

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КРАГУЈЕВАЦ**

1. Одлука Изборног већа

Одлуком Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, број 01-5717/3-4 од 8.9.2010. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Татјане Кањевац, под називом:

„Ефекти глас-јономер цемента на мезенхималне матичне ћелије ”

Чланови комисије су:

- 1. проф. др Дејан Марковић**, председник, редовни професор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Дечија и превентивна стоматологија
- 2. проф. др Миодраг Стојковић**, члан, редовни професор Медицинског факултета у Крагујевцу, за ужу научну област Генетика
- 3. проф. др Слободан Јанковић**, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија са токсикологијом и Клиничка фармација

2.1 Кратка биографија кандидата

Татјана Кањевац је рођена 9.10.1963. године у Новом Пазару. Завршила је Средњу медицинску школу у Крагујевцу. На Стоматолошки факултет у Београду се уписала школске 1982/83 године, а завршила га са просечном оценом 7.48. На докторске студије на Медицинском факултету у Крагујевцу се уписала 2006. године. Специјалиста је дечије и превентивне стоматологије.

2.2 Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: „Ефекти глас-јономер цемента на мезенхималне матичне ћелије ”

Предмет: Ова студија ће се бавити испитивањем да ли глас-јономер цемента показују цитотоксични ефекат на мезенхималне стем ћелије.

Хипотезе:

1. Постоји разлика у цитотоксичности између најчешће примењиваних глас-јономера.

2. Постоје дефинисани молекулски механизми цитотоксичности глас-јономер цемента на мезенхималним стем ћелијама.

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:

- Kanjevac T, Volarevic A. Cytotoxicity of glass ionomer cements on human pulp cells. Ser J Exp Clin Res 2010; 11: 115-7. M52 1.5 bodova
- Markovic D, Milenkovic A, Koliakos G, Kostidou E, Karadzic I, Debeljak Martacic J, Jokanovic V, Peric T, Petrovic B, Arsenijevic N, Kanjevac T. Potential preservation of dental pulp stem cells. Balk J Stom 2010;14: 4-7. M53 1 bod
- G. Radosavljević, I. Jovanović, T. Kanjevac, N. Arsenijević. The role of regulatory T cells in modulation of anti-tumor immune response. Srp Arh Celok Lek (in press, потврда бр. 285/09 од 23.2.2010) M23 3 boda

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Глас-јономер цемента су један од најчешће примењиваних рестауративних материјала у стоматологији, нарочито у дечијој стоматологији. Важност њихове примене огледа се у стабилној и дуготрајној хемијској вези коју остварују са глеђи и дентином.

Састав глас-јономер цемента, које су први направили и описали *Wilson* и *Kent*, чине основа (најчешће је то прах калцијум или стронцијум алуминофлуоросалицилат) и у води растворљив полимер (најчешће полиакрилна киселина). Обзиром да је већина прво примењиваних глас-јономер цемента изазивала умерену или снажну реакцију пулпе, направљени су нови-модификовани, биокомпатибилни глас-јономери.

Данас се глас-јономер цемента класификују у три групе: конвенционални, „смолом модификовани“ и металима или другим супстанцама ојачани глас-јономер цемента.

Конвенционални глас-јономер цемента представљају биокомпатибилни материјал високе вискозности који отпуштајући јоне флуора, накнадно абсорбованих у структуре зуба, доприносе јачању и очувању здравља зуба. Главни недостатак конвенционалних глас-јономер цемента представља склоност ка брзој дехидрацији, изражена растворљивост и споро сједињавање са полимерима. „Металом ојачани“ глас-јономери су ојачани металним инклузијама, најчешће амалгамом. Из естетских и функционалних разлога данас се све више појављују модификације ове групе глас-јономера са додатком акрилатних или других партикула које имају бољи естетски моменат а задржавају постојаност и чврстоћу. Уградњом 2-хидроксиетил метакрилата настала је хибридна верзија конвенционалних глас јономера, означена као „смолом модификовани“ глас-јономер цемента.

У поређењу са конвенционалним, „смолом модификовани“ и „металом ојачани“ глас-јономер цемента су јачи, издржљивији, еластичнији, мање склони дехидрацији, брзо се једине са полимерима, али показују мању биокомпатибилност, што је показано у бројним студијама које су испитивале цитотоксичност различитих глас-јономера на ћелијама зубне пулпе. Токсичност настаје као последица повећања киселости средине (нарочито у првим сатима апликовања глас-јономера), отпуштања јона флуора или јона

метала што може допринети значајном оштећењу ћелија зубне пулпе које су директно или индиректно изложене апликованим глас-јономерима.

У репарацији оштећеног зубног ткива, значајну улогу имају мезенхималне стем ћелије. Мезенхималне стем ћелије су мултипотентне, само-обнављајуће матичне ћелије присутне у готово свим ткивима и органима (укључујући и зубну пулпу) које доприносе обнављању оштећених, апоптотичних или некротичних ћелија.

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

Циљеви. Основни циљ овог истраживања је да се испита да ли глас-јономер цементи показују цитотоксични ефекат на мезенхималне стем ћелије.

У складу са основним циљем постављени су и следеће циљеви:

1. Утврдити да ли постоји разлика у цитотоксичности између најчешће примењиваних глас-јономера.
2. Испитати молекулске механизме цитотоксичности глас-јономер цемента на мезенхималним стем ћелијама.

Значај. Обзиром да до данас, и поред масовног коришћења глас-јономера у стоматолозији, није урађена ниједна студија којом би се утврдио евентуални цитотоксични ефекат глас-јономера на мезенхималним стем ћелијама, ово истраживање би требало да укаже да ли је примена ових рестауративних материјала безбедна и у којој мери ремети, услед оштећења мезенхималних матичних ћелија, нормалне репаративне процесе у зубној пулпи.

2.6 Веза са досадашњим истраживањима

Мезенхималне стем ћелије карактерише експресија молекула: CD105 (SH2), CD73 (SH3/4), stromal antigen 1 (Sca-1), CD44, CD166, CD54/CD102 и CD49, као и смањена или одсутна експресија молекула карактеристичних за: хематопоетске ћелије (CD14, CD34, CD45 и CD11a/LFA-1), еритроците (glycophorin A), тромбоците и ендотелне ћелије (CD31) (14-15). Поред ових фенотипских карактеристика, главне функционалне карактеристике мезенхималних стем ћелија су способност репарације оштећеног ткива услед могућности само-обнављања и услед капацитета за диференцијацију у све ћелије мезодермалног порекла (укључујући ћелије дентина, хрскавице, gleђи и кости).

Иако су бројна истраживања, рађена са циљем испитивања биокомпатибилности глас-јономера и безбедности њихове примене, тестирања цитотоксични ефекат глас-јономера на разним ћелијама зубне пулпе, ниједна студија до сада није као циљне ћелије користила мезенхималне матичне ћелије.

2.7 Методе истраживања

Глас-јономер цементи чија ће се цитотоксичност испитати:

1. GC Fuji IX GP

Хемијски стврдњавајући гласјономер цемент за испуне. Припада групи највише употребљиваних глас јономер цемената а примењује се у рестаурацији млечних (класа I, V) и сталним зубима (подлоге, класа I, II и др). Испитивања на ћелијским културама (најчешће на фибробластним културама), сврставају га у биокompatibilне рестауративне материјале ниске цитотоксичности. Хемијски састав овог глас-јономера чини прах састављен из алумини-флуоро-силиката (95%) и полиакрилне киселине (5%) и течна компонента коју чине дестилована вода (50%), полиакрилна киселина (40%) и полибазична карбоксилна киселина (10%).

2. Fuji Plus

Акрилатом модификован гласјономер цемент за цементирање фиксних протетских радова и ортодонтских прстенова. Одликује га снажна хемијска веза са тврдом зубним ткивима, металом, акрилатом и керамиком. Припада групи аутополимеризујућих „смолом модификованих“ глас-јономера у чији састав улази 2-хидроксиетил метакрилат.

3. Fuji VIII

Самостврдњавајући акрилатом ојачан гласјономерни рестауративни материјал. Гласјономерни рестауративни материјал са побољшаним физичким и естетским својствима примарно намењен за испуне класе III, V и рестаурацију лезија површине корена. Припада групи аутополимеризујућих „смолом модификованих“ глас-јономера, а због побољшане естетике значајно проширио индикационо подручје гласјономер цемената на рестаурације где је важна естетска компонента терапије.

4. Fuji II LC

Светлоснополимеризујући гласјономерни рестауративни материјал. Осим ацидо-базне реакције везивања карактерише се и светлосном иницијацијом полимеризације карактеристичном за композитне смоле. Индикуван за испуне III и V класе, испуни на млечним зубима, у случајевима где се захтева контрастно видљив испун. Посебно погодан за испуне ерозија на врату зуба и каријес корена. Као подлога користи се код композитних рестаурација или код „сендвич технике“.

5. Fuji TRIAGE

Аутополиметризуюћи гласјономерни материјал за заливање јамица и фисура оклузалних површина зуба, терапији дубоког каријеса, превенцији и контроли преосетљивости, за привремено ендодонтско затварање и привремене испуне. Представља јединствен каријес-профилактички материјал са степеном отпуштања јона флуора шест пута већом него остали гласјономерни материјали намењени за сличне индикације.

6. Fuji I

Конвенционални гласјономер цемент за цементирање метало-керамичких радова. Намењен за цементирање круница, мостова и ортодонтских прстенова, као подлога или лајнер испод композитних или амалгамских испуна.

Током ове студије користиће се **хумане мезенхималне матичне ћелије** у 14-20 пасажи, култивисане у „ Dulbecco's Modified Eagle Medium- DMEM” медијуму са додатком 10% говеђег феталног серума (FBS) и антибиотика (penicillin 100 IU/ml и streptomycin 100 mg/cm³).

Испитивање цитотоксичности. За испитивање цитотоксичности користиће се МТТ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) тест. Оптичка густина сваког „бунарчића“ биће одређена на таласној дужини 595 nm коришћењем детектора за микротитар плоче Zenyth 3100. У одређеним временским интервалима (24h и 72h) након излагања глас-јономер цементима испитиваће се вијабилност мезенхималних матичних ћелија, односно цитотоксичност испитиваних глас-јономера уз коришћење формуле:

$$\% \text{ цитотоксичности} = 100 - [(E - BG_0) / (TS - BG_0) \times 100]$$

где „BG₀-background” вредност потиче од самог медијума, „TS -total viability” показује спонтану смрт нетретираних ћелија, и „E- experimental ” означава вредност испитиваног „бунарчета”.

Квалитативно испитивање типа ћелијске смрти флуоресцентном микроскопијом мезенхималних стем ћелија бојених акридин оранжом и етидијум бромидом.

Квантитативно испитивање некротичне смрти ћелија Lactate dehydrogenase (LDH) тестом.

Доказивање апоптотске смрти инкубацијом мезенхималних стем ћелија са панинхибитором каспаза пре излагања глас-јономер цементима, одређивањем процента вијабилних мезенхималних стем ћелија МТТ тестом и поређењем овог процента са процентом вијабилних мезенхималних стем ћелија које нису биле третиране инхибиторима каспаза.

Испитивање доминатног пута индукције апоптозе: инкубација мезенхималних стем ћелија са инхибиторима каспазе 8 и 9 пре излагања испитиваним глас-јономерима; одређивање процента вијабилних ћелија МТТ тестом и њихово поређење са процентом вијабилних мезенхималних стем ћелија третираних само глас-јономерима.

Квантитативно испитивање апоптотске смрти ћелија *flow* цитометријском анализом третираних мезенхималних стем ћелија бојених *Annexin*-ом V и пропидијум јодидом.

Анализа ћелијског циклуса у третираним мезенхималним матичним ћелијама *flow* цитометријом након бојења пропидијум јодидом.

Врста студије

Експериментална *in vitro* студија

Статистичка обрада података

Подаци ће бити анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 13. Исказана цитотоксичност биће резултат троструког понављања и средње вредности трипликаата тестираних јономера биће поређени коришћењем непараметријског Mann-

Whitney-евог теста. Резултати експеримента ће се изражавати као средња вредност \pm стандардна грешка (SE). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима поређених јономера износиће $p < 0,05$, док ће се као статистички веома значајна разлика сматрати $p < 0,01$.

2.8 Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да резултати испитивања цитотоксичности глас-јономера покажу да глас-јономер цемента испољавају цитотоксични ефекат на мезенхималне матичне ћелије. Такође, очекује се да цитотоксичност глас-јономера испољена на мезенхималним стем ћелијама буде умерена или слаба.

Од испитиваних глас-јономера, очекује се да Fuji TRIAGE који отпушта јоне флуора, који су уз јоне водоника најодговорнији за цитотоксичност глас-јономера, покаже највећу цитотоксичност у поређењу са осталим испитиваним јономерима.

Пошто се утврди постојање цитотоксичног ефекта, одредиће се да ли мезенхималне стем ћелије умиру апоптозом или некрозом и испитаће се молекулски механизми одговорни за настанак апоптозе.

2.9 Оквирни садржај дисертације

Увод: Глас-јономер цемента су један од најчешће примењиваних рестауративних материјала у стоматологији. Могу да испоље цитотоксични ефекат на ћелије зубне пулпе углавном услед отпуштања јона водоника, флуора, алуминијума, стронцијума. У репарацији оштећеног зубног ткива, значајну улогу имају мезенхималне стем ћелије

Циљ: Циљ ове студије је да се испита да ли глас-јономер цемента показују цитотоксични ефекат на мезенхималне стем ћелије.

Метод: Испитиваће се цитотоксичност глас-јономер цемента: Fuji IX GP, Fuji Plus, Fuji VIII, Fuji II LC, Fuji I, Fuji TRIAGE, док ће циљне ћелије бити мезенхималне матичне ћелије. За испитивање цитотоксичности користиће се МТТ тест, за квантитативно испитивање некротичне смрти ћелија LDH тест, док ће се за доказивање апоптотске смрти мезенхималне стем ћелије инкубирати са панинхибитором каспаза пре излагања глас-јономер цементима. Квантитативно испитивање апоптотске смрти ћелија одредиће се *flow* цитометријском анализом третираних мезенхималних стем ћелија бојених Annexin-ом V и пропидијум јодидом. Анализа ћелијског циклуса у третираним мезенхималним матичним ћелијама биће одређена *flow* цитометријом након бојења пропидијум јодидом.

Очекивани резултати: Очекујемо да резултати испитивања цитотоксичности глас-јономера покажу да глас-јономер цемента испољавају умерен или слаб цитотоксични ефекат на мезенхималне матичне ћелије. Од испитиваних глас-јономера, очекује се да Fuji TRIAGE, који значајно отпушта јоне флуора, покаже највећу цитотоксичност у поређењу са осталим испитиваним јономерима.

Очекивани закључак: Глас-јономер цемента, и поред умереног цитотоксичног ефекта испољеног на мезенхималним матичним ћелијама, су безбедни за употребу и не ремете репаративне процесе у зубној пулпи, дентину и глеђи.

2.10 Научна област дисертације

Медицина и стоматологија.

2.11 Научна област чланова комисије

1. проф. др Дејан Марковић, председник, редовни професор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Дечија и превентивна стоматологија

2. проф. др Миодраг Стојковић, члан, редовни професор Медицинског факултета у Крагујевцу, за ужу научну област Генетика

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

Закључак и предлог комисије

1. На основу досадашњег успеха на докторским студијама и публикованих радова, др Татјана Кањевац 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 утицај глас јономер цемента на мезенхимне ћелије.

3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза др Татјане Кањевац бити од великог научног и практичног значаја, да се сагледају биолошки ефекти глас јономер цемента.

4. Комисија предлаже Изборном већу Медицинског факултета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата **др Татјане Кањевац** под називом **„Ефекти глас-јономер цемента на мезенхималне матичне ћелије ”** и одобри њену израду.

проф. др Дејан Марковић, председник, редовни професор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Дечија и превентивна стоматологија

проф. др Миодраг Стојковић, члан, редовни професор Медицинског факултета у Крагујевцу, за ужу научну област Генетика

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

У Крагујевцу, 7.12.2010.

3. Захтев за давање сагласности на извештај о предлогу теме докторске дисертације

Шифра за идентификацију дисертације _____

Шифра УДК₁ (бројчано) _____

Веб адреса на којој се налази извештај Комисије о урађеној докторској дисертацији:
www.medf.kg.ac.rs

СТРУЧНОМ ВЕЋУ ЗА МЕДИЦИНСКЕ НАУКЕ УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ

Молим да у складу са чл.____ Закона о високом образовању и чл.____ Статута Универзитета дате сагласност на извештај комисије о оцени теме докторске дисертације:

Назив дисертације: **Ефекти глас-јономер цемента на мезенхималне матичне ћелије**

Научна област УДК (текст): **МЕДИЦИНА И СТОМАТОЛОГИЈА** _____

Ментор (име и презиме, звање) _____

(Навести пет потпуних референци за радове ментора из уже научне или уметничке области из које је тема дисертације _____

Кратко образложење теме (до 100 речи) _____ Глас-јономер цемента су један од најчешће примењиваних рестауративних материјала у стоматологији. Циљ ове студије је да се испита да ли глас-јономер цемента показују цитотоксични ефекат на мезенхималне стем ћелије. Испитиваће се цитотоксичност глас-јономер цемента: Fuji IX GP, Fuji Plus, Fuji VIII, Fuji II LC, Fuji I, Fuji TRIAGE, док ће циљне ћелије бити мезенхималне матичне ћелије. За испитивање цитотоксичности користиће се МТТ тест, за квантитативно испитивање некротичне смрти ћелија LDH тест, док ће се за доказивање апоптотске смрти мезенхималне стем ћелије инкубирати са панинхибитором каспаза пре излагања глас-јономер цементима. Очекујемо да резултати испитивања цитотоксичности глас-јономера покажу да глас-јономер цемента испољавају умерен или слаб цитотоксични ефекат на мезенхималне матичне ћелије. Од испитиваних глас-јономера, очекује се да Fuji TRIAGE, који значајно отпушта јоне флуора, покаже највећу цитотоксичност у поређењу са осталим испитиваним јономерима.

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

Презиме и име кандидата: _____ Татјана Кањевац _____
Назив завршеног факултета: _____ Стоматолошки факултет у Београду _____
Одсек, група, смер: _____ доктор стоматологије _____
Година дипломирања: _____
Назив магистарског рада, односно докторског студијског програма: _____ Докторске академске студије
Научно подручје: _____ Медицина и стоматологија _____
Година одбране: _____
Факултет и место: _____ Медицински факултет у Крагујевцу _____
Број публикованих радова: (навести референце за три најважнија рада кандидата из уже научне области из које је тема дисертације_2 рада
1. Kanjevac T, Volarevic A. Cytotoxicity of glass ionomer cements on human pulp cells. Ser J Exp Clin Res 2010; 11: 115-7.
2. Markovic D, Milenkovic A, Koliakos G, Kostidou E, Karadzic I, Debeljak Martacic J, Jokanovic V, Peric T, Petrovic B, Arsenijevic N, Kanjevac T. Potential preservation of dental pulp stem cells. Balk J Stom 2010;14: 4-7.
3. G. Radosavljević, I. Jovanović, T. Kanjevac, N. Arsenijević. The role of regulatory T cells in modulation of anti-tumor immune response. Srp Arh Celok Lek (in press, потврда бр. 285/09 од 23.2.2010)

Назив и седиште организације у којој је кандидат запослен: _____ Завод за стоматологију у Крагујевцу _____
Радно место: _____ стоматолог специјалиста _____

**ПОТВРЂУЈЕМО ДА КАНДИДАТ ИСПУЊАВА УСЛОВЕ УТВРЂЕНЕ ЧЛ. _____
ЗАКОНА О ВИСОКОМ ОБРАЗОВАЊУ И ЧЛ. _____ СТАТУТА УНИВЕРЗИТЕТА
У КРАГУЈЕВЦУ**

У прилогу вам достављамо: - Извештај Комисије о оцени теме;
- Одлуку научно-наставног већа факултета о одобравању теме за израду докторске дисертације.

(место и датум)

М.П.

ДЕКАН _____ ФАКУЛТЕТ
