групи у поређењу са контролном групом ($p=0.009$). Унутаргрупна поређења између различитих региона (регион ангулуса у поређењу са регионом молара) у групи и подгрупама Т2ДМ је показала већу кортикалну порозност у региону молара у односу на регион ангулуса у Т2ДМ групи ($p=0.007$).

Слично као у делу студије о квалитету виличне кости у Т2ДМ, уочена је и значајна варијабилност у квалитету виличне кости између АЦЈ и здравих контрола. Трабекуларна

кост региона молара је показала мање лакуне у АЦЈ у поређењу са контролном групом ($p=0.002$). Лингвални кортекс региона молара је показао мању затворену порозност у АЦЈ у поређењу са контролном групом ($p=0.003$). Букални кортекс региона молара је имао већу кортикалну порозност ($p=0.02$) и нижи однос карбоната према фосфатима у АЦЈ групи ($p=0.008$). Трабекуларна кост региона ангулуса је имала нижи садржај калцијума ($p=0.042$), мањи број пакета хиперминерализоване кости ($p=0.036$), мањи број остеокласта ($p=0.032$) и тенденцију ка нижем броју остеобласта ($p=0.056$) у АЦЈ групи у поређењу са контролном групом. Лингвални кортекс у региону ангулуса је показао тенденцију према већој отвореној порозности ($p=0.098$) и дијаметру пора у АЦЈ ($p=0.002$). Букални кортекс региона ангулуса је показао већу затворену порозност ($p=0.007$) у АЦЈ групи у поређењу са контролном групом. Унутаргрупна поређења између различитих региона (регион ангулуса у поређењу са регионом молара) у АЦЈ групи су показала микроструктурне разлике у трабекуларној геометрији, као што је су виши степен анизотропије у региону ангулуса ($p=0.001$) и виша фрактална димензија у региону молара ($p=0.033$).

Резултати ове пост мортем студије сугеришу да је Т2ДМ изазвао микроструктурне промене виличне кости, што се испољава једноставнијом микроструктурном геометријом трабекуларне кости региона молара и већом дебљином трабекула у региону ангулуса. И терапија инсулином и ОАД-има је подстакла ремоделовање трабекуларне кости. ОАД су изазвали повећану ресорпцију у региону молара неколико година након вађења зуба, док је терапија инсулином доминантно изазвала поремећаје у минерализацији. ОАД терапија је изазвала ефекат попуњавања пора у лингвалном кортексу региона ангулуса. Терапија инсулином је изазвала стварање пакета хиперминерализоване кости и слојеве коштаног ткива различитог садржаја кацијума у свим посматраним регионима доње вилице. Коштано ткиво код корисника ОАД терапије је имало поремећен садржај карбоната у поређењу са кости здравих особа. Смањен број минерализованих лакуна у Т2ДМ у поређењу са здравим особама сугерише још млађе коштаног ткивно доба због бржег ремоделовања изазваног Т2ДМ-ом. Дебљина виличног кортекса остаје непромењена у Т2ДМ. Све промене у квалитету кости су се морале развити под утицајем локалних и системских фактора специфичних за сваки регион виличне кости.

Нађено је и да АЦЈ изазива промену микроструктуре виличне кости, што се огледа у већој затвореној порозности у кортикалној кости, као и у мањој величини лакуна у трабелукарној кости у региону молара. Трабекуларна кост региона ангулуса има мањи садржај калцијума и мању ресорптивну активност код особа са АЦЈ него код здравих особа. Хемијска структура кости је промењена у букалном кортексу региона молара, са већим садржајем карбоната у АЦЈ у поређењу са оним код здравим особама. Овакве карактеристике коштаног ткива су се морале развити под утицајем системских и локалних фактора за сваки коштани регион вилице. Наши налази доводе до закључка да је квалитет виличне кости промењен у АЦЈ по питању микроструктуре, минерализације, састава коштаног ткива и ћелијске активности.

Г) Упоредна анализа докторске дисертације са резултатима из литературе

Микро-ЦТ процена трабекуларне кости региона молара је показала нижу фракталну димензију у Т2ДМ, што означава мању структурну комплексност овог коштаног региона Т2ДМ, независно од антидијабетесне терапије. Недавна студија је поредила фракталну димензију кости доње вилице на дигиталним ортопанима особа са Т2ДМ и здравим контролама, али није нашла значајну разлику [Kurşun-Çakmak, 2018]. У овом истраживању дводимензионални ортопан је подвргнут знатној компјутерској обради пре анализе у *Image J* софтверу, за разлику од истраживања у приказаној докторској тези, где је фрактална димензија рачуната директно на микро-ЦТ тродимензионалним снимцима.

Нађено је да постекстракционе ране инсулин-зависних Т2ДМ пацијената са добром контролом болести зарастају добро, али са малом али статистички значајном разликом у броју постекстракционих компликација које укључују инфекцију [Power 2019]. Даље, постоје докази о смањеној активности остеобласт и повећаној коштаног ресорпцији у Т2ДМ [Pietschmann 2019]. Постоје и докази о смањеној активности остеобласта, док резултати о повећаној активности остеокласта нису конзистентни [Palermo 2017, Murray 2019]. Друге студије су чак пријавиле инхибирану функцију остеокласта и диференцијацију у дијабетичном окружењу [Kasahara 2010, Wittrant 2008, He 2004]. Због контрадикторних налаза и уопштено занемареног ефекта који је био уочен код остеокласта, чини се вероватним да је смањено стварање нове кости у дијабетесу највише због инхибираних остеобластних и прогениторних ћелија него због промене у коштаног ресорпцији.

Т2ДМ ОАД подгрупа је показала виши број остеокласта по дијаметру кости у трабекуларној кости региона молара, у поређењу са контролама и Т2ДМ инсулин подгрупом. Осим тога, исти регион је показао вишу запремину остеоида по запремини кости у истој групи. Ови налази сугеришу интензивнију ремоделацију кости у региону молара у Т2ДМ. Диференцијација остеокласта може бити фаворизована ОАД терапијом. Налази у савременој литератури везани за ремоделацију алвеоларне кости код пацијената са Т2ДМ и пародонтопатијом су донекле контрадикторни. Неколико студија о пародонтопатији су пријавиле повећано стварање и активност остеокласта и ниже стварање кости кроз повећање односа РАНКЛ/ОПГ (рецептором активирани нуклеарни к-Б лиганд/ остеопротегерин) и запаљењских медијатора попут интерлеукина-17 [Wu 2015, Liu 2006, Pacios 2012, Xiao 2017]. Друге студије на особама са дијабетесом на ванмаксиларним регионима говоре у прилог смањеног стварања кости у Т2ДМ [Yamamoto 2012, Jiajue 2014]. Ипак, с обзиром да ова студија укључује алвеоларну кост људског порекла, али не укључује пародонтопатију, зарастање рана или локалну упалу, за очекивати је да су механизми коштане ремоделације безубог региона молара и ангулуса нешто другачији од механизма описаних у пародонтопатији, зарастању рана или локалној упали [Marin 2020]. На пример, остеокласти би могли бити активирани дисбалансом односа РАНКЛ/ОПГ, јер ови медијатори учествују у апоптози остеобласта [Wu 2015], могуће путем моноцитно колони-стимулишућег фактора (МЦСФ). Штавише, налази овог истраживања нису у контрадикцији са чињеницом да терапија инсулином има доказан анаболички ефекат на коштану ткиво, док ОАД има различит ефекат на коштану ремоделацију [He 2004, Thrallkil 2005].

Већа хетерогеност минерализације код случајева лечених инсулином може указивати на присуство пакета младе ремоделоване кости поред делова старе кости. Знајући да инсулин има анаболички ефекат на кост [Thraillkil 2005], трабекуларна кост је највероватније била претходно интензивно ремоделована, што је довело до приказа слојева кости различитог доба истовремено у време посматрања.

Трабекуларна кост региона ангулуса је показала већу дебљину трабекула у Т2ДМ и Т2ДМ подгрупи. Овај налаз је у сагласности са експериментом на моделу свиња са дијабетесом где је процењена коштана микроструктура вилице испод региона молара [von Wilmsky 2016]. Исти регион је показао нижи број минерализованих остеоцитних лакуна у свим Т2ДМ групама у поређењу са контролама. Како је мали број минерализованих лакуна генерално знак млађе кости, као што су навеле друге студије [Milovanovic 2015, Busse 2010, Weinkammer 2019], мали број минерализованих лакуна у овом сегменту кости би могао бити знак да је кост комплетно ремоделована.

Трабекуларна кост региона молара је показала значајно нижи број остеоцитних лакуна у АЦЈ. Овај налаз може бити интерпретиран као последица системског инфламаторног стања присутног у АЦЈ [Handzlik-Orlik 2016, Lopez-Larramona 2013]. Као што је истакнуто од стране González-Reimers (2014), АЦЈ показује директни токсични ефекат етанола на виталност ћелија и могуће дефектну синтезу протеина, што би могло изазвати стварање мањих остеоцита, и последично мање остеоцитне лакуне.

Лингвални кортекс региона молара је открио већу затворену порозност у АЦЈ у поређењу са контролама. Како виша порозност смањује снагу кости, може се рећи да је налаз овог истраживања у складу са претходно објављеним радовима са АЦЈ на другим скелетним регионима, као што су фемур и лумбална кичма [Wakolbinger 2019, Jadzic 2020, Sulafic 2015]. Ремоделација кости може биоти поремећена због системских инфламаторних услова, који резултирају у томе да АЦЈ показује знаке повишене коштане ресорпције у неким регионима скелета. Стимулација производње интерлеукина 6, која активира РАНКЛ и остеокласте, је могућ механизам за повећану затворену порозност нађену у овом истраживању [Wakolbinger 2019, Magdaleno 2017, Farbega 2005].

Супституција карбонатима се повећава са годинама, што погоршава механичке особине коштаног ткива и резултира у повећаном ризику од фрактура врата бутне кости [Boskey 2013, Carretta 2013, Ojanen 2015]. Даље, букални кортекс је често оштећен током екстракције доњег првог молара [Chrcanovic 2012]. Како АЦЈ узрокује поремећај у стварању кости, оштећење ћелија изазвано оксидативним стресом и дефектну синтезу протеина [González-Reimers, 2014], и повећана затворен акортикана порозност и повећан однос карбоната према фосфатима у овом коштаном региону су разумљиви налази.

Нађени су значајно нижи параметри коштане ресорпције и нижи број нових остеоцита уроњних у коштани матрикс и тенденција ка нижем броју остеокласта у трабекуларној кости региона ангулуса у групи са АЦЈ. Остеокластна активност је нула у овом региону у АЦЈ, за разлику од одговарајућег региона АЦЈ групе. Међу научницима је у току дебата о ефектима АЦЈ на ремоделацију кости [Jeong & Kim, 2019; Monegal et al.

2007a]. Генерално је прихваћено да етанол смањује стварање кости, али је присутно неслагање везано за његов ефекат на коштану ресорпцију. Према неким студијама, етанол узрокује и смањено стварање кости и повећану ресорпцију кости [Gonzales-Reimers, 2015]. Резлтати приказаног докторског истраживања су у складу са тренутним схватањем динамике коштаног ткива у АЦЈ.

Д) Објављени радови који чине део докторске дисертације

Rodic T, Wölfel EM, Milovanovic P, Fiedler IAK, Cvetkovic D, Jähn K, Amling M, Sopta J, Nikolic S, Zivkovic V, Busse B, Djuric M. Bone quality analysis of jaw bones in individuals with type 2 diabetes mellitus-post mortem anatomical and microstructural evaluation. Clin Oral Investig. 2021 Jul;25(7):4377-4400. doi: 10.1007/s00784-020-03751-1. Категорија часописа је M21, а импакт фактор је 3,573.

Б) Закључак (образложење научног доприноса дисертације)

Докторска дисертација „Анализа квалитета виличних костију код типа 2 дијабетеса и алкохолне цирозе јетре: анатомска и микроструктурна анализа“ др Теодоре Родић је открила да Т2ДМ и АЦЈ мењају квалитет кости доње вилице, као и да промене изазване Т2ДМ-ом и АЦЈ-ом различито утичу на различите регионе и коштане одељке доње вилице. Осим тога, специфичне разлике између региона ангулуса доње вилице и безубог алвеоларног гребена региона доњег првог молара су од интереса оралним и максилофацијалним хирурзима. Резултати ове тезе би могли створити више могућности за уградњу титанијумских имплантата и фиксационих шrafoва код пацијената са Т2ДМ и АЦЈ. Све укупно, резултати ове тезе ће вероватно створити основу за разматрање током израде плана терапије у оралној и максилофацијалној хирургији ових пацијената.

Ова докторска дисертација је урађена према свим принципима научног истраживања. Циљеви су били прецизно дефинисани, научни циљ је био оригиналан и пажљиво изабран, а методологија рада је била савремена. Резлтати су прегледно и систематично приказани и дискутовани, а из њих су изведени одговарајући закључци.

На основу свега наведеног, и имајући у виду досадашњи научни рад кандидата, комисија предлаже Научном већу Медицинског факултета Универзитета у Београду да прихвати докторску дисертацију др Теодоре Родић и одобри њену јавну одбрану ради стицања академске титуле доктора медицинских наука.

У Београду, _____

Ментор:

Чланови комисије:

Доц. др Петар Миловановић

Проф. др Марија Ђурић

Проф. др Јелена Сопта

Доц. др Мирослав Васовић