

**Наставно-научном вијећу Медицинског факултета
Универзитета у Бањалуци**

Сенату Универзитета у Бањалуци

Одлуком Наставно-научног вијећа Медицинског факултета, Универзитета у Бањалуци број 18-3-907/2012 од 03.12.2012.године именована је Комисија за оцјену подобности теме и кандидата мр сц.мед. Игора Сладојевића, за израду докторске тезе под називом „Квантитативна анализа менискуса и синовијалне мембране зглоба кољена човјека“.

Комисија у саставу:

1. Др Наталија Стефановић, редовни професор, ужа научна област Анатомија, Факултет спорта и физичког васпитања, Универзитет у Нишу, предсједник;
2. Др Зденка Кривокућа, редовни професор, ужа научна област Анатомија, Медицински факултет Бањалука, члан;
3. Др Радослав Гајанин, ванредни професор, ужа научна област Патологија, Медицински факултет Бањалука, члан,

је прегледала материјал за пријаву теме докторске тезе кандидата мр.сц.мед. Игора Сладојевића и подноси сљедећи

**ИЗВЈЕШТАЈ
О ОЦЈЕНИ ПОДОБНОСТИ ТЕМЕ
И КАНДИДАТА ЗА ИЗРАДУ ДОКТОРСKE ТЕЗЕ**

1. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ, НАУЧНА И СТРУЧНА ДЈЕЛАТНОСТ КАНДИДАТА

• **Основни биографски подаци, дипломе и звања**

- Мр сц.мед. Игор Сладојевић је рођен 20.11.1975.год. у Бањалуци
- Адреса: Медицински факултет, Универзитет у Бањалуци, Саве Мркаља 14, 78000 Бањалука
- Телефон: +387 51 234 131
- Факс: +387 51 215 454
- Е-mail: igor.sladojevic@gmail.com

Образовање

- Основну и средњу школу завршио у Бањалуци

1996-2003 - Медицински факултет Бањалука, додипломски студиј

- Просјек оцјена: 8,67

- У току додипломских студија био је члан Секције за борбу против наркоманије Савеза Студената Медицинског факултета и радио као хонорарни сарадник Queens универзитета на пројекту развоја породичне медицине у Републици Српској.

2003-2005 - Постдипломски студиј „Биомедицинска истраживања“, Медицински факултет, Универзитет у Бањалуци

- Просјек оцјена: 10,00

Напредовање у професији

2004- 2009 - Асистент, Катедра за анатомију, Ужа научна област Анатомија, Медицински факултет, Универзитет у Бањалуци

2010- сад - Виши асистент, Катедра за анатомију, Ужа научна област Анатомија, Медицински факултет, Универзитет у Бањалуци

2010- сад - Специјализант физикалне медицине и рехабилитације

Чланство у професионалним удружењима

- Члан Секције за клиничку и примењену анатомију Српског лекарског друштва
- Члан Српског анатомског друштва

Остало

- Учесник у пројектима

- eNIGISo BiH (Портал електронског здравства и електронског образовања у континуираној медицинској едукацији у Босни и Херцеговини), за који је био коаутор анатомског дијела електронског курса "Дигестивна хирургија"

-AMI-4EUROPE, FP-7 пројекта о напредном медицинском имиџингу.

Активно се служи енглеским језиком.

БИБЛИОГРАФИЈА

Магистарски рад

2009 „Морфолошке и морфометријске карактеристике екстраокуларних мотонеурона“;

Ужа научна област: Анатомија

Оригинални научни рад у часопису међународног значаја

1. Гајанин В, Кривокућа З, Костић К, Гајанин Р, **Сладојевић И**. Significance of vascular endothelial growth factor expression in skin melanoma. *Vojnosanit Pregl*. 2010 Sep;67(9):747-54.

2. Гајанин В, Кривокућа З, Гајанин Р, Вујковић З, **Сладојевић И**, Зрнић Б. Expression of vascular endothelial growth factor in melanocytic nevi. *Med Pregl*. 2011 Jan-Feb;64(1-2):29-34.

3. **Сладојевић И**, Кривокућа З, Бућма Т, Гајанин В. Квантитативна анализа васкуларне мреже једара окулогирних живаца. *Med Pregl* 2011; LXIV (3-4):143-147.

Оригинални научни рад у часопису националног значаја

1. Гајанин В, Кривокућа З, Гајанин Р, Кривокућа Б, Зрнић Б, **Сладојевић И**, et al.

Стереолошка анализа меланоцитних промјена коже. *Scr Med* 2009; 41(1):1-7.

2. **Сладојевић И**, Кривокућа З, Бућма Т, Гајанин В. Стереолошка анализа нервних

ћелија екстраокуларних моторних једара. Scr Med 2010; 41 (1): 9-13

3. Бућма Т, Кривокућа З, **Сладојевић И**, Гајанин В. Морфолошка и топографска анализа крвних судова цистерналног сегмента вестибулокохлеарног нерва.

Biomedicinska istraživanja 2011;2(2):1-9.

Научни радови на скупу националног значаја, штампани у цјелини

1. Бућма Т, **Сладојевић И**, Налесник М, Грубиша-Вујасиновић С, Поповић Д. Оптимално вријеме за почетак рехабилитације након хируршког лијечења херније диска лумбосакралног сегмента кичменог стуба. Други конгрес доктора медицине Републике Српске 26-29. мај 2011, Бања Врућица, Теслић. Зборник радова: 25-29.

2. Гајанин В, Кривокућа З, Зрнић Б, Гајанин Р, **Сладојевић И**. Локализација и хистолошки тип меланоцитних промјена коже. Други конгрес доктора медицине Републике Српске 26-29. мај 2011, Бања Врућица, Теслић. Зборник радова: 31-35.

2. ЗНАЧАЈ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

• Значај истраживања

Остеоартритис је водећи узрок болести зглобова код човјека. Његова комплексна патогенеза је слабо објашњена. Споро напредује, а специфична терапија која би могло да заустави прогресију или смањи посљедице још увијек не постоји. Са порастом очекиваних година живота, остеоартритис је постао водећи узрок неспособности међу одраслим лицима при чему је зглоб кољена један од најчешће захваћених зглобова. С обзиром на велико економско оптерећење друштва у цјелини и здравствено оптерећење пацијента који болују од ове болести, као и чињенице да је ова болест главни узрок повећања потреба за замјеном кољена ендопротезом, јавља се ургентна потреба за лијековима који модификују ову болест у смислу успоравања или заустављања њеног развоја или барем успоравања прогресије.

У току ове болести захваћене су све структуре зглоба кољена, а нарочито менискуси. Дегенеративне лезије менискуса и патолошке промјене на њима су посљедице процеса старења и убрзане су при претјераној употреби зглоба кољена. Доминантно се дешавају код лица у четвртој или петој декади живота, али се могу наћи и код младих спортиста. Преваленца оштећења менискуса расте са старашћу, досежући проценат од 65 % код

асимптоматских лица старијих од 65 година до чак 91 % код лица са болним остеоартритисом кољена. На аутопсијама, дегенеративне промјене се чешће налазе у зглобу кољена (75 % случајева) него у зглобу кука (33 %). Литературно су документоване карактеристике дегенеративно измијењеног менискуса на снимцима магнетне резонанце, артроскопијом и хистолошким сликама. Промјене на интраменискусном сигналу на НМР снимцима највјероватније настају због мукоидне дегенерације, што омогућава детекцију развоја остеоартритиса.

Однос између дегенеративних лезија менискуса и остеоартритиса у зглобу кољена је нејасан и контроверзно је питање у доступној литератури. Такође није познато у ком опсегу су оштећени менискуси у кољенима која захтијевају уградњу тоталне ендопротезе, као ни то да ли је менискус мање оштећен ако је предњи укрштени лигамент очуван. Јасно је да се остеоартритичне лезије у овом зглобу морају разликовати од оних које нису последица дегенеративних промјена. Познавање карактеристика дегенерисаног менискуса има за циљ да помогне клиничарима да на основу њих преломе адекватан третман. Са порастом броја обољелих идентификација нових терапеутских "мета" постаје приоритет. Експерименти на трансгеничним мишевима су показали да је експресија ММП-13 и агреканизин-2 круцијални фактор развоја дегенеративних промјена у кољену. Међутим, због разлике која постоји у експресији ових ензима међу различитим врстама, потребна су даља истраживања да би се потпуно дефинисала улога ових ензима у ОА код човјека. Познавање степена њихове експресије би могло да утиче на развој нових лијекова-инхибитора поменутих супстанци, који би могло да успоре ток болести. Ово би био велики искорак у досадашњем третману ове болести, која се углавном ослањала на контролу бола и уградњу тоталне ендопротезе. Додатни фактор је постојање много различитих стимулуса који могу да повећају експресију ових ензима, тако да је једноставније развијати блокаторе ензима него развијати терапију која утиче на ограничен број потенцијалних узрока повећања ензимске експресије.

- **Преглед истраживања**

Остеоартритис (ОА) представља хроничну дегенеративну болест зглобова од које болују милиони људи широм свијета [1]. Дегенеративне промјене у зглобу кољена се налазе у 75

% аутопсијских случајева, док се нпр. у зглобу кука налазе у свега 33 % [2]. Остеоартритис зглоба кољена може да настане као резултат физиолошке дегенерације менискуса и/или зглобне хрскавице, као последица поновљене микротрауме (у току рада или бављења спортом) или секундарно због повреде као што је руптура предњег укрштеног лигамента [3]. Недостатак овог лигамента доводи до промјена у механици кољена, које утичу на начин преноса терета у кољенима са примарним остеоартритисом [4]. НМР студија је показала да 22,8 % пацијената са симптоматским ОА кољена имају комплетну руптуру предњег укрштеног лигамента [5].

С обзиром на то да су неки аутори остеоартритис дефинисали као групу одвојених болести различите етиологије које се међусобно преклапају и имају сличне биолошке, морфолошке и клиничке исходе [6], јасно је да ОА није само болест зглобне хрскавице већ свих зглобних структура [7], укључујући и менискусе и синовијалну мембрану.

Менискуси су фиброкартилагинозне структуре грађене из мреже колагених влакана, ћелијског дијела и екстрацелуларног матрикса у којем доминира протеогликан агрекан [8]. Колагена влакна претежно гради колаген типа I, док се у мањим количинама налазе и колагени типова II, III, V и VI [9]. Колагена влакна неизмијењеног менискуса су обично глатка, хомогеног правца пружања и организована у густо збијене снопове, док у дегенеративно измијењеном менискусу долази до формирања концентричних ламела ових снопова, губитка хомогености грађе и квалитативног смањења количине колагених влакана [10]. Менискуси са већим степеном дегенерације имају значајније структурне промјене [11]. Када се разоре колагена влакна, сматра се да је болест у ирверзибилном стадијуму [12].

Екстрацелуларни протеогликан агрекан, заједно са колагеном типа II, обезбјеђује механичко својство реверзибилне компресивности. Разлагање екстрацелуларног матрикса је главно обиљежје артритиса и агрекан је један од првих протеина који подлијежу том процесу [13]. Двије агреканазе експримиране у артритису су одговорне за разградњу хрскавице у дегенеративним обољењима: агреканаза- 1 (АДАМТС-4) и агреканаза- 2 (АДАМТС-5). Агреканаза-2 дјелује специфичније јер разлаже само протеогликане [14]. Анималне студије су доказале да генска аблација ове агреканазе штити од читавог спектра

зглобне патологије (формирање зглобних лезија, промјене на субхондралној кости, остеофитоза) [15]. Зато се у експерименталним студијама агреканаза-2 појављује као кључна мета за развој лијекова који би могло да модификују ОА [16]. Међутим, ове студије се углавном базирају на анималним моделима у којима је остеоартритис хируршки индукован пресецањем предњег укрштеног лигамента, што не договара спонтаном, идиопатском хуманом остеоартритису. С друге стране, студије су указале на разлику хуманих и анималних хондроцита, што значајно утиче на валидност анималних студија које су рађене на мишевима и компарабилност са хуманим ткивом [17].

Док се активност агреканаза сматра кључним кораком за почетак ОА, дејство матриксних металопроотеиназа (ММП) почиње како дегеративни процес у зглобу напредује и оне настављају разградњу колагена [18]. Постоје докази да је ММП-13 (колагеназа 3) доминантна колагеназа у остеоартритичној хрскавици и да има већу активност према колагену типа II од осталих колагеназа, због чега је поједини аутори сврставају у терапијску мету за потенцијалне нове лијекове против ОА [17]. Хондроцитна експресија мРНА за ММП-13 је повећана у касном стадијуму ОА код човјека и у вези је са ерозијом хрскавице, при чему није уочено повећање експресије ММП-1, -8 и -14 [19]. Повезаност структурних промјена на хрскавици и активности ММП-13 је демонстрирана и на моделу хируршки индукованог ОА код мишева [20]. Литературни подаци наглашавају да би циљана терапија према ММП-13 у ОА могло да одржи ткивну хомеостазу, спријечи нежељену васкуларизацију и можда чак и поново успостави заустављено сазријевање зглобних хондроцита [21]. Међутим, због разлике која постоји у експресији ММП и агреканаза међу различитим врстама, потребна су даља истраживања да би се потпуно дефинисала улога ових ензима у ОА код човјека.

Патолошке промјене које се виђају у ОА зглобовима подразумјевају деградацију зглобне хрскавице, задебљање субхондралне кости, формирање остеофита, варијабилан степен синовитиса, деградацију лигамената и, у зглобу кољена, менискуса и хипертрофију зглобне капсуле [12]. Хистопатолошка евалуација менискуса из артритичких зглобова кољена је показала тешке промјене у фиброкартилагинозној структури, са фибрилацијама и фузијом матрикса и меникусних ћелија у псеудоцисте [28]. Постоји сигнификантна корелација макроскопских морфолошких промјена између зглобне хрскавице и хрскавице

у менискусима у истим кољенима [12]. С обзиром на то да резултати популационе студије [29] сугеришу да најмање једна трећина средовјечних или старијих лица има оштећење менискуса намеће се потреба за разумјевањем механизма оштећења менискуса у току ОА као и карактеристичним механичким, морфолошким и метаболичким промјенама које том приликом настају.

Уређење колагених влакана у менискусу је од нарочитог интереса јер се претпоставља да је директно повезана са функцијом менискуса у преносу терета [30]. Мрежа колагених влакана у менискусу се разликује у садржају и структури од региона до региона [31], а у ОА колагена влакна окружују псеудоцисте [28]. Разлагање интерстицијалних колагена типа I, II и III обавља ММП-13, која разлаже колаген типа II пет пута брже него колаген типа I и шест пута брже него колаген типа III [32].

Док колагена влакна обезбјеђују отпорност на растезање да би одржали интегритет ткива, агрекан, уткан у екстрацелуларном матриксу између тих влакана, доприноси компресивној крутости. Агрекан је 210-250 kDa базични протеин који има три глобуларна домена: Г1, Г2 и Г3. Прва два Н терминална домена (Г1 и Г2) су повезана полипептидом означеним као агрекански интерглобуларни домен (ИГД), док су други и трећи домен одвојени сулфованим гликозаминогликанским ланцима који формирају ГАГ регион. Ови гликозаминогликански ланци су постали нова терапеутска "мета" у смислу заштите хрскавице и успоравања процеса ткивне деградације [14]. Разлагање агрекана обављају агреканазе, чланови АДАМТС породице које су одговорне за цијепање агрекана у раној фази ремоделовања хрскавице [18]. Многе од њих (АДАМТС-1, -8, -9, -15, -16 и -18) имају значајно нижи ниво експресије и/или слабију активност у разградњи агрекана *in vivo* те се не сматрају функционалним агреканазама [33]. Остале двије агреканазе експримиране у артритису су значајне у метаболизму хрскавице: агреканаза 1 или АДАМТС-4 и агреканаза-2 или АДАМТС-5. Прва разлаже и хрскавични олигомерни матриксни протеин, фибромодулин и декорин, што указује да њен протеолитички спектар није ограничен само на протеогликане, за разлику од АДАМТС-5 која је специфичнија јер разлаже само протеогликане [14].

Експресија агреканаза 1 и 2 (АДАМТС-4 и -5) и ММП-3 и специфична мјеста цијепања

агрекана постоје у фиброхондрцитима. Популација ових ћелија расте са дегенерацијом менискуса, што сугерише да ови ензими имају значајну улогу у цијепању агрекана током прогресије дегенерације менискуса, слично као и код дегенерације хрскавице [11]. Истраживања су показала да нема сигнификантног пораста експресије агреканаза са стадијумом дегенерације, али је сугерисано да је агреканаза 1 конститутивно присутна у меникусима, док је експресија агреканазе 2 индукована у току прогресије дегенерације матрикса. АДАМТС-5 је конститутивно експримирана у хуманој хрскавици и синовији, док експресију АДАМТС-4 индукују проинфламаторни цитокини [34].

Осим у менискусу, и у предњем укрштеном лигаменту се уочавају дегенеративне промјене. Истраживање урађено код лица којима је урађена тотална арторопластика зглоба кољена указују да су најизраженије дегенеративне промјене у постеролатералном снопу овог лигамента, који је захваћен дегенеративним промјенама у 78 % случајева [35]. У ткиву лигамента долази до разарања колагених влакана, као и цистичних промјена и мукоидне дегенерације [36.]. Патолошке промјене на овом лигаменту корелирају са степеном ОА на радиолошким снимцима у касном стадијуму болести [37].

Синовијална инфламација се идентификује код многих ОА пацијената, али је нижег степена у поређењу са промјенама код реуматоидног артритиса [38]. Артроскопске студије сугеришу да се локализоване пролиферативне и инфламаторне промјене синовије дешавају код приближно 50 % пацијената, а тако активирана синовија продукује протеазе и цитокине који убрзавају прогресију болести [39]. С друге стране, распадни продукти хрскавице стимулишу ослобађање колагеназа и осталих хидролитичких ензима из синовијалних ћелија и макрофага, који доводе до инфилтрације моноклеарима и васкуларне хиперплазије у синовији. Повећање инфилтрације макрофагима и повећање експресије медијатора упале се уочава само у раној фази ОА [23].

ОА је праћен одређеним степеном синовитиса, који се уочава већ на почетку болести [22]. Због тога се претпоставља да су симптоми ОА, укључујући бол, едем зглоба и укоченост, повезани са синовитисом [23] који се данас сматра потенцијалним предиктивним фактором за структурну и симптоматску прогресију ОА [24]. Присуство синовитиса и ефузије, чак и код неверификованих ОА кољена, представља фактор ризика за деструкцију

хрскивице [25], а преваленца синовитиса расте са повећањем стадијума болести [26]. Постоји неколико хистолошких образаца који је виђају у дегенеративно измијењеној синовији, у којима се уочавају дифузни или периваскуларни инфилтрати макрофага и лимфоцита [27], синовијална хипертрофија и хиперплазија, фиброза и повећање броја синовијалних ћелија [23].

- **Радна хипотеза са циљем истраживања**

Након детаљног прегледа публикација, дефинисања проблема и праваца истраживања, кандидат је јасно поставио хипотезу истраживања. На основу литературних података и прелиминарних истраживања може се претпоставити да:

- Постоји разлика у квантитативним карактеристикама влакана колагена типа I, агреканазе-2 и матриксне металопроотеиназе 13 између остеоартритичног и непромијењеног менискуса

- Менискус на страни ангулације кољеног зглоба је више измијењен код пацијената који преоперативно немају сачуван предњи укрштени лигамент.

- Степен инфламаторних промјена у синовијалној мембрани је виши код пацијената са присутним дегенеративним оштећењима менискуса и са високим вриједностима седиментације.

Ради доказивања радне хипотезе, кандидат је јасно поставио сљедеће циљеве истраживања:

- Утврдити степен експресије колагена типа I у неизмјењеном и дегенеративно промијењеном менискусу зглоба кољена човјека;

- Утврдити степен експресије агреканазе-2 и матриксне металопроотеиназе 13 у дегенеративно измијењеном менискусу;

- Утврдити степен инфламаторних промјена у синовијалној мембрани;

- Утврдити постојање разлике у експресији колагена типа I, агреканазе-2 и матриксне металопроотеиназе 13 код пацијената који су преоперативно имали сачуван предњи укрштени лигамент са онима који нису имали;

- Утврдити постојање разлике између степена инфламаторних промјена у

синовијалној мембрани и степена експресије колагена типа I, агрекназе-2, матриксне металопротеиназе 13 и вриједности седиментације крви.

- **Материјал и метод рада**

Дизајн истраживања и методологија рада јасно су описани и одабрани. Истраживање ће бити обављено уз дозволу Етичког комитета Завода за физикалну медицину и рехабилитацију "Др Мирослав Зотовић" у Бањалуци. Информисани пристанак ће у писаној форми бити добијен од сваког пацијента или члана породице донора прије скупљања материјала. Сваки учесник у истраживању ће такође добити писану информацију са свим детаљима који су у вези са истраживањем.

Узорци за истраживање ће бити узимани у Одјелу за ортопедију Завода за физикалну медицину и рехабилитацију "Др Мирослав Зотовић" у Бањалуци од 35 пацијената којима је због узнапредовалог остеоартритиса имплантирана тотална ендопротеза кољена. Укупно ће бити анализирано 10 макроскопски неизмјењених менискуса (1500 видних поља) и 35 дегенеративно измјењених менискуса (5250 видних поља) из истог кољена наведених пацијената. Код свих пацијената ће преоперативно бити урађена тромбоемболијска профилакса ревиварин натријумом у дози од 0,6 ml као и системска антибиотска профилакса цефазолином по шеми: 1 грам преоперативно и 2 грама постоперативно подијељено у двије дозе (8 и 16 часова након операције). Из историје болести ће бити евидентирани сљедећи подаци:

1. Индекс тјелесне масе (BMI),
2. Постојање контрактуре,
3. Претходне операције кољена,
4. Преоперативна дијагноза,
5. Оперативни приступни пут,
6. Стање предње и задње укрштене везе пре- и постоперативно,
7. Преоперативна осовина кољена,
8. Лабораторијске претраге (седиментација крви), и
9. Лијекови које пацијент користи.

Сви узети узорци менискуса и синовијалне мембране ће бити смјештени у пуферовани раствор 10 % формалдехида одмах након узимања.

Кандидат је јасно дефинисао критеријуме за искључење из истраживања. У истраживању неће бити анализирана ткива пацијената који:

- имају неку од сљедећих дијагноза: *arthritis rheumatoides*, *spondylitis ankylopoietica*, *arthritis psoriatica*, *arthropatiae reactivae*;
- користе хондропротективне лијекове: кортикостероиди, хемијски модификовани тетрациклини, диацетилреин, гликозамин [40];
- имају анамнестички податак о трауми кољена у које се уграђује ендопротеза;
- имају општу системску слабост;
- болују од заразних болести;

Сви добијени узорци дегенеративно измијењених менискуса ће бити макроскопски анализирани према скали Sun-а и сарадника [41]:

0= нормалан изглед површине

1= минимална фибрилација и дегенерација

2= умјерена фибрилација и дегенерација

3= тешка фибрилација и дегенерација, без расцјеп

4= тешка фибрилација и дегенерација, вишеструки некомплетни расцјепи или комплетни расцјепи

Потом ће менискуси бити резани стратифицираним узорчењем у фронталној равни у 3 нивоа (предњи рог, тијело и задњи рог) чиме ће бити добијена 3 стратума по менискусу, сваки дебљине 5 mm. Сваки добијени стратум ће затим бити обрађен у парафину и резан на пет резова (5,10,15,20 и 25 рез) дебљине 4 до 5 μ m који ће бити постављени на супер-фрост плус РТУ стакла. На сваком добијеном резу анализа ће бити обављена на 10 видних поља, тако да је укупна величина узорка ткива менискуса:

- у контролној групи 1500 видних поља
- у експерименталној групи 5250 видних поља.

Дакле, квантитативна анализа ће обухватити 2 групе испитаника, контролна група 1500 узорака (видних поља), а експериментална 5250 узорака (видних поља).

Стаклени слајдови са ткивним исјечцима ће бити остављени у току ноћи у термостату на температури од 60° С. Потом ће бити урађена депарафинизација ткива у ксилолу (2 x 10 минута), рехидратација (у 96% етанолу 2 x 10 минута, потом у 70% етанолу 5 минута, па у дестилату 5 минута) и блокирање ендogene пероксидазе 3 % хидрогеном у трајању од 5 минута. Опоравак антигена ће бити урађен кухањем у цитратном пуферу на температури 98°С у трајању од 20 минута, хлађењем на собној температури до 60 минута, те испирањем дестилатом и испирањем у радном пуферу-тбс (по 5 минута).

Процедура имунохистохемијског бојења менискуса ће се састојати из:

1. Апликације примарног антибијела у трајању од 30 минута, и то:

а) мишијег моноклоналног антибијела ММП-13 (Колагеназа 3) Ab 1 (*Lab Vision, Fremont, USA*)

б) анти-колаген I антибијела (COL-1) ab90395 (*Abcam Inc, Cambridge, USA*)

ц) зечијег поликлоналног АДАМТС5 антибијела (ab41037) (*Abcam Inc, Cambridge, USA*)

2. Испирања у радном пуферу-тбс (5 минута)

3. Апликације секундарног антибијела- UltraVision LP Large Volume Detection System HRP Polymer TL-125-HL (*Lab Vision, Fremont, USA*) у трајању од 15 минута

4. Испирања у радном пуферу-тбс (5 минута)

5. Апликације ензимом означеног стрептавидина (15 минута)

6. Испирања у радном пуферу-тбс (5 минута)

7. Додавања даб-хромогена (5 минута)

8. Испирања текућом водом (5 минута)

Потом ће бити обављено контрастно бојење хематоксилином (30 секунди) и амонијачном водом (30 секунди). Услиједиће фаза дехидратације са 96% етанолом (2 x 10 минута), карбол-ксилолом (5 минута) и ксилолом (2 x 5 минута) након чега ће пресејци бити монтирани. Покровно стакалце ће бити фиксирано канада балзамом.

Када је ријеч о припреми узорака синовијалне мембране, материјал добијен биопсијом ће бити фиксиран 24 часа у пуферованом 10% формалину, а након рутинске обраде, биће прављени парафински блокови ткива, резани на микротому у серијским резovima дебљине 5 µm и бојени рутинском хематоксилин-еозин (HE) методом.

Добијени хистолошки препарати испитиваних ткива ће бити сликани помоћу микроскопа LEICA DM1000 под увећањем 400 x и микроскопске камере LEICA EC3, чији c-mount има увећање 0,7 x. Биће анализирана и квантификована експресија колагена типа 1, агреканазе-2 и MMP-13. Наведена квантификација биће обављена помоћу софтвера. Паралелно с овим биће хистолошки семиквантификован степен инфламације у синовији.

- **Научни допринос истраживања**

Главна баријера у развоју медицинских интервенција код пацијената са остеоартритисом је било ослањање искључиво на РТГ снимке код пацијената у касном стадијуму болести. Овакав начин детекције болести није сигуран јер је потребно неколико година да се радиолошки знаци развију. Уколико би се потврдила експресија агресивних протеаза у хуманом материјалу то би могло да омогући циљану антипротеиназну терапију што би дало значајну предност у истраживању ефикасног третмана најчешћег поремећаја зглобова код човјека. Оваква и слична истраживања би могло да постигну тај циљ, као што су истраживања лијекова за реуматоидни артритис (против TNF α и анти-Б ћелијске супстанце) допринијела откривању ефикасног третмана ове болести.

Цитирана литература у поглављу преглед истраживања

1. Wieland HA, Michaelis M, Kirschbaum BJ, Rudolphi KA. Osteoarthritis - an untreatable disease? Nat Rev Drug Discov. 2005 Apr;4(4):331-44.
2. Käfer W, Fraitzl CR, Kinkel S, Clessienne CB, Puhl W, Kessler S. Outcome assessment in total knee arthroplasty: is the clinical measurement of range of motion a reliable measurable outcome variable?. Z Orthop Ihre Grenzgeb. 2005 Jan-Feb;143(1):25-9.
3. Noel E, Nissen MJ. The medical treatment of gonarthrosis. U: Bonnin M, Chambat P. Osteoarthritis of the knee. Springer- Verlag, Paris, France, 2008: 59.
4. Mullaji AB, Marawar SV, Luthra M. Tibial articular cartilage wear in varus osteoarthritic knees: correlation with anterior cruciate ligament integrity and severity of deformity. J Arthroplasty. 2008 Jan;23(1):128-35.

5. Englund M, Guermazi A, Roemer FW, Aliabadi P, Yang M, Lewis CE et al. Meniscal tear in knees without surgery and the development of radiographic osteoarthritis among middle-aged and elderly persons: The Multicenter Osteo-arthritis Study. *Arthritis Rheum.* 2009;60: 831-9.
6. Brandt KD, Dieppe P, Radin E. Etiopathogenesis of osteoarthritis. *Med Clin N Am.* 2009;93:1-24.
7. Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 2007, 213:626-34.
8. Hellio Le Graverand MP, Sciore P, Eggerer J, Rattner JP, Vignon E, Barclay L, Hart DA, Rattner JB. Formation and phenotype of cell clusters in osteoarthritic meniscus. *Arthritis Rheum.* 2001 Aug;44(8):1808-18.
9. Rattner JB, Matyas JR, Barclay L, Holowaychuk S, Sciore P, Lo IK et al. New understanding of the complex structure of knee menisci: implications for injury risk and repair potential for athletes. *Scand J Med Sci Sports*, 2011 Aug;21(4):543-53.
10. Kaya A, Kılıçoğlu AA, Güçlü B, Erdemli E, Benli IT. The Ultrastructural Analyses of Meniscus Histology in Osteoarthritic Knees. *Turk J Rheumatol* 2009; 24: 118-22.
11. Ishiara G, Kojima T, Saito Y, Ishiguro N. Roles of metalloproteinase-3 and aggrecanase 1 and 2 in aggrecan cleavage during human meniscus degeneration. *Orthop Rev (Pavia)*. 2009 Oct 10;1(2):e14.
12. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* 2012 Jun;64(6):1697-707.
13. Struglics A, Hansson M. Calpain is involved in C-terminal truncation of human aggrecan. *Biochem J.* 2010;430:531–8.
14. Apte SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: Functions and mechanisms. *J Biol Chem.* 2009; 284:31493–7.
15. Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, Little CB, Last K, Farmer PJ, Campbell IK, Fourie AM, Fosang AJ. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse

cartilage in vivo and in vitro. *Nature*. 2005 Mar 31;434(7033):648-52.

16. Malfait AM, Ritchie J, Gil AS, Austin JS, Hartke J, Qin W, et al. ADAMTS-5 deficient mice do not develop mechanical allodynia associated with osteoarthritis following medial meniscal destabilization. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Apr;18(4):572-80.

17. Bondeson J. Are we moving in the right direction with osteoarthritis drug discovery? *Expert Opin Ther Targets*. 2011 Dec;15(12):1355-68.

18. Verma P, Dalal K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: key enzymes in osteoarthritis. *J Cell Biochem*. 2011 Dec;112(12):3507-14.

19. Davidson RK, Waters JG, Kevorkian L, Darrah C, Cooper A, Donell ST, et al. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage. *Arthritis Res Ther*. 2006;8:R124.

20. Little CB, Barai A, Burkhardt D, Smith SM, Fosang AJ, Werb Z, et al. Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis Rheum*. 2009 Dec;60(12):3723-33.

21. Borzì RM, Olivetto E, Pagani S, Vitellozzi R, Neri S, Battistelli M et al. Matrix metalloproteinase 13 loss associated with impaired extracellular matrix remodeling disrupts chondrocyte differentiation by concerted effects on multiple regulatory factors. *Arthritis Rheum*. 2010 Aug;62(8):2370-81.

22. Roemer FW, Kassim Javaid M, Guermazi A, Thomas M, Kiran A, Keen R et al. Anatomical distribution of synovitis in knee osteoarthritis and its association with joint effusion assessed on non-enhanced and contrast-enhanced MRI. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Oct;18(10):1269-74.

23. Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:1263-7.

24. Liu L, Ishijima M, Futami I, Kaneko H, Kubota M, Kawasaki T et al. Correlation between synovitis detected on enhanced-magnetic resonance imaging and a histological analysis with a

patient-oriented outcome measure for Japanese patients with end-stage knee osteoarthritis receiving joint replacement surgery. *Clin Rheumatol*. 2010 Oct;29(10):1185-90.

25. Roemer FW, Guermazi A, Felson DT, Niu J, Nevitt MC, Crema MD, et al. Presence of MRI-detected joint effusion and synovitis increases the risk of cartilage loss in knees without osteoarthritis at 30-month follow-up: the MOST study. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1804–9.

26. Scanzello CR, McKeon B, Swaim BH, DiCarlo E, Asomugha EU, Kanda V, et al. Synovial inflammation in patients undergoing arthroscopic meniscectomy: molecular characterization and relationship to symptoms. *Arthritis Rheum* 2011;63:391–400.

27. Pearle AD, Scanzello CR, George S, Mandl LA, DiCarlo EF, Peterson M, et al. Elevated high-sensitivity C-reactive protein levels are associated with local inflammatory findings in patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:516–23.

28. Pauli C, Grogan SP, Patil S, Otsuki S, Hasegawa A, Koziol J, et al. Macroscopic and histopathologic analysis of human knee menisci in aging and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011 Sep;19(9):1132-41.

29. Englund M, Guermazi A, Gale D, Hunter DJ, Aliabadi P, Clancy M, et al. Incidental meniscal findings on knee MRI in middle-aged and elderly persons. *N Engl J Med*. 2008;359:1108-15.

30. Chevrier A, Nelea M, Hurtig MB, Hoemann CD, Buschmann MD. Meniscus structure in human, sheep and rabbit for animals models of meniscus repair. *J Ortho Res* 2009; 27:1197–1203.

31. Shirazi R, Shirazi-Adl A, Hurtig M. Role of cartilage collagen fibrils networks in knee joint biomechanics under compression. *J Biomech* 2008; 41(16):3340–8.

32. Leeman MF, Curran S, Murray GI. The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2002;37(3):149-66.

33. Fosang AJ, Little CB. Drug insight: aggrecanases as therapeutic targets for osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008 Aug;4(8):420-7.

34. Naito S, Shiomi T, Okada A, Kimura T, Chijiwa M, Fujita Y et al. Expression of

ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic cartilage. *Pathol Int.* 2007 Nov;57(11):703-11.

35. Watanabe A, Kanamori A, Ikeda K, Ochiai N. Histological evaluation and comparison of the anteromedial and posterolateral bundle of the human anterior cruciate ligament of the osteoarthritic knee joint. *Knee.* 2011 Jan;18(1):47-50.

36. Cushner FD, La Rosa DF, Vigorita VJ, Scuderi GR, Scott WN, Insall JN. A quantitative histologic comparison: ACL degeneration in the osteoarthritic knee. *J Arthroplasty* 2003;18:687–92

37. Mullaji AB, Marawar SV, Simha M, Jindal G. Cruciate ligaments in arthritic knees: a histologic study with radiologic correlation. *J Arthroplasty* 2008;23:567–72.

38. Pessler F, Dai L, Diaz-Torne C, Gomez-Vaquero C, Paessler ME, Zheng DH, et al. The synovitis of “non-inflammatory” orthopaedic arthropathies: a quantitative histological and immunohistochemical analysis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1184–7.

39. Rollin R, Marco F, Jover JA, et al. Early lymphocyte activation in the synovial microenvironment in patients with osteoarthritis: comparison with rheumatoid arthritis patients and healthy controls. *Rheumatol Int.* 2008;28:757–64.

40. Verbruggen G. Chondroprotective drugs in degenerative joint diseases. *Rheumatology (Oxford).* 2006 Feb;45(2):129-38.

41. Sun Y, Mauerhan DR, Honeycutt PR, Kneisl JS, Norton JH, Hanley EN Jr et al. Analysis of meniscal degeneration and meniscal gene expression. *BMC Musculoskelet Disord.* 2010 Jan 28;11:19.

3. ОЦЈЕНА И ПРИЈЕДЛОГ

- **Кратка оцјена о научном и стручним квалификацијама кандидата**

На основу увида у рад кандидата, приложеној документацију, биографију и библиографију, закључује се да кандидат мр сц.мед. Игор Сладојевић испуњава све услове за одобрење теме за израду докторске дисертације у складу са важећим прописима Закона о

Универзитету и Статута Универзитета у Бањалуци. У свом досадашњем раду кандидат је показао инвентивност, мотивацију и успјех у истраживањима из области анатомије. То потврђују и публиковани радови проистекли из властитих истраживања.

Кандидат је такође показао знање и способност у истраживању које покрива области морфолошких наука, чиме је стекао властито искуство које преноси у раду са колегама и студентима.

Осим евидентне научне компетентности, кандидат учествује у раду међународних пројеката који се баве медицинским имиџингом чиме се континуирано додатно усавршава.

Кандидат Мр сц.мед. Игор Сладојевић је вриједан и цијењен члан тима, који је временом доказао да може самостално учествовати у планирању научних пројеката, због чега га Комисија сматра квалификованим за научни и стручни рад.

- **Научна или практична оправданост предложених истраживања и резултати који се могу очекивати**

Предложена тема докторске дисертације је стручно актуелна и представља недовољно истражен проблем у медицини. Томе говоре у прилог и подаци да се у свијету врше бројна истраживања о потенцијалним лијековима који би могло да одгоде и успоре ток дегенеративних болести. Резултати овог истраживања ће томе у многоме допринијети.

- **Мишљење о предложеној методи истраживања**

Истраживање задовољава критеријуме добро дизајнираног истраживања. Материјал који ће бити обрађен даје нови допринос медицини у цјелини јер се ријетко налазе истраживања урађена на људима. Кандидат је и навео да су због разлике која постоји између анималних и хуманих ткива оваква истраживања неопходна. У анализи ткива зглоба кољена биће коришћена савремена методологија која се користи у савременој медицинској литератури.

- **Приједлог са образложеном оцјеном о подобности теме и кандидата**

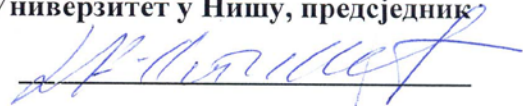
Приједлог теме докторске дисертације кандидата Игора Сладојевића, доктора медицине и магистра медицинских наука, под називом „Квантитативна анализа менискуса и синовијалне мембране зглоба кољена човјека“ задовољава све критеријуме за Пријаву теме докторске дисертације.

Кандидат је показао способност да јасно дефинише научни проблем и циљеве истраживања након опсежног и детаљног прегледа научне литературе, да влада дизајном истраживања и избором методологије научно-истраживачког рада.

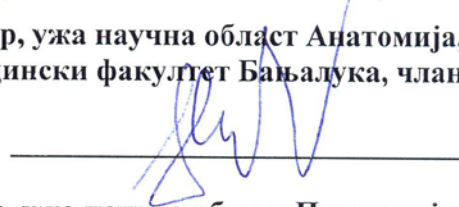
На основу детаљне анализе Пријаве докторске дисертације Комисија упућује позитивну оцјену Наставно-научном вијећу Медицинског факултета Универзитета у Бањалуци и Сенату Универзитета у Бањалуци и предлаже да се позитивна оцјена прихвати и одобри, те покрене даљи поступак израде докторске дисертације мр сц.мед. Игора Сладојевића.

ПОТПИС ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Др Наталија Стефановић, редовни професор, ужа научна област Анатомија,
Факултет спорта и физичког васпитања, Универзитет у Нишу, предсједник



Др Зденка Кривокућа, редовни професор, ужа научна област Анатомија,
Медицински факултет Бањалука, члан



Др Радослав Гајанин, ванредни професор, ужа научна област Патологија,
Медицински факултет Бањалука, члан

