

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
У КРАГУЈЕВЦУ

ПРЕКМБ/186/22		14.04.2022	
Организација	Број	Датум	Врлоност
05	4620		

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-186/27 од 16.03.2022. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Владимира Стефановића под називом:

„Модулација цитокинског профила гингивалне течности применом различитих апроксималних денталних испуна“

На основу одлуке Већа за медицинске науке, формирана је комисија у саставу:

1. **др Милица Поповић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Болести зуба са ендодонцијом, председник;
2. **др Гаврило Брајовић**, ванредни професор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија, члан;
3. **др Марко Милосављевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Стоматолошка протетика, члан;

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

2. Извештај комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат Владимир Стефановић испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Кратка биографија кандидата

Владимир Стефановић је рођен 01.08.1974. године у Прокупљу. Основну и средњу школу завршио је у истом граду. На Стоматолошком одсеку Медицинског факултета у Нишу дипломирао је 27.09.2000. године. После завршеног обавезног стажа и Школе резервних официра Војске Србије почиње да ради у Војсци Србије као потпоручник, доктор стоматологије у ВМЦ-у Ниш, 2002. године. Специјализацију из Болести зуба и ендодонције уписује 2004. на Војномедицинској академији а 2007. постаје специјалиста и почиње да ради на Одељењу за Болести зуба и оралну медицину са пародонтологијом, Клинике за стоматологију ВМА. Академске докторске студије, уписао је на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу 2011.године. Исте године прелази у Управу Клинике за стоматологију где наставља да обавља послове из домена своје специјалности.. Члан је Српског Лекарског Друштва и Ендодонтске секције Србије. Као члан тима за Континуирану едукацију Клинике за стоматологију ВМА одржао је неколико предавања специјализантима и запосленим на клиници. Аутор је и коаутор неколико публикација.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: „Модулација цитокинског профила гингивалне течности применом различитих апроксималних денталних испуна“

Предмет: Испитивање повезаности различитих врста материјала за денталне испуне и локалног инфламаторног одговора, кроз анализу концентрације цитокина у гингивалној течности.

Хипотезе:

1. Степен захваћености ткива каријесом значајно утиче на вредности цитокина у гингивалној течности;
2. У узорцима гингивалне течности испитаника са пулпитисом значајно су повећане вредности проинфламаторних и Th1 цитокина, у односу на узорке лечених зуба у којима постоји значајно повећање IL-10 и Th2 групе цитокина;
3. Дентални материјали за привремену рестаурацију индукују веће повећање садржаја цитокина у гингивалној течности у односу на материјале за трајне испуне.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, Владимир Стефановић, је објавио рад у целини у часопису категорије M23, у којем је први аутор, чиме је стекао услов за пријаву теме докторске дисертације.

Stefanović V, Taso E, Petković Ćurčin A, Gardašević M, 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):728–34.

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Каријес представља мултифакторијално обољење проузроковано 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 изазивају оралне бактерије, првенствено *Streptococcus mutans*, које ферментацијом угљених хидрата стварају киселине, којима деминерализују глеђ.

Ослобађајући ензиме и продирањем кроз дентинске каналиће, бактерије доспевају до зубне пулпе где узрокују запаљење. Нелечени каријес узрокује запаљење зубне пулпе – пулпитис. Запаљење које узрокује каријес настаје као последица деловања имунских медијатора које продукују и ослобађају имунске (и неимунске ћелије) које су присутне у зубној пулпи. Лечење каријеса обухвата уклањање каријесне лезије и заштиту пулпо-дентинског комплекса одоварајућим материјалима, а потом дефинитивна рестаурација кавитета. Након завршене рестауративне процедуре запаљенски процес се смањује и настаје репарација и регенерација околног ткива. Уколико постоји дуготрајна инфламација уз масивно оштећење дентина запаљенски процес поприма хронични ток уз развој инфламацијског инфилтрата, хиперемие, стазе и конгестије пулпне циркулације. Наведени патолошки процеси могу да изазову некрозу, гангрену пулпе уз захватање апексног парадонцијума.

Након препознавања патогена, одонтобласта, имунске ћелије и фибробласта зубне пулпе (на крају) стварају велики број сигналних молекула који регулишу имунски одговор. Одонтобласта у физиолошким условима стварају секундарни и терцијарни дентин, а у одговору на присуство патогена синтетишу хемокине (CCL2, CXCL1, CXCL2, CXCL8 и CXCL10) који привлаче дендритичке ћелије и друге имунске ћелије. Механизам препознавања патогена од стране одонтобласта укључује велики број рецептора попут PRR (енг. pattern recognition receptors) где се убрајају Toll-like рецептори (енг. Toll-like receptor - TLR) и NOD (енг. nucleotide-binding oligomerization domain). Активација одонтобласта подразумева укључивање урођеног имунског одговора, а даљом прогресијом инфламације и активацијом антиген-презентујућих ћелија накупља се све више ћелија имунског система: Т-лимфоцити, В-лимфоцити, макрофаги и неутрофили.

Развој инфламације прати повећана продукција различитих цитокина у ткивима зуба: IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и фактора туморске некрозе α (TNF- α). Сваки од наведених цитокина има значајну улогу у регулацији и усмеравању имунског одговора.

IL-6 делује проинфламаторно, поспешује диференцијацију Т лимфоцита (усмерава их ка Th17 фенотипу) и повећава пропустљивост капилара (поспешује настајање едема). Са друге стране, IL-10 делује антиинфламаторно, смањује продукцију проинфламаторних цитокина (између осталих и IL-6), смањује имунски одговор и Th1 и Th2 типа и индукује диференцијацију Т лимфоцита ка регулаторним Т ћелијама.

Гингивална течност (енг. gingival crevicular fluid) представља течни садржај гингивалног сулкуса. У физиолошким условима гингивална течност представља трансудат крвних судова. Међутим, у патолошким стањима, поготово у случају инфламаторних процеса периодонцијума или структура зуба, проток гингивалне течности се повећава и до 30 пута и по структури представља инфламаторни ексудат који садржи различите ензиме, медијаторе запаљења, цитокине и продукте метаболизма кисеоника.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије би се огледао у потенцијалном дефинисању нових биомаркера у гингивалној течности, који би осликавали степен захваћености ткива каријесом. По завршеној денталној рестаурацији, ови имунолошки профили и вредности медијатора указивали би на најоптималнији локални биолошки одговор на врсту примењеног материјала, у успешности сузбијања инфламације.

Општи циљ истраживања подразумева испитивање локалног инфламаторног одговора, кроз анализу концентрације цитокина у гингивалној течности, услед примене различитих врста материјала за денталне испуне.

На основу општег циља формулисани су специфични циљеви:

1. Одређивање степена захваћености ткива каријесом уз процену вредности индекса крварења (ИК), плак индекса (ПИ), гингивалног индекса (ГИ) и дубине гингивалног џепа (ДГЦ);
2. Мерење 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 у гингивалној течности;
3. Испитивање корелације степена захваћености ткива каријесом и осталих клиничких параметара (ИК, ПИ, ГИ, ДГЦ) и вредности мерених цитокина;
4. Анализа промена у вредностима мерених цитокина у односу на примењени дентални материјал за привремену или трајну рестаурацију.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Претходна истраживања су показала да концентрација појединих цитокина корелира са интензитетом запаљеног одговора у пулпи, као последица развоја и напредовања каријесне лезије.

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. Различити профили локалног имунског одговора, изражени кроз концентрације цитокина у гингивалној течности, могли би да укажу на повољан или неповољан утицај различитих апроксималних денталних испуна (привремених или дефинитивних) на процесе репарације гингиве.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

Опсервациона кохортна проспективна аналитичка студија.

2.7.2. Популација која се истражује

У студију ће бити укључено укупно 90 испитаника са постављеном дијагнозом апроксималног каријеса на фронталним и бочним зубима.

Додатни критеријуми за укључење у студију су: одсуство свежих постесктрационих или трауматских рана у области рестаурације и одсуство клиничких знакова инфекције у области површина за рестаурацију и мотивисаност, кооперативност и задовољавајући ниво оралне хигијена пацијента.

Критеријуми за искључење су: постојање инфекције ендодонтског или пародонталног порекла у области апроксималне или цервикалне регије зуба, постојање изражених пародонталних џепова, постојање испуна који проминирају изван кавитета, пацијенти који су на радијационој, имуносупресивној терапији са тешким хроничним болестима; пацијенти који у анамнези наводе проблеме са алкохолизмом или наркотицима, пацијенти који пуше више од 20 цигарета дневно и пацијенти са незадовољавајућом оралном хигијеном.

2.7.2. Узорковање

У студију ће бити укључено укупно 90 испитаника сврстаних у шест група према врсти испуна која је коришћена за рестаурацију. Свака група ће имати по 15 испитаника ($n=15$).

Три материјала за дефинитивн рестаурацију су: Amalgam, Tetric EvoCeram и Beautifill. Cink polikarboksilatni cement, Cink fosfatni cement и Glass ionomer cement су дентални материјали који ће бити коришћени за привремену рестаурацију каријесом оштећених зуба.

2.7.4. Варијабле

Независне варијабле:

Степен захваћености ткива каријесом и клинички параметри: индекс крварења (ИК), плак индекс (ПИ по Silness-Lou), гингивални индекс (ГИ), дубина гингивалног џепа (ДГЦ).

Зависне варијабле:

Концентрације цитокина гингивалне течности, 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 .

Праћење клиничких параметара

Степен захваћености зубног ткива каријесом биће 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, описале 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); дубина гингивалног џепа (ДГЦ, вреднован од 0-3).

Концентрације цитокина гингивалне течности

У узорцима гингивалне течности концентрације цитокина биће одређивана методом проточне цитофлуориметрије, коришћењем комерцијалног цитометријског комплета (Flow Cytomix, Bender MedSystems, USA) на проточном цитофлуориметру (Beckman Coulter XL-MCL, USA), који ће бити повезан са BMS Flow Cytomix Pro 2.2 Software-ом. Концентрација цитокина биће изражена у pg/mL. Одређиваће се вредности следећих 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 .

Узорци гингивалне течности

Узорци гингивалне течности ће бити узимани након клиничког прегледа, коришћењем методе филтер папирним поенима. Место узимања ће бити изоловано ватеролнама 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 апсорбоване течности на филтер папиру биће квантификована коришћењем Периотрона (Periotron 6000 Device Interstate Drug Exchange, Amityville, NY, USA).

Папирни филтери 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.

Динамика узимања узорка

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.

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Анализом студија сличног дизајна и 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 група треба да буде минимално по 15 пацијената.

2.7.6. 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 и 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 је степен захваћености ткива каријесом значајно повезан са вредностима цитокина у гингивалној течности. Очекује се да најмањи каријесни дефект буде повезан са најмање израженим променама у вредностима цитокина, комплетно развијен инфламаторни процес са већом концентрацијом цитокина који су карактеристични за Th1 имунски одговор, гангренозни и некротични процеси ће корелирати са порастом проинфламаторних цитокина у гингивалној течности, а раније излечених канала ће бити у позитивној корелацији са вредностима IL-10 и цитокина карактеристичних за Th2 имунски одговор. Даље, очекује се да ће материјали за привремене испуне резултирати већим вредностима цитокина у односу на испуне израђене материјалима за трајне испуне.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

У студију ће бити укључено 90 пацијената, старости 18-70 година, сврстаних у шест група према врсти денталних испуна који ће бити апликовани у апроксималне кавитете. За рестаурацију препарисаних апроксималних кавитета користиће се шест врста материјала, (за привремену рестаурацију): цинк поликарбоксилатни цемент, цинк фосфатни цемент, гласс јономер цемент, (за дефинитивну рестаурацију) Amalgam, Tetric Evo Ceram и Beautifill. Каријес на апроксималним површинама зуба често напредује према гингиви и долази у контакт са гингивалним сулкусом, чији садржај чини гингивална течност. Узорци гингивалне течности биће узорковани из гингивалног сулкуса методом филтер папирних трачица. Студија ће испитивати концентрацију цитокина у гингивалној течности апроксимално локализованих каријесних лезија, пре стоматолошке терапије и након рестаурације. Добијени резултати ће послужити бољем разумевању локалног имунског одговора код различитих степена развоја каријесних лезија. Такође ће показати какав је одговор компоненти имунског система на привремене или дефинитивне денталне материјале који ће бити постављани у апроксималне кавитете.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације предлаже се Доц. др Бојан Јовичић, доцент Медицинског факултета ВМА. Доц. др Бојан Јовичић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и испуњавају 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 Доц. др Бојана Јовичића који су у вези са темом докторске дисертације:

1. **Бојан Јовичић**, Zoran Lazić, Milica Nedić. Therapeutic efficacy of guided tissue regeneration and connective tissue autotransplants with periosteum in the management of gingival recession. *Vojnosanit Pregl* 2008; 65(10): 758–62.
2. Matijević S, **Јовичић В**, Bubalo M, Dukić S, Čutović T. Treatment of a large radicular cyst – enucleation or decompression? *Vojnosanit Pregl* 2015; 72(4): 372–4.
3. Vuković N, Marjanović M, **Јовичић В**, Aleksić E, Kalevski K, Borotić N, Pejanović Dj, Andjelković M. Alveolar bone defect regeneration after bilateral periapical cyst removal with and without use of platelet rich fibrin – A case report. *Vojnosanit Pregl* 2017; 74(10): 987–91.
4. Lalić M, Aleksić E, Milić J, Malešević A, **Јовичић В**. Reliability and validity of the Serbian version of Children's Dental Fear Questionnaire. *Vojnosanit Pregl* 2015; 72(7): 602–7.
5. Jocić M, Resan M, Vukokmanović A, **Јовичић В**, Vučetić D. Autologous blood products use in regenerative medicine – experiences from military medical academy. *Bilt Transfuziol* 2018; 63 (1–2): 78–81.
6. Tambur Z, Miljkovic-Selimovic B, Opacic D, Aleksić E, Ivancajic L, **Јовичић В**, Vukovic B. Inhibitory effects of different medicinal plants on the growth of some oral microbiome members, *Med Weter*, 2020; 76(8): 476–9.

4. Научна област дисертације

Медицина. Стоматологија.

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Милица Поповић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Болести зуба са ендодонцијом, председник;
2. **Проф. др Гаврило Брајовић**, ванредни професор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија, члан;
3. **Доц. др Марко Милосављевић**, доцент, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Стоматолошка протетика, члан;

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове, Комисија закључује да кандидат др Владимир Стефановић испуњава све услове прописане Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука да приступи изради докторске дисертације.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата Владимира Стефановића, под називом „Модулација цитокиноског профила гингивалне течности применом различитих апроксималних денталних испуна“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ



Проф. др Милица Поповић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Болести зуба са ендодонцијом, председник



Проф. др Гаврило Брајовић, ванредни професор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија, члан



Доц. др Марко Милосављевић, доцент, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Стоматолошка протетика, члан;

У Крагујевцу, __. __. 2022. године

