

Универзитет у Крагујевцу
Факултет Медицинских наука
13.01.20
05 175/4-4

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-910/35 од 13.11.2019. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Ервина Таса, под називом:

"Утицај материјала за денталне испуне апроксималних препарација на параметре оксидативног стреса у гингивалној сулкусној течности"

Чланови Комисије су:

1. **проф. др Марија Миловановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија; председник;
2. **проф. др Иванка Зелен**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан;
3. **проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан;

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу следећи

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Ервин Тасо рођен је 05.06.1974. године у Панчеву. Основну и средњу школу завршио у истом граду. Стоматолошки факултет завршио у Београду 2001 године. После завршеног обавезног стажа и Школе резервних официра Војске Србије почиње да ради у Војсци Србије као потпоручник, доктор стоматологије на ВМЦ Нови Београд 2003. године. Специјализацију из Стоматолошке протетике уписује 2004 на Војномедицинској академији а 2007 постаје специјалиста и почиње да ради на Одељењу стоматолошке протетике Клинике за стоматологију ВМА. Године 2011 уписује докторске студије на Универзитету у Крагујевцу и исте године прелази у Управу Клинике за стоматологију где почиње да ради хируршку протетику на имплантатима. Године 2016. уписује специјализацију из Оралне хирургије на Стоматолошком факултету у Београду и 2019. године по стицању звања специјалисте оралне хирургије почиње да ради на Одељењу за имплантологију ВМА на месту оралног хирурга са чином потпуковника. Члан је Секције за оралну хирургију СЛД и Секције за стоматолошку протетику. 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 хипотеза докторске дисертације

Наслов: " Утицај материјала за денталне испуне апроксималних препарација на параметре оксидативног стреса у гингивалној сулкусној течности "

Предмет: Предмет ове студије је испитивање утицаја материјала за денталне испуне апроксималних препарација на параметре оксидативног стреса у гингивалној сулкусној течности.

Хипотеза: Вредности параметара оксидативног стреса у гингивалној сулкусној течности оболелих зуба се разликују вредности измерених у гингивалној сулкусној течности здравих зуба.

Материјали за привремену и трајну рестаурацију различито утичу на вредности параметара оксидативног стреса.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је публикувао један рад у целини за штампу у часопису са СС/СЦИ листе, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Taso E, Stefanovic V, Stevanovic I, Vojvodic D, Topic A, Petkovic-Curcin A, Obradovic-Duricic K, Markovic A, Dukic M, Vujanovic D. Influence of Dental Restorations on Oxidative Stress in Gingival Crevicular Fluid. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:1823189. **M21**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Гингивална сулкусна течност је специфична за сваки појединачни зуб јер представља трансудат крвне плазме локалних крвних судова у гингивални сулкус што га чини мање зависним од системских утицаја околине и стога је у овом истраживању гингивална сулкусна течност одабрана као најпогоднији орални субстрат. Каријес се данас сматра болешћу денталних чврстих ткива чија исходишта представљају резултанту деловања оралних патогена и инфламацијског имунског одговора на њихову инвазију. Слично би се могло тврдити и за периодонтална обољења. Као и у многим другим патолошким процесима важну улогу игра и локална антиоксидантна одбрана од стреса изазваног патогеним факторима. Оксидативни стрес указује на недовољне капацитете антиоксидантних механизма да се изборе са прекомерном неконтролисаним продукцијом слободних радикала (СР) што на концу резултује оксидативном повредом многих биомолекула. И не само то већ и различите класе СР (реактивни кисеоник, азот, сумпор или угљеникови деривати) могу иницирати одговарајући тип стреса: оксидативни, нитрозни, тиолски, угљенични. Последице могу бити различитих нивоа, од измењене ћелијске сигнализације, промене енергетског стања ћелије до смрти ћелије (најчешће апоптозом). У денталним лезијама се одвија прекомерна неконтролисана продукција слободних кисеоничних радикала (*superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, hypochlorous acid*) који оштећују пре свега ћелијску и унутарћелијске мембране, а нарочито овојнице фаголизозома фагоцитних ћелија. Оксидисани продукти поли несатурираних масних киселина (делови ћелијских мембрана) се конвертују у карбониле, као што је *Malonil dialdehyd* (MDA) - што га чини поузданим маркером укупне липидне оксидације. Услед поменутих оштећења мембрана ензими као што су мијелопероксидазе и NADH-оксидазе напуштају фаголизозом и доспевају у цитоплазму фагоцитних ћелија, а одатле и у међућелијски простор са последичним оштећењима запаљеног ткива. Секвестрација O_2^- од укупне супероксид

дисмутазе (SOD) и H_2O_2 од каталазе може умањити микробицидну активност мијелопероксидазе унутар и/ил изван фагоцита, што ће се одразити у смањеној липидној пероксидацији овојница микроорганизама. Улога SOD у патолошким стањима усне дупље још није до краја испитана.

2.5. Значај и циљ истраживања

Општи циљ овог истраживања је да се утврди утицај шест материјала употребљених за денталне испуне апроксималних препарација на параметре оксидативног стреса у узорцима гингивалне сулкусне течности

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Истраживања су последњих деценија јасно указала на повезаност оксидативног стреса и различитих патолошких стања усне дупље. У новијим студијама у којима се испитује оксидативни стрес у микросредини уста углавном се пратила активност пероксидазе у пљувачки. Пажња истраживача је однедавно фокусирана на мерење инфламацијских параметара у гингивалној сулкусној течности што омогућује детаљнију анализу патогенезе и праћење успеха терапије. Утицај фактора околине (хигијенске навике, храна, алкохол,) је много већи на дешавања у пљувачки него у гингивалној сулкусној течности, при чему је употреба дувана изузетак, јер је показано да повећава волумен и проток гингивалне сулкусне течности. На основу података из литературе, може се очекивати да материјали коришћени за денталне испуне индукују и про- оксидативну и анти-оксидативну локалну активност.

2.7. Методе истраживања

A. ВРСТА СТУДИЈЕ

Проспективна клиничка опсервациона студија пресека.

B. ПОПУЛАЦИЈА КОЈА СЕ ИСТРАЖУЈЕ И МАТЕРИЈАЛИ

У студију ће бити укључено укупно 90 испитаника сврстаних у шест група према врсти испуне.

Критеријуми за укључење у студију:

- дијагноза апроксималног каријеса на фронталним и бочним зубима
- одсуство свежих постектрационих или трауматских рана у области рестаурације
- одсуство клиничких знакова инфекције у области површина за рестаурацију
- мотивисаност, кооперативност и задовољавајући ниво оралне хигијена пацијената

Критеријуми за искључење:

- присуство инфекције ендодонтског или пародонталног порекла у области апроксималне или цервикалне регије зуба
- присуство изражених пародонталних целова
- присуство испуна који проминирају изван кавитета
- пацијенти који су на радијационој, имуносупресивној терапији и они са тешким хроничним болестима
- пацијенти који у анамнези наводе проблеме са алкохолизмом, наркотицима
- пацијенти који пуше више од 20 цигарета дневно
- пацијенти са лошом оралном хигијеном, непоуздани за сарадњу.

Врсте материјала за денталне испуне:

- Amalgam (Etracap D caps, Galenika, Srbija)
- Tetric Evo Ceram (Ivoclar, Vivadent)
- Beautifill (Shofu, Japan)
- Cink polikarboksilatni cement (Hoffman,Harward, USA),
- Cink fosfatni cement (Cegal NV,Galenika, Srbija)
- Glass ionomer cement (Fuji Plus, Green Circle, USA)

Tetric EvoCeram и *Beautifill* су нанохибридни композитни материјали који се међусобно разликују у саставу везивних смола, стабилизатора, концентрацији неорганских компоненти и према односу укупних органских и неорганских материја. За њихово везивање у испрепарисаном зубу неопходно је додатно дејство ултравиолетне светлости. Друге врсте материјала се везују и очвршћују саме по пласирању у денталну шупљину, у припремљен кавитет.

Критеријуми за избор врсте материјала:

Амалгам, *Tetric Evo Ceram* и *Beautifill* су дентални материјали који ће бити коришћени за дефинитивну рестаурацију каријесом оштећених зуба. *Cink polikarboksilatni cement*, *Cink fosfatni cement* и *Glass ionomer cement* су дентални материјали који ће бити коришћени за привремену рестаурацију оштећених зуба.

Избор материјала за испуне у односу на локализацију лезије:

Истраживање ће обухватити апроксималне локализације 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 вилицы и 33-43 у доњој вилицы 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 апликовани када је лечење канала коренова у току као и код зуба где је због тренутног крварења из интерденталне гингиве било немогуће поставити дефинитивни испун.

Клинички параметри који ће бити праћени:**Стање потпног 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);
- дубина гингивалног џепа (ДГЦ, вреднован од 0-3).

В. УЗОРКОВАЊЕ

Након клиничког прегледа узорци GCF ће се добити помоћу 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. Папирни филтер ће потом бити стављени у стерилне епрувете које садрже 0,5 ml стерилног PBS-а, 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 рестаурације.

Мерење вредности параметара оксидативног стреса у гингивалној течности
Вредности MDA ће се измерити спектрофотометријски на основу продукције тиобарбитуратне киселине: након инкубације са тетрабарбитурном киселином ствара се црвено обојени комплекс, а интензитет боје на таласној дужини од 532nm (17). Активност SOD ће се одређивати као степен инхибиције оксидације епинефрина O_2 у колорни продукт адренохром. Кинетика активности SOD ће се одређивати спектрофотометријски на таласној дужини од 480 nm након додавања 10 mmol епинефрина у узорке припремљене у карбонатном пуферу (50 mmol, pH 10.2), који садржи 0.1 mmol EDTA (18).

Редуковани облик глутатиона (GSH) редукује *Elman's* реагенс [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), DTNB] (36.9 mg DTNB у 10 ml methanol) у TRIS-HCl пуферу (0.4 M, pH-8.9) у жуто обојени 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB)(18). Продуковани TNB је пропорционалан вредности деплетираниог GSH (на рачун његове оксидације) и биће одређиван спектрофотометријски на таласној дужини од 412 nm.

Укупна концентрација протеина биће одређивана у узорцима према методи Lowry et al. (20).

Г. ВАРИЈАБЛЕ КОЈЕ СЕ МЕРЕ У СТУДИЈИ

Независне варијабле: клинички параметри, индекс крварења (ИК), плак индекс (ПИ по *Silness-Lou*), гингивални индекс (ГИ), дубина гингивалног џепа (ДГЦ). Зависне варијабле: MDA, SOD, GSH, укупни протеини.

Д. 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 група треба да буде минимално по 15 пацијената.

Ђ. 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

Очекује се да ће вредности оксидативног стреса пре почетка терапије одражавати интензитет и распрострањеност упалног процеса у околном и структурама зуба, а да ће примена денталних материјала значајно изменити вредности параметара оксидативног стреса, зависно од типа материјала што би било важно при избору материјала за испуне.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Несанирани каријес који се развија на апроксималним површинама зуба често напредује према гингиви и долази у контакт са гингивалним сулкусом- циркуларни жлеб између унутрашње површине слободне гингиве и вратног дела зуба, чији садржај чини гингивална течност. Локални запаљенски процеси делују на све структуре зуба, утичући и на проток гингивалне течности (енгл. *Gingival Crevicular Fluid*, GCF), и измену њеног садржаја. Материјали за испуне, употребљени у санацији апроксималног каријеса, долазе у контакт са GCF, а резултати *in vitro* испитивања показују да они утичу на концентрације инфламацијских медијатора, а свакако и на параметре оксидативног стреса (енгл. *Oxidative Stress*, OS). Стога, биокомпатибилност денталних материјала може бити испитивана и одређивањем ових параметара у узорцима GCF.

У студију ће бити укључено 90 испитаника, старости 18-70 година, сврстаних у шест група према врсти апликованих денталних испуна. За рестаурацију препарисаних апроксималних кавитета користиће се шест различитих материјала (три за привремену и три за дефинитивну рестаурацију). Код испитаника биће бележени и клинички параметри. GCF ће се узорковати из гингивалног сулкуса методом филтер-папирних трачица. Параметри OS (малонил диалдехид, глутатион, супер оксид дисмутаза) ће се одређивати спектрофотометријски у узорцима GCF пре третмана, а потом 7-ог и 30-ог дана. Контроле ће бити узорци GCF здравих зуба исте позиције на супротној страни вилице.

Очекује се да ће вредности OS пре почетка терапије одражавати интезитет и распрострањеност упалног процеса у структурама зуба, а да ће примена денталних материјала значајно изменити вредности параметара OS, зависно од типа материјала што би било важно при избору материјала за испуне.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже проф. др Татјану Кањевац, ванредног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Дечја и превентивна стоматологија. Проф. др Татјана Кањевац испуњава услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9.

3.1. Компетентност ментора

Релевантне референце које су из области теме докторске дисертације:

1. Stefanovic V, Taso E, Kanjevac T, Abazovic Dz, Rakic M, Petkovic-Curcin A, Acovic A, Vojvodic D. Dental caries and restorative biomaterials affect IL-1 β and TNF- α levels in the gingival crevicular fluid. *Vojnosanit Pregl.* 2019; doi: 10.2298/VSP181116038S.
2. Kanjevac T, Gustafson C, Ivanovska A, Ravanetti F, Cacchioli A, Bosnakovski D. Inflammatory cytokines and biodegradable scaffolds in dental mesenchymal stem cells priming. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2019. doi: 10.2174/1574888X14666190103170109.
3. Markovic BS, Kanjevac T, Harrell CR, Gazdic M, Fellabaum C, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular and Cellular Mechanisms Involved in Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy of Inflammatory Bowel Diseases. *Stem Cell Rev* 2018;14(2):153-165.
4. Vasovic M, Gajovic N, Brajkovic D, Jovanovic M, Zdravkovic 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.

5. 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):70-76
6. TV. Kanjevac, MZ. Milovanovic, O. Milosevic-Djordjevic, Z. Tesic, M. Ivanovic, A. Lukic. Cytotoxicity of glass ionomer cement on human exfoliated deciduous teeth stem cells correlates with released Fluoride, Strontium and Aluminium ion concentrations. Arch Biol Sci 2015; 67(2): 619-630.
7. 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):369-375

4. Научна област дисертације

Медицина, Истраживање у стоматологији.

5. Научна област чланова комисије

1. **проф. др Марија Миловановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија; председник;
2. **проф. др Иванка Зелен**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан;
3. **проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Беогарду за ужу научну област Имунологија, члан.

Закључак и предлог Комисије

На основу досадашњег научно-истраживачког рада, кандидат др Ервин Тасо, испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата, Ервина Таса под називом "Утицај материјала за денталне испуне апроксималних препарата на параметре оксидативног стреса у гингивалној сулкусној течности" и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

проф. др Марија Миловановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија; председник



проф. др Иванка Зелен, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан



проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Беогарду за ужу научну област Имунологија, члан



У Крагујевцу, 11. 12. 2019.