

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
КРАГУЈЕВАЦ**

1. Одлука Изборног већа

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-1523/7-4 од 20.2.2013. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Сандре Видојевић, под називом:

**„УТИЦАЈ ГЛАС ЈОНОМЕР ЦЕМЕНАТА БЕЗ И СА ДОДАТКОМ
АНТИБИОТИКА НА РАСТ КАРИОГЕНИХ МИКРООРГАНИЗАМА У *IN VITRO*
УСЛОВИМА ”**

Чланови комисије су:

- 1. проф. др Слободан Јанковић**, председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија са токсикологијом и Клиничка фармација
- 2. проф. др Дејан Баскић**, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија
- 3. доц. др Радан Стојановић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Клиничка фармакологија и токсикологија, члан

2.1 Кратка биографија кандидата

Др **Сандра Видојевић**, доктор стоматологије, рођена је 01.09.1980. у Крагујевцу. Дипломирала је на Стоматолошком факултету, Универзитета у Београду 24.02.2006. Стручни испит за доктора стоматологије пред испитном комисијом Министарства здравља Републике Србије положила је 27.03.2007. Студент је докторских студија на факултету медицинских наука у Крагујевцу, где је положила усмени докторски испит.

2.2 Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: „УТИЦАЈ ГЛАС ЈОНОМЕР ЦЕМЕНАТА БЕЗ И СА ДОДАТКОМ АНТИБИОТИКА НА РАСТ КАРИОГЕНИХ МИКРООРГАНИЗАМА У *IN VITRO* УСЛОВИМА”

Предмет: Испитивање дејства глас јономер цемента без и са додатком антибиотика на раст кариогених микроорганизама (*Streptococcus mutans* и *Lactobacillus acidophilus*),

као и испитивање утицаја додатих антибиотика на механичке особине глас јономер цемента.

Хипотезе:

1. Глас јономер цемента у *in vitro* условима инхибирају раст кариогених микроорганизама *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus acidophilus*
2. Амоксицилин у *in vitro* условима инхибира раст кариогених микроорганизама *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus acidophilus*
3. Цефалексин у *in vitro* условима инхибира раст кариогених микроорганизама *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus acidophilus*
4. Клиндамицин у *in vitro* условима инхибира раст кариогених микроорганизама *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus acidophilus*
5. Постоји разлика у инхибицији раста кариогених микроорганизама *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus acidophilus in vitro* између глас јономер цемената без и са додатком амоксицилина у 1, 3, 5 и 7% масеном односу
6. Постоји разлика у инхибицији раста кариогених микроорганизама *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus acidophilus in vitro* између глас јономер цемената без и са додатком цефалексина у 1, 3, 5 и 7% масеном односу
7. Постоји разлика у инхибицији раста кариогених микроорганизама *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus acidophilus in vitro* између глас јономер цемената без и са додатком клиндамицина у 1, 3, 5 и 7% масеном односу
8. Не постоји разлика у тврдоћи мереној методом по *Vickers*-у између глас јономер цемента без и са додатком сваког од антибиотика у 1, 3, 5 и 7% масеном односу

2.3 Подобност кандидата

Кандидат је објавио један рад у целини у домаћем часопису са рецензијом, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Vidojević S, Branković B, Golijanin R. Prevalence of primary dentition caries in preschool children of urban and suburban areas in Kragujevac. *Racionalna terapija*. 2012; 4(2):35-39. **M53, 1 бод.**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Како је каријес распрострањено обољење тврдых зубних ткива, за његово збрињавање и спречавање даљег напредовања препоручује се *ART (Atraumatic Restorative Treatment)*. То је минимално инвазивна техника која уклања каријесом измењено зубно ткиво ручним инструментима, без потребе за локалном анестезијом и затварање кавитета адхезивним материјалима - глас јономер цементима (*GIC*). *ART* се првенствено користи у деловима света са ограниченом доступношћу стоматолошких

услуга, али се уводи и као метод за збрињавање каријеса у анксиозних пацијената и деце . Иако је врло удобна за пацијента, *ART* техника има и своје недостатке. Уклањање каријесом измењеног зубног ткива ручним инструментима није ефикасно као ротирајућим, па микроорганизми могу преживети и до две године испод постваљеног глас јономер цемент испуна. У денталном плаку доминантни микроорганизми одговорни за настанак како примарног тако и секундарног каријеса су *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus acidophilus* . Студије показују да 50% бактерија изолованих из денталног плака чини *Streptococcus spp.* и познато је да су врло осетљиве на дејство амоксицилина. Од свих кариогених микроорганизама који су изоловани из нестимулисана пљувачке заступљеност *Streptococcus mutans*-а је око 62% и доказано је да су сви изоловани микроорганизми изузетно осетљиви на студијом испитиване антибиотике (пеницилин, амоксицилин, цефазолин, клиндамицин и др.). Присуство кариогених микроорганизама погодује настанку секундарног каријеса који је директно одговоран за неуспех 60% стоматолошких рестаурација

2.5. Значај и циљ истраживања са становишта актуелности у одређеној научној области

Циљеви.

1. показати да ли глас јономер цементи без и са додатком антибиотика делују инхибиторно на раст кариогених микроорганизама (*Streptococcus mutans* и *Lactobacillus acidophilus*) и у којим концентрацијама (антибиотика) и
2. испитити да ли додавање антибиотика утиче на механичке карактеристике глас јономер цемената.

Значај. Овом студијом би се истакла способност значајне редукције кариогених микроорганизама додавањем антибиотика *GIC*-има без промене механичких карактеристика. Такође се може указати на то који је масени однос антибиотика у *GIC*-у оптималан и за који се од три испитивана, може рећи да је најефикаснији. Глас јономер цементи са додатком антибиотика, као својеврсни антибактеријски материјали, утичу на смањење могућности појаве секундарног каријеса па се предлажу као пожељни за успешно збрињавање каријеса *ART* техником, што ће допринети омасовљавању ове технике у деловима света са ограниченом доступношћу стоматолошких услуга.

2.6 Веза са досадашњим истраживањима

GIC, као рестауративне материјале у клиничку праксу уводе *Wilson* и *Kent* 1972. године и данас се користе за велики број индикација у стоматологији. Основне карактеристике *GIC* су изузетна биокомпатибилност и димензиона стабилност као и добра адхезија за зубна ткива и једноставна примена. Посебно је значајна и способност

дуготрајног ослобађања флуорида што доприноси процесу реминерализације, умањује деминерализацију зубног ткива и доводи до инхибиције раста кариогених микроорганизама. Резултати досадашњих студија указују на значајну редукацију *Streptococcus mutans*-а из пљувачке недељу дана, 4 недеље и годину дана након збрињавања каријесних лезија *ART* техником коришћењем *Fuji IX GIC*-а.

У последње време истраживачи улажу напоре како би побољшали постојеће антибактеријске карактеристике *GIC*-а. Врше се испитивања у смислу додавања *GIC*-има различитих антимикуробних агенаса - хлорхексидина, *PQAS*-а (*poly quaternary ammonium salt*), наночестица метала и њихових оксида и једног или смеше више антибиотика. Досадашњи резултати указују на значајну редукацију кариогених микроорганизама овим модификацијама, међутим, општеприхваћен став је да инкорпорација појединих антимикуробних агенаса (нпр. хлорхексидина) негативно утиче на механичке карактеристике материјала и директно зависи од количине додатих агенаса. Сматра се да се различити материјали помешани са различитим антибиотикима различито и понашају. Питање стварања евентуалне резистенције у овом случају се негира чињеницом да се из *GIC*-а ослобађају веома ниске концентрације антибиотика.

Овом студијом се желе наставити испитивања везана за антибактеријске карактеристике антибиотикима модификованих *GIC*-а. У доступној литератури нема података о антибактеријском ефекту засебно инкорпорираних амоксицилина, цефалексина и клиндамицина у конвенционалне *GIC*-е, па се овим истраживањем то жели испитати. Такође се жели утврдити који антибиотик и у којој концентрацији је најефикаснији, а без утицаја на механичке карактеристике материјала.

2.7 Методе истраживања

Врста студије

За ову врсту истраживања радиће се експериментална студија на микроорганизмима у *in vitro* условима. Користиће се стандардизовани микроорганизми са *ATCC* (*American Type Culture Collection*) кодом, хуманог порекла:

- *Streptococcus mutans* (*ATCC 25175, Microbiologics Inc. USA*) и
- *Lactobacillus acidophilus* (*ATCC 4356, Microbiologics Inc. USA*).

Припрема узорака

У овој студији користићемо конвенционални глас јономер цемент *Fuji IX (GC, Tokyo, Japan)* који је у оригиналном паковању састављен од течности и праха. Прах чини алумино-флуоросилакатно стакло (90-100%) и полиакрилна киселина (5-10%), а течност дестилована вода (50%), полиакрилна (40%) и полибазична карбоксилна киселина (10%).

Експериментални *GIC* се справља инкорпорацијом праха антибиотика у прах *GIC*-а. Антибиотици који ће се испитивати су:

- Амоксицилин (*Sinacilin caps. 500mg, Galenika AD*),
- Цефалексин (*Palitrex caps. 500mg, Galenika AD*) и
- Клиндамицин (*Clindamycin-MIP tabl. 600mg, Chephasaar GmbH*).

Прах антибиотика се меша са прахом *GIC*-а у 1, 3, 5 и 7% масеном (w/w) односу. На пример, за добијање приближно 1%-ног односа одређеног антибиотика у *GIC*-у, 990mg праха *GIC* се одмерава и у њега додаје 10mg праха жељеног антибиотика; процедура је иста за све остале процентуалне масене односе (**Error! Bookmark not defined.**) што приказује Табела 1.

Табела 1 : Групе узорака *GIC* које ће се користити у студији

Група	Састав <i>GIC</i>	Додаци (%)
Контролна	1000mg <i>GIC</i>	/
Група 1	10mg АБ + 990mg <i>GIC</i>	1
Група 2	30mg АБ + 970mg <i>GIC</i>	3
Група 3	50mg АБ + 950mg <i>GIC</i>	5
Група 4	70mg АБ + 930mg <i>GIC</i>	7

Као контролна група у овој студији послужиће *GIC* без додатка антибиотика и по 10µl раствора 5 mg/ml (**Error! Bookmark not defined.**) сваког од испитиваних антибиотика нанесених на дискове од филтер хартије (*Wathman, USA*).

Узорци *GIC*-а облика диска се припремају тако што се прах меша са течношћу у односу 3.6:1 (g/ml), а потом се смештају у одговарајуће калупе до стврдњавања.

Одређивање антибактеријског ефекта *gic*-а

- Припремање суспензије бактерија и тест подлога -

Бактеријске културе које се испитују у овој студији (*Streptococcus mutans* и *Lactobacillus acidophilus*) од добављача долазе у тзв. KWIK-STIK™ паковању. Свака KWIK-STIK™ јединица садржи лиофилизовану палету једног соја микроорганизама од које се тачно познатим поступком добија примарна култура (i). По добијању примарне културе помоћу езе у стерилним условима врши се пресејавање на коси *MH* (*Mueller Hinton*) агар и инкубира на температури од 37°C у сушници (*E28; BINDER, Немачка*) у току 24 сата (i).

За справљање суспензије бактерија, по истеку 24 сата у стерилним условима, помоћу стерилне езе узимају се узорци култура, а потом се припремају тест подлоге. У стерилне Петри кутије са *MH* подлогом (*Liofilchem, Italy*) дебљине 4mm и пречника 90mm додаје се 300 µl суспензије бактерија густине 10⁵-10⁶ CFU/ml бактеријских ћелија чисте културе испитиваног соја (инокулума) (**Error! Bookmark not defined.**,i) и потом се остављају на собној температури 15-30 минута како би очврснуле. Овим поступком се добија иста дебљина подлоге у свакој кутији.

- Антибактеријски ефекат -

За одређивање антибактеријског ефекта припремљених узорака *GIC* користимо диск дифузиони тест који се огледа у способности узорака да инхибирају раст и размножавање испитиваних микроорганизама.

Исте тест подлоге, припремљене на предходно описан начин, ће се користити за све експерименте. Оптимално је да се узорци постављају на растојању од 24-30mm како би се избегло преклапање зона инхибиције. Ако се наноси ручно, узорак мора бити притиснут да би се направио тренутни и потпуни контакт са површином Петри кутије. После првог контакта са површином, узорак се не може померати због тренутне

дифузије антибиотика. Сваки узорак се са доње спољашње стране Петри кутије обележава бројем ради лакшег праћења.

Инкубације бактерија траје 18-24 сата на температури 35-37⁰С, а затим се читавају вредности зона ихбиције око узорака. Преглед и читавање се обавља помоћу светлосног микроскопа (*Motic SFC 28* са камером *Moticam 10, 1.3MP Live Resolution* - произвођач компанија *Motic*, Канада) уз употребу фотоапарата (*Nikon Coolpix L110*, који има објектив величине 16×20 инча, 15× оптички зум и 12.1MP) где се у току испитивања фотографише свака Петри кутија (i).

Одређивање антимицробне активности испитиваних антибиотика

За одређивање антимицробне активности антибиотика користиће се микробиолошки диск дифузиони метод. Мерење концентрација се врши у односу на величину зоне инхибиције раста тест микроорганизама. Мерења се обављају у стерилним условима.

Да бисмо одредили минималну инхибиторну концентрацију сваког појединачног антибиотика морамо припремити стандардна разблажења свакога од њих фосфатним пуфером (рН 6.0) у односу 1:1. Контроле ради, од већ разблаженог узорка, прави се још један са физиолошким раствором до односа 1:4. Потом се припремају разблажења сваког од антибиотика са разликом од 10 пута и то: 0,01; 0,1; 1; 10 и 100 µg/ml.

Припремљени узорци 1, 3, 5 и 7% масеног односа сваког антибиотика у *GIC*-у ће бити остављени 24 часа у 10ml дестиловане воде у стакленим посудама на температури од 37⁰С. Потом се одређена количина раствора извлачи из посуде, што ће се поновити и након 7 и 14-тог дана. Онолико раствора колико се сваког пута узме из посуде надокнађује се додавањем исте количине дестиловане воде.

У раду користимо дискове од филтер хартије (*Wathman, USA*) пречника 11mm на које се наноси тачно одређена количина антибиотика различитих разблажења и раствора из посуде. Оне се наносе на тест подлогу и инкубација бактерија траје 18-24 часа при температури од 35-37⁰С. Способност раста и размножавања испитиваних микроорганизама зависиће од њихове осетљивости, тако да се око диска гради бистра, провидна зона кружног облика у којој нема раста бактерија, па уколико ефекат постоји читава се величина зоне ихбиције око дискова (i). Преглед и читавање врши се на предходно описан начин.

За логаритамски трансформисане вредности концентрација антибиотика и квадрате пречника зона инхибиције раста микоорганизама тражи се линеарна регресија. С обзиром да се испитивање антибактеријског ефекта антибиотика обавља у лабораторији у стандардизованим условима, поједини параметри истраживања (врста подлоге, густина инокулума, време инкубације и др.) су константни. На основу вредности пречника зона инхибиције раста референтне бактеријске културе и познате минималне инхибиторне концентрације (*MIC*) и још најмање две концентрације испитиваног антибиотика за дату бактеријску културу, могу се изразити вредности сваке константе на основу следеће формуле (ii):

$$Z^2 = A \log Q - A \log MIC + B$$

Z → инхибиција зоне раста изражена као квадрат пречника зоне раста

За испитивање механичких карактеристика материјала - тврдоће стандардном *Vickers* методом препоручује се најмање 3 мерења, а свако следеће повећава тачност резултата.

Статистичка обрада података

Подаци који се односе на механичке карактеристике и инхибицију раста микроорганизама под утицајем глас јономер цемената без и са додатком антибиотика су статистички обрађени коришћењем *t*-теста независних узорака. Статистички значајним су сматране разлике за које је $p < 0.05$. За логаритамски трансформисане концентрације антибиотика и квадрате пречника инхибиције раста микроорганизама тражи се линеарна регресија, а потом ће бити израчунат коефицијент корелације (*r*). Веза је умерена ако је $0.3 < r < 0.5$ (смернице за утврђивање јачине везе по Кохену, 1988), а јака за вредности $r > 0.5$. Подаци су анализирани коришћењем програма *IBM SPSS Statistics 18*.

2.8 Очекивани резултати докторске дисертације

Добијеним подацима се жели показати да сваки од антибиотика инхибира раст и размножавање испитиваних микроорганизама и за сваки се одређује минимална инхибирна концентрација. Показује се, такође, да долази до ослобађања и израчунавају се количине сваког ослобођеног антибиотика додатог *GIC*-има у 1, 3, 5 и 7% масеном односу. Поређењем добијених података инхибиције раста и размножавања испитиваних микроорганизама између *GIC*-а без и са додатком сваког од антибиотика очекује се да постоји већа инхибиција раста у групи *GIC*-а са додатком антибиотика. Очекује се, такође, да постоји корелација између концентрације ослобођених антибиотика из *GIC* и инхибиције раста микроорганизама. Испитивањем механичких карактеристика не очекује се драстична промена између узорака *GIC*-а без и са додатком антибиотика.

2.9 Оквирни садржај дисертације

Овом студијом се прати утицај глас јономер цемената без и са додатком три различита антибиотика на раст кариогених микроорганизама и њихове механичке карактеристике у сврху спречавања могућности настанка секундарног каријеса око испуна рестауираних *ART* техником.

Антибактеријски ефекат глас јономер цемента (*Fuji IX*) са додатком сваког од антибиотика (амоксицилин, цефалексин и клиндамицин) у 1, 3, 5 и 7% масеном односу одређује се диск дифузионим методом. Контролне групе су глас јономер цементи без додатка антибиотика и сами антибиотици. Антибактеријска активност антибиотика, као и концентрација ослобођених антибиотика из припремљених узорака глас јономер цемената испитиваће се микробиолошком диск дифузионим методом. Испитивани кариогени микроорганизми су *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus acidophilus*. Механичке карактеристике узорака ће се утврдити испитивањем тврдоће методом по *Vickers*-у. Подаци су статистички обрађени коришћењем *t*-теста независних узорака и анализом регресије и корелације.

Овом студијом би се доказала способност значајне редукације испитиваних кариогених микроорганизама додавањем сваког од три испитивана антибиотика у 1, 3, 5 и 7% масеном односу глас јономер цементима. Очекује се да концентрације ослобођених антибиотика из узорака корелирају са величинама зона инхибиције раста испитиваних микроорганизама. Треба се указати на то који је масени однос антибиотика у глас јономер цементу оптималан и за који се од три испитивана, може рећи да је најефикаснији. Испитивањем механичких карактеристика се жели приказати да не постоје значајне промене у односу на контролну групу.

Глас јономер цементи са додатком антибиотика, као својеврсни антибактеријски материјали, предлажу се као пожељни за успешно збрињавање каријеса *ART* техником.

2.10 Име потенцијалног ментора

проф. др Слободан Јанковић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија са токсикологијом и Клиничка фармација

2.11 Научна област дисертације

Медицина и стоматологија.

2.12 Научна област чланова комисије

1. проф. др Слободан Јанковић, председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија са токсикологијом и Клиничка фармација

2. проф. др Дејан Баскић, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија

3. доц. др Радан Стојановић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Клиничка фармакологија и токсикологија, члан

Закључак и предлог комисије

1. На основу досадашњег успеха на докторским студијама и публикованих радова, **др Сандра Видојевић** испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.

2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу, где се испитује антимикубно дејство глас јономер цемента са и без додатка антибиотика.

3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза **др Сандре Видојевић** бити од великог научног и практичног значаја.

4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата **др Сандре**

Видојевић под називом „УТИЦАЈ ГЛАС ЈОНОМЕР ЦЕМЕНАТА БЕЗ И СА ДОДАТКОМ АНТИБИОТИКА НА РАСТ КАРИОГЕНИХ МИКРООРГАНИЗАМА У *IN VITRO* УСЛОВИМА ” и одобри њену израду.

проф. др Слободан Јанковић, председник, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија са токсикологијом и Клиничка фармација

проф. др Дејан Баскић, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија

доц. др Радан Стојановић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Клиничка фармакологија и токсикологија, члан

У Крагујевцу, 27.2.2013.
