

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ПРИМЉЕНО			26.10.17
Оргјед	Број	Планог. Евиденост	
05	12585/3-3		

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-829/59, од 08.09.2017. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др **Владимира Стефановића**, под називом:

„Утицај апроксималних денталних испуна на локалну продукцију цитокина у узорцима гингивалне течности“.

Чланови комисије су:

1. Доц. др Драган Газивода, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Орална хирургија, председник
2. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета Одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан
3. Доц. др Јелена Пантић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија члан

На основу увида у приложену документацију, именована Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи извештај:

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Др Владимир Стефановић је рођен 01.08.1974. године у Прокупљу, где је завршио основну и Средњу медицинску школу. На стоматолошком одсеку Медицинског факултета у Нишу, дипломирао је 27.09.2000. године с просечном оценом 8,81 (осам, осамдесет један). Након две године рада у Војно-медицинском центру у Нишу, упућен је специјализацију из области Болести зуба и ендодонције на Војномедицинску академију, а коју је завршио 04.10.2007. године с одличном оценом. По положеном специјалистичком испиту, добио је постављење на одсеку за Болести зуба и ендодонцију, Клинике за стоматологију ВМА, где и данас ради. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу из области Превентивна медицина уписао је школске 2011/2012. Након одслушане наставе, положио је све планом и програмом предвиђене испите, укључујући и усмени докторски испит, 25.07.2012. године с оценом 10 (десет). Члан је Ендодонтске секције Србије. Аутор је и коаутор радова из области Болести зуба и ендодонције.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Утицај апроксималних денталних испуна на локалну продукцију цитокина у узорцима гингивалне течности”

Предмет: У студији ће бити испитивани параметри локалног имунског одговора, вредности цитокина у ГКТ. Вредности ових параметара пре почетка стоматолошке терапије, требало би да покажу какав је утицај лезија каријеса на локални имунски одговор. Вредности параметара узетих по учињеном лечењу разлитим врстама материјала денталних испуна, требало би да покажу како се мењају својства локалног имунског одговора на успешност терапије, као и на посебности одговора у односу на врсту примењеног материјала.

Хипотеза: Хипотеза студије су је степен захваћености ткива каријесом значајно утиче на вредности цитокина у гингивалној течности. У узорцима гингивалне течности испитаника са пулпитисом (К3) значајно су повећане вредности проинфламаторних и Th1 цитокина, у односу на узорке лечених зуба (К5) у којима постоји значајно повећање IL-10 и Th2 групе цитокина. Дентални материјали за привремену рестаурацију индукују повећање цитокина у односу на материјале за трајне испуне.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавио један рад у целини за штампу у рецензираном часопису категорије М23, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Stefanović V, Taso E, Petković-Ćurčin A, Đukić M, Gardašević M, Rakić M, Xavier S, Jović M, Miller K, Stanojević I, Vojvodić D. Influence of dental filling material type on the concentration of interleukin 9 in the samples of gingival crevicular fluid. *Vojnosanit pregl* 2016; 73(8): 728-734

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Каријес је обољење тврдих зубних ткива, праћено размекшавањем и пропадањем зубне супстанце, које и даље представља једно од најчешћих обољења у свету. Несанирани каријес који се развија на апроксималним површинама зуба често напредује према гингиви и долази у контакт са гингивалним сулкусом. Гингивални сулкус представља циркуларни жлеб између унутрашње површине слободне гингиве и вратног дела зуба, чији садржај чини гингивална течност. Каријесна лезија, без обзира на локализацију, доприноси акумулацији денталног плака и самим тим погодује микроорганизмима да образују своје колоније.

Дуготрајни локални запаљенски процеси делују на сва зубна ткива и периодонцијум утичући на повећање протока гингивалне течности GCT (*gingival crevicular fluid*), као и на измену њеног садржаја. Резултати бројних студија показали су да концентрација појединих цитокина и/или азотног оксида (*NO*) у гингивалној течности прецизно одражавају интензитет локалне инфламације. *In vitro* истраживања су показала да материјали који се користе за денталне испуне покрећу имунски одговор који зависи од врсте примењеног материјала за денталне испуне. Локална продукција цитокина у гингивалној течности која одсликава профил локалног имунског одговора, могла би да укаже на повољан или неповољан утицај материјала, његове количине и начина финалне обраде.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Значај студије би се огледао у бољем разумевању локалног имунског одговора у ткиву око лезија каријеса, одосно, промени параметара локалног имунског одговора које корелирају са терцаијским успехом или неуспехом након лечења зуба денталним испунама. Такође, студија би показала различитост параметара локалног имунског одговора у односу на врсту примењеног материјала, чиме би се омогућило дефинисање биолошки најподеснијег материјала испуне.

Циљ и хипотезе студије

Свим испитиваним пацијентима одредити степен захваћености ткива каријесом заједно са вредностима индекса крварења (ИК), плак индекса (ПИ према *Silness-Lou*), гингивалног индекса (ГИ) и дубине гингивалног цела (ДГЦ). Упоредити вредности добијених цитокина према степену захваћености ткива каријесом, упоредити вредности добијених цитокина према врсти примењеног денталног материјала за привремену или трајну рестаурацију и коначно упоредити вредности добијених цитокина са скором клиничких параметара (ИК, ПИ, ГИ, ДГЦ).

Хипотеза студије су је степен захваћености ткива каријесом значајно утиче на вредности цитокина у гингивалној течности. У узорцима гингивалне течности испитаника са пулпитисом (К3) значајно су повећане вредности проинфламаторних и Th1 цитокина, у односу на узорке лечених зуба (К5) у којима постоји значајно повећање IL-10 и Th2 групе цитокина. Дентални материјали за привремену рестаурацију индукују повећање цитокина у односу на материјале за трајне испуне.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Каријес зуба је мултифакторијално обољење узроковано комплексном интеракцијом кариогене оралне флоре (биофилма) и ферментабилних угљених хидрата на површини зуба у функцији времена. То је обољење тврдих зубних ткива, праћено размекшавањем и пропадањем зубне супстанце са консекутивним променама на зубној пулпи који и даље представља једно од најчешћих обољења у свету. Каријес узрокују оралне бактерије својим ензимима и продирући дубље, дентинским каналићима, доспевају до зубне пулпе где узрокују инфламацију. Узнапредовали каријес може довести до настанка пулпитиса. Инфламација која настаје у присуству каријеса, јавља се као резултат дејства имунолошких медијатора продукованих и ослобођених од стране имунских и неимунских ћелија присутних у зубној пулпи. Терапија каријеса подразумева уклањање каријесне лезије, заштиту пулпо-дентинског комплекса одоварајућим материјалима лаковима, дентинским надокнадама на бази калцијум – хидроксида, глас јономерима и адхезивним системима (3). Затим следи дефинитивна рестаурација кавитета, материјалима за трајне испуне композитима, амалгамом или глас-јономерима. По завршеној рестауративној процедури, процес инфламације се смањује и долази до репарације и регенерације околног ткива (4). У случају дуготрајног и великог оштећења дентина, процес инфламације поприма хроничан ток уз присуство инфламаторног инфилтрата, колагене фиброзе, смањене репаративне способности што може изазвати некрозу пулпе и формирање денталног абсцеса.

Инфламаторни процеси у каријесној лезији карактеришу се повећањем продукције бројних цитокина, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-22, IFN- γ и TNF- α . (5-12). По најновијим схватањима патогенезе каријеса, главни покретачи продукције ових медијатора су одонтобласти (13,14). Основна улога одонтобласта у одсуству оштећења структура зуба је продукција секундарног и терцијарног дентина. Међутим, приликом оштећења зуба и колонизације бактерија, одонтобласти покрећу и посредују у инфламаторном одговору домаћина уз помоћ бројних рецептора којима детектују присуство патогена – рецепторима за препознавање образаца (PRRs). То чине директно, продукцијом антимикуробних пептида и цитокина и индиректно, регулишући миграцију и локалну активност антиген презентујућих ћелија, полиморфонуклеара, Т и Б лимфоцита.

Гингивална течност (*gingival crevicular fluid*) представља течни садржај гингивалног сулкуса (15). У физиолошким условима гингивална течност представља трансудат крвних судова. Међутим у патолошким условима, поготово инфламаторних процеса периодонцијума или структура зуба, проток гингивалне течности расте до тридесет пута и представља инфламаторни ексудат богатог садржаја различитих медијатора, ензима, неурохормона, продуката кисеоничног метаболизма и цитокина. Истраживања показују да концентрација појединих цитокина и/или азотног оксида (NO) прецизно одражава интезитет локалне инфламације (16-18).

In vitro истраживања су показала да материјали који се користе за денталне испуне покрећу имунски одговор који зависи од примењене врсте и начина финалне обраде материјала (19-22). Различити профили локалног имунског одговора, изражени кроз концентрације цитокина у гингивалној

течности, могли би да покажу повољни или неповољни утицај апроксималних денталних испуна на процесе репарације гингиве.

2.7. Методе истраживања

У питању је Проспективна клиничка опсервациона студија пресека.

У студију ће бити укључено 90 пацијената, старости 18-70 година, сврстаних у шест група према врсти апликованих денталних испуна. За рестаурацију препарисаних апроксималних кавитета користиће се шест врста материјала; три за привремену рестаурацију: Cink polikarboksilatni cement (Hoffman, Harward, USA), Cink fosfatni cement (Cegal NV, Galenika, Srbija), Glass ionomer cement (Fuji Plus, Green Circle, USA) и три за дефинитивну рестаурацију: Amalgam (Etracap D caps, Galenika, Srbija), Tetric Evo Ceram (Ivoclar, Vivadent) и Beautifill (Shofu, Japan).

Студија ће испитивати концентрацију цитокина у ГКТ апроксимално локализованих каријесних лезија на фронталним и бочним зубима. Апроксимална локализација каријеса подразумева лезије лоциране испод контактних тачака зуба, која се протеже до гингиве. Апроксималне лезије које су захватиле глеђ и дентин, а које су видљиве у линији осмеха, од 13-23 у горњој вилици и 33-43 у доњој вилици биће рестауриране материјалима Tetric Evo Ceram и Beautifill. Апроксималне каријесне лезије које су се развиле изван линије осмеха, у регијама дистално од поменутих биће рестауриране амалгамом. Привремени испуни биће пласирани код зуба код којих је лечење канала коренова у току као и код зуба где је због тренутног крварења из интерденталне гингиве било немогуће пласирати дефинитивни испун. Кандидат је у пријави навео критеријуме за укључење и искључење пацијента из студије.

Тежина материјала за денталне испуне ће бити измерена непосредно пре уношења у кавитет на лабораторијској ваги SARTORIUS MECHANOTRONICS 1204MP.

Степен захваћености зубног ткива каријесом ће бити изражен клиничким описом: К2 - захваћени глеђ и дентин, К3 – пулпитис (запаљење денталне пулпе), К4 – некроза и гангрена зубне пулпе и К5 - раније излечен коренски канал. Стање потпорног апарата зуба, описали би пародонтални индекси: индекс крварења (ИК, вреднован од 0-3); плак индекс (ПИ вреднован по *Silness-Lou*, 0-3); гингивални индекс (ГИ, вреднован од 0-3); и дубина гингивалног џепа (ДГЦ, вреднован од 0-3).

Узорци ће бити узимани након клиничког прегледа коришћењем методе филтер папирним поенима. Место узимања ће бити изоловано ватерлонама и посушено ваздухом. Након пажљивог уклањања супрагингивалног слоја биофилма, биће уметнут стерилни филтер папир (Periopaper, ProFlow, Amityville, NY, USA) у периодонтални сулкус (док се не осети благи отпор), где ће остати 30 секунди. Количина абсорбоване течности на филтер папиру биће квантификована коришћењем Периотрона (Periotron 6000 device Interstate Drug Exchange, Amityville, NY, USA). Папирни филтер ће потом бити стављени у стерилне епрувете које садрже 0,5 ml стерилног PBS пуфера, те инкубирани наредних 30 минута на собној температури. Садржај из папирног филтера ће бити издвојен након центрифугирања датог узорка. Након тога

филтер папири ће бити елиминисани а узорак ће се замрзавати на -70°C до тестирања.

Узорци гингивалне течности, биће узети од сваког испитаника у три временска термина: пре рестаурације каријесне лезије (0 дана) 7. и 30. дана након завршене рестаурације.

Концентрације цитокина IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-22, IFN- γ и TNF- α биће одређиване у сваком од узорака методом проточне цитофлуориметрије, коришћењем комерцијалног *flow* цитометријског комплета (кита) (*Flow Cytomix, Bender MedSystems, USA*) на проточном цитофлуориметру (*Beckman Coulter XL-MCL, USA*), са *BMS Flow Cytomix Pro 2.2 Software*-ом. Концентрација цитокина биће изражена у pg/mL.

Снага студије и величина узорка: Уз критеријуме да је очекивана снага ефекта 0,4 (око 40% разлике између испитиваних група), да је неопходна снага студије најмање 80%, а вероватноћа грешке првог типа 0,05 ($\alpha = 0,05$), применом анализе варијансе за предвиђених 6 група је утврђено да је укупан број испитаника 90, што значи да у свакој од испитиваних 6 група треба да буде минимално по 15 пацијената.

Статистичка обрада података

Поређења међу различитим групама биће вршена применом непараметарског ANOVA (analysis of variance) теста. Разлике ће бити сматране статистички значајним уколико је $p < 0,05$. За процену статистичке повезаности међу различитим параметрима користићемо Пирсонов (*Pearson*) тест корелације. Резултати ће бити представљени као средња вредност \pm стандардна девијација. Сви статистички прорачуни биће урађени коришћењем софтвера Graph Pad Prism

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Пре почетка терапије наведеним материјалима очекује се да су вредности цитокина у гингивалној течности значајно повезане са степеном захваћености ткива каријесом. Цитокини су протеини мале молекулске масе, који посредују у имунском одговору. Цитокине продукују различите ћелије: моноцити, макрофаги, лимфоцити, фибробласти. Th1 цитокини (IL-2, IFN- γ), са фагоцитима помажу деструкцију интраћелијских патогена, а Th2 цитокини (IL-2, IL-4, IL-6), делују инхибиторно на групу Th1 цитокина. Очекује се да најмањи степен захваћености ткива каријесом, где су захваћени глеђ и дентин, (K2) буде повезан са најмање израженим променама цитокина, комплетно развијен запаљенски процес у зубној пулпи, пулпитис (K3) уз присуство Th1 цитокина, некротични и гангренозни процеси зубне пулпе (K4) буду повезани са порастом инфламаторних цитокина у гингивалној течности, а да добијене вредности код раније излечених коренских канала (K5) буду повезане са највећим вредностима интерлеукина 10 (IL-10) и Th2 групе цитокина. Даље, очекује се да ће рестаурација материјалима за привремене испуне имати за резултат веће вредности цитокина у гингивалној течности у односу на рестаурацију материјалима за дефинитивне испуне, због веће ретенције за акумулацију денталног плака. То се нарочито односи на цинк поликарбосилатни и цинкфосфатни цемент. Глас јономер цемент отпушта флуориде и тиме умањује акумулацију денталног плака.

2.9. Оквирни садржај дисертације

У студију ће бити укључено 90 пацијената, старости 18-70 година, сврстаних у шест група према врсти апликованих денталних испуна. За рестаурацију препарисаних апроксималних кавитета користиће се шест врста материјала; три за привремену рестаурацију: Cink polikarboksilatni cement (Hoffman, Harvard, USA), Cink fosfatni cement (Cegal NV, Galenika, Srbija), Glass ionomer cement (Fuji Plus, Green Circle, USA) и три за дефинитивну рестаурацију: Amalgam (Etracap D caps, Galenika, Srbija), Tetric Evo Ceram (Ivoclar, Vivadent) и Beautifill (Shofu, Japan). Студија ће испитивати концентрацију цитокина у ГКТ апроксимално локализованих каријесних лезија на фронталним и бочним зубима. Добијени резултати ће послужити бољем схватању локалног имунског договора у каријесу и одговору компоненти имунског система на различите примењене денталне испуне.

3. Предлог ментора

За ментора се предлаже **проф. др Татјана Кањевац**, професор Факултета медицинских наука за ужу научну област Стоматологија. Предложени наставник испуњава услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност ментора

Радови у вези са темом докторске дисертације

1. Djordjevic G, Dagovic A, Ristic V, Kanjevac T, Brajkovic D, Popovic M. Trends and Patterns of Disparities in Oral Cavity and Pharyngeal Cancer in Serbia: Prevalence and Economic Consequences in a Transitional Country. *Front Pharmacol.* 2017 ;8:385. doi: 10.3389/fphar.2017.00385.
2. Vasovic M, Gajovic N, Brajkovic D, Jovanovic M, Zdravkovaic N, Kanjevac T. The relationship between the immune system and oral manifestations of inflammatory bowel disease: a review. *Cent Eur J Immunol.* 2016;41(3):302-310.
3. Filipovic G, Kanjevac T, Cetenovic B, Ajdukovic Z, Petrovic N. Sexual Dimorphism in the Dimensions of Teeth in Serbian Population. *Coll Antropol.* 2016;40(1):23-8.
4. Jakovljevic M, Lazarevic M, Milovanovic O, Kanjevac T. The New and Old Europe: East-West Split in Pharmaceutical Spending. *Front Pharmacol.* 2016;7:18. doi: 10.3389/fphar.2016.00018.
5. Jakovljevic M, Kanjevac TV, Lazarevic M, Vladimir RB. Long Term Dental Work Force Build-Up and DMFT-12 Improvement in the European Region. *Front Physiol.* 2016;7:48. doi: 10.3389/fphys.2016.00048.
6. Ackova DG, Kanjevac T, Rimondini L, Bosnakovski D. Perspectives in Engineered Mesenchymal Stem/Stromal Cells Based Anti- Cancer Drug Delivery Systems. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2016;11(1):98-111.

7. Kanjevac T. Dental Services Funding and Affordability in Serbia - Decade-Long Perspective. *Front Public Health*. 2015;3:145. doi: 10.3389/fpubh.2015.00145.
8. Velickovic M, Pejnovic N, Petrovic R, Mitrovic S, Jeftic I, Kanjevac T, Lukic A. Expression of interleukin-33 and its receptor ST2 in periapical granulomas and radicular cysts. *J Oral Pathol Med*. 2016;45(1):70-6. doi: 10.1111/jop.12312.
9. Velickovic M, Pejnovic N, Mitrovic S, Radosavljevic G, Jovanovic I, Kanjevac T, Jovicic N, Lukic A. ST2 deletion increases inflammatory bone destruction in experimentally induced periapical lesions in mice. *J Endod*. 2015;41(3):369-75. doi: 10.1016/j.joen.2014.11.017.
10. Vuković A, Marković D, Petrović B, Apostolović M, Golijanin R, Kanjevac T, Stojković B, Perić T, Blagojević D. Traumatic dental injuries in Serbian children--epidemiological study. *Srp Arh Celok Lek*. 2013;141(11-12):744-9.
11. Kanjevac T, Milovanovic M, Volarevic V, Lukic ML, Arsenijevic N, Markovic D, Zdravkovic N, Tesic Z, Lukic A. Cytotoxic effects of glass ionomer cements on human dental pulp stem cells correlate with fluoride release. *Med Chem*. 2012 ;8(1):40-5.

4. Научна област дисертације

Научна област: Медицина

5. Научна област чланова комисије

1. Доц. др Драган Газивода, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Орална хирургија, председник Комисије
2. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета Одбране у Београду, ужа научна област Имунологија, члан
3. Доц. др Јелена Пантић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Микробиологија и имунологија, члан

Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публикован рад др Владимира Стефановића, комисија закључује да кандидат поседује одговарајуће компетенције и да испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да испита утицај различитих врста материјала за денталну испуну на карактеристике локалног имунског одговора.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза др Владимира Стефановића бити од великог научног значаја у расветљавању механизма локалног имунског одговора у каријесу, односно реакције компоненти локалног имунског одговора на примењене терапије каријеса.
4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Владимира Стефановића под називом „*Утицај апроксималних денталних испуна на локалну продукцију цитокина у узорцима гингивалне течности*” и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

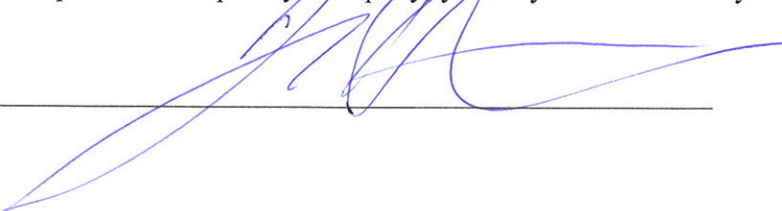
Доц. др Драган Газивода,

доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу,
ужа научна област Орална хирургија, председник



Проф. др Данило Војводић,

редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије
Универзитета Одбране у Београду, ужа научна област Имунологија, члан



Доц. др Јелена Пантић,

доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу,
ужа научна област Микробиологија и имунологија, члан



У Крагујевцу, 11.10.2017. године