



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
НАУЧНО-НАСТАВНОМ ВЕЋУ

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-754/13 од 02.10.2019. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Милета Ераковића, под називом:

„ Ефекат трикалцијум силикатног цемента (биодентина) на зарастање хуманих периапексних лезија након ретроградног пуњења канала корена зуба: клиничка и експериментална студија“

На основу одлуке Већа, предложена је Комисија у саставу:

1. **Проф. др Александра Лукић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, председник;
2. **Проф. др Слободанка Митровић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија, члан;
3. **Доц. др Марија Бубало**, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Орална медицина, члан;
4. **Проф. др Иван Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија; Онкологија, члан;
5. **Проф. др Татјана Кањевац**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Дечја и превентивна стоматологија, члан.

На основу увида у приложену документацију, комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу следећи:

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Кандидат др Миле Ераковић, испуњава све формалне услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука у Крагујевцу за пријаву теме докторске дисертације.

2.1 Биографија Кандидата

Др. Миле Ераковић је рођен 24.12.1978. у Подгорици, Црна Гора. Стоматолошки факултет Универзитета у Београду је завршио 2004. године (шесту годину Факултета био је стипендиста Војске Србије). После положеног државног испита добио је запослење у Војномедицинском центру Карабурма у Београду, као професионално војно лице и постављен за начелника Кабинета за стоматологију. Од 2015.г. ради на Одељењу за оралну хирургију, Клинике за стоматологију ВМА. У току 2019.год. је завршио специјализацију из Оралне хирургије на Стоматолошком факултету у Београду, коју је уписао 2016.год. Исте године је уписао и докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Положио је све испите предвиђене планом и програмом студија, укључујући и усмени докторски испит. До сада је објавио 2 рада у међународним часописима као први аутор и коаутор.

2.2 Наслов, предмет и хипотезе докторске дисертације

Наслов: „Ефекат трикалцијум силикатног цемента (Биодентина) на зарастање хуманих периапексних лезија након ретроградног пуњења канала корена зуба: клиничка и експериментална студија“

Предмет: Предмет овог истраживања је процена ефикасности Биодентина, примењеног код ретроградног пуњења канала корена зуба, у зарастању хуманих периапексних лезија и испитивање механизма укључених у ове процесе кроз комбиновану клиничку и експерименталну студију. Други циљ је испитивање механизма којима Биодентин поспешује регенерацију периапексног ткива кроз експерименталну *in vitro* студију на инфламацијским ћелијама изолованих из периапексних лезија као и на мезенхималним стромалним маичним ћелијама успостављених у култури из хуманог периапексног ткива. Ефикасност Биодентина у процесима репарације периапексног ткива биће поређена са амалгамом, стандардним материјалом за оптурацију канала корена зуба, као контролног материјала.

Хипотезе:

1. Биодентин, примењен за ретроградно пуњења канала корена зуба, успешније поспешује зарастање периапексног ткива у односу на амалгам, процењивано на основу клиничких и радиолошких показатеља.
2. Успешније зарастање периапексних лезија под утицајем Биодентина у односу на амалгам је последица његове боље биокомпатибилности, односно активације ћелија периапексних лезија на већу продукцију антиинфламацијских и остеопротективних цитокина уз истовремену инхибицију стварања проинфламацијских и остеолитичких медијатора.
3. Биодентин поспешује зарастање периапексних лезија стимулацијом пролиферације и диференцијације мезенхимских стромалних матичних ћелија (MSC) из периапексних лезија у остеобласте.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат др Миле Ераковић је објавио рад у часопису са рецензијом (M23), у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Eraković M, Duka M, Bekić M, Milanović M, Tomić S, Vučević D, Čolić M. Anti-inflammatory effect of amalgam on periapical lesion cells in culture. *Vojnosanit Pregl.* 2019; doi: 10.2298/VSP190225043E

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Апикотомија је најчешћи поступак у ендодонтској хирургији који подразумева уклањање врха корена зуба заједно са периапексном лезијом. Примењује се уколико зуб није могуће излечити конзервативном ендодонтском терапијом. Након одстрањења периапексне лезије, најзначајнији корак у ендодонтској хирургији представља потпуно оптурирање канала корена зуба његовим ретроградним пуњењем, да би се спречио даљи продор микроорганизама. На тај начин се омогућује зарастање периапексне лезије и регенерација коштаног ткива. До сада најчешће коришћени материјали за ову намену су: амалгам, глас-јономер цементи, цинк оксид еугенол цементи ојачани полиметил-метакрилатом или супер етокси бензоичном киселином и минерал триокси агрегати (МТА). Ни један од њих није идеалан. Амалгам је најстарији и најшире употребљаван материјал због лаког руковања, дугог трајања, непропусности за рендгенске зраке и ниске цене. Међутим, сумња се у његову биокompatibilност, боји зубе, а нема ни доказа да стимулише остеогену диференцијацију. За разлику од њега, МТА је биорегенеративни материјал. Недостатак му је дуго време стврдњавања (и до неколико сати) и тешкоће при манипулацији. Ове нежељене особине МТА су превазиђене развојем нових материјала сличног састава, од којих је најзначајнији Биодентин. Главну компоненту праха Биодентина чини трикалцијум силикат уз додатак калцијум карбоната и цирконијум диоксида. Течни део представља раствор калцијум хлорида и вода-редукујућег агенса. У поређењу са другим цементима на бази калцијума, овај материјал има брже време везивања, и боље механичке карактеристике везивања. Такође се наглашава и његова биокompatibilност. До сада познате индикације за клиничку употребу Биодентина су: код испуна; као дентинског заменика; код директног и индиректног прекривања пулпе; прекривања перфорација; биопулшотомије; интерних и екстерних ресорпција; ретроградне оптурације корена канала зуба и апексификације. Резултати повољног ефекта Биодентина код зарастања периапексних лезија су до сада објављени као прикази неколико случајева. Због тога постоји потреба да се клинички ефекат Биодентина детаљније проучи кроз адекватну рандомизовану клиничку студију и објасне механизми његовог деловања.

2.5. Значај и циљ студије

Значај ове студије је добијање података о ефикасности Биодентина у зарастању периапексне лезије након апикотомије и испитивање механизма којим овај нови трикалцијум цементни материјал поспешује остерегенеративне процесе на генском нивоу и нивоу равнотеже унутар локалне цитокинске мреже.

Основни циљеви ове студије су двојаки. Примарни циљ је клиничка и радиографска процена ефикасности Биодентина, примењеног за ретроградно пуњење канала корена зуба, у зарастању хуманих периапексних лезија. Други циљ је испитивање механизма којима Биодентин поспешује регенерацију периапексног ткива кроз експерименталну *in vitro* студију на ћелијама изолованих из периапексних лезија. Ефикасност Биодентина у процесима репарације периапексног ткива биће поређена са амалгамом, стандардним материјалом за оптурацију канала корена зуба, као контролног материјала. У складу са општим циљевима постављени су следећи **конкретни циљеви** истраживања:

- 1) Упоредити ефикасност Биодентина и амалгама у зарастању периапексних лезија након ретроградног пуњења канала корена зуба кроз рандомизовану клиничку студију, праћењем клиничких и радиографских показатеља шест месеци након апикотомије.
- 2) Испитати и упоредити цитотоксичност Биодентина и амалгама на стандардном моделу L929 ћелија (на основу препорука ISO-10993-5) и ћелијама изолованих из хуманих периапексних лезија.
- 3) Испитати и упоредити ефекат Биодентина и амалгама на продукцију проинфламацијских цитокина и хемокина (IL-1 β , IL-6, TNF- α ; IL-8), цитокина Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4), Th17 (IL-17A) и Treg ћелија (IL-10, TGF β), остеодеструктивног (RANKL) и остеопротективног (OPG) биомолекула у култивисаним ћелијама периапексних лезија.
- 4) Изоловати, пропагирати и окарактерисати MSC из периапексних лезија на основу њихове клоногености, фенотипских својстава и способности диференцијације у остеобласте, адипоците и хондробласте.
- 5) Испитати и упоредити ефекат Биодентина и амалгама на пролиферативна својства MSC из периапексних лезија.
- 6) Испитати и упоредити ефекат Биодентина и амалгама на потенцијал диференцијације MSC добијених из периапексних лезија у остеобласте на нивоу експресије гена, продукције алкалне фосфатазе и способности формирања калцијумских минералних језгара у култури.

2.6 Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Иако се тврди да је Биодентин биокомпатибилни материјал, досадашње студије цитотоксичности нису у потпуности поштовале захтеве стандарда ISO-10993-5. Наиме, свеже припремљен Биодентин отпушта велики број честица калцијумових и силицијумових једињења у воду и биолошке течности. Међутим, у до сада спровођеним индиректним тестовима цитотоксичности ослобођене честице Биодентина су по правилу

уклањане фитрирањем. Због тога је неопходно да се цитотоксични потенцијал Биодентина адекватно провери, јер ослобођене честице могу имати другачији ефекат у односу на солубилну фракцију. У периапексним лезијама се налази велики број фагоцита, а фагоцитоване честице, осим што могу бити цитотоксичне, могу различито активисати фагоците односно покренути или супримирати запаљенске реакције. У литератури за сада нема података о утицају Биодентина на ове процесе.

Посебно својство Биодентина је његова способност стимулације диференцијације MSC. То је показано за MSC зубне пулпе, које се под утицајем овог материјала могу диферентовати у одонтобласте и остеобласте. Слично својство је такође недавно показано и за друге трикалцијум силикатне цемента на моделу MSC из костне сржи. Обзиром да се од Биодентина у ендодонтској хирургији очекује да стимулише коштано зарастање, веома је битно да се његов остеогени потенцијал испита *in vitro* на моделу MSC успостављених из периапексних лезија. Истраживања групе аутора из ВМА, Београд, показују да ове ћелије имају фенотипска својства MSC периодонталног лигамента али и неке специфичности, које су највероватније последица инфламацијског окружења у коме се налазе, па самим тим представљају најприближнији модел за изучавање остеогеног потенцијала Биодентина *in vivo*.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

Предложено истраживање ће бити комбицинација клиничке рандомизоване проспективне студије и експерименталне студије на материјалу хуманог порекла.

2.7.2. Популација која се истражује

Овим истраживањем биће обухваћени пацијенти са периапексним лезијама на једнокореним зубима код којих је индикована примарна ендодонтска хирургија у Одељењу за оралну хирургију, Клинике за стоматологију, Војномедицинске академије (ВМА) у Београду. Испитаници ће бити оба пола, старости од 18 до 70 година.

2.7.3. Узорковање

Дијагноза периапексних лезија биће постављана на основу стандардних клиничких и радиографских параметара. Испитаници ће пре апикотомије бити разврстани методом случајног избора на експерименталну и контролну групу. Експерименталну групу ће чинити испитаници код којих ће се за ретроградну пуњење канала корена зуба користити Биодентин. Контролну групу ће чинити испитаници код којих ће бити примењен амалгам, стандардни материјал за ретроградно пуњење канала корена зуба. Рандомизација у експерименталну и контролну групу ће се вршити помоћу таблице случајних бројева која ће бити генерисана компјутерски у програму Excell. У овом истраживању и пацијентима и истраживачима биће позната врста примењеног материјала. Испитаници ће потписати

информисани пристанак за укључење у студију након детаљног објашњења циља и значаја студије, а истраживање је одобрено од стране Етичког комитета ВМА.

Критеријуми за укључење у студију: присуство јасно ограничених процеса већих димензија на врху једнокорених зуба, окарактерисаних на основу клиничких и радиографских критеријума као периапексне лезије, а које се не могу решити класичном ендодонтском терапијом. Код свих испитаника биће индикована ретроградна оптурација канала корена зуба.

Критеријуми за искључење испитаника из студије: могућност конвенционалне ендодонтске терапије; угроженост анатомских структура (близина максиларног синуса и нервних снопова); немогућност приступа и лоша видљивост лезија; неповољан однос клиничке круне и корена зуба; тешко здравствено стање пацијента; акутне инфективне болести; екстремно уплашени и узнемирени пацијенти; акутна обољења десни; тешке форме пародонтопатије; велика ресорпција виличне кости; изузетно лоша орална хигијена; присуство обимних меких и тврдих наслага. Додатни критеријуми за искључење када ће се периапексне лезије користити за *in vitro* експерименте биће пацијенти који су у последњих месец дана примали антиинфламацијске, имуномодулацијске и антибиотске лекове.

2.7.4. Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле за оба типа студије биће: Биодентин, амалгам, ретроградно пуњење канала корена зуба. Независне варијабле за експерименталну студију биће кондиционирани медијуми (екстракти, елуати) припремљени од Биодентина и амалгама. Зависне варијабле за клиничку студију биће клинички и радиографски параметри. За експерименталну студију зависне варијабле биће: метаболичка активност ћелија, апоптоза, некроза, пролиферација ћелија, продукција цитокина, остеобластна диференцијација MSC. У даљем тексту је дата сажета методологија истраживања са најзначајнијим карактеристикама ових варијабли.

Материјали за ретроградно пуњење канала корена зуба

Биодентин (Biodentine, SEPTODONT, Saint-Maur-des-fossés Cedex, Француска) биће припремљен према упутству произвођача мешањем праха материјала из капсуле са течномшћу у амалгаматору у трајању од 30 секунди брзином од око 4000 обртаја у минути. После очвршћивања у трајању од 12 минута материјал се вади из калупа и спреман је за коришћење. Амалгам (EKSTRACAP® non gama 2, Галеника, Београд) биће припремљен према упутству произвођача мешањем легуре (маса 0.360g) са живом (маса 0.400g). Један грам легуре EKSTRACAP садржи сребро (500mg), калај (299mg) и бакар (201mg).

Припрема кондиционираних медијума од амалгама и Биодентина

Кондиционирани медијуми од амалгама и Биодентина биће коришћени за *in vitro* испитивања. Биће припремљени према упутству ISO-1093-12 на тај начин што ће амалгам,

односно Биодентин, бити уроњени у епрувете са стерилним медијумом (за културу MSC) или епрувете са RPMI медијумом (за културе осталих ћелија). Биће коришћен кондициониран медијум од свеже направљених материјала као и од материјала који ће бити очврснути у току две недеље држања на собној температури под стерилним условима. Однос масе материјала у односу на запремину медијума биће 0.2g/ml. Кондиционирање (екстракција) ће трајати 3 дана у инкубатору за ћелијске културе на 37°C. Након тога медијуми ће бити сакупљени, одредиће им се рН, а након тога подесити да буде 7.4. До коришћења биће чувани стерилно у фрижидеру.

КЛИНИЧКА СТУДИЈА

Ретроградно пуњење канала корена зуба

Ретроградно пуњење канала корена зуба биће спроведено у току апикотомије. Апикотомија ће бити урађена у локалној инфилтрационој анестезији, коришћењем хируршке лупе. Сажети кораци у оперативном поступку биће следећи: апликација локалног анестетика (2% раствора Септанест адреналина и Артикаин епинефрина), подизање мукопериосталног режња по методи Novak-Peter, трепанација кости у пројекцији врха корена зуба, уклањање периапексне лезије помоћу кирете, одстрањење врха корена зуба, ретропрепарација апекса корена зуба до дубине 3mm, апликација свежеприпремљеног материјала за ретроградну оптурацију канала апекса корена, испирање ране физиолошким раствором (код примене амалгама), успостављање хемостазе, враћање мукопериосталног режња у првобитно стање, сатура режња појединачним шавовима (свилени хируршки конач 4/0). Постоперативно: стандардна интраорална радиографија (Carestream CS 2200 Roentgen apparatus; Carestream Dental, Atlanta, GA, USA), перорална антибиотска терапија, уклањање хируршког конца након 7-10 дана. Имајући у виду публиковане податке да исход ендодонтског хируршког лечења пресудно зависи од искуства клиничара, предвиђа се да апикотомију врши ментор уз асистенцију докторанта.

Радиографски показатељи зарастања периапексне лезије

Радиографски показатељи зарастања периапексне лезије биће класификовани на основу критеријума Rud и сар.

- 1. Комплетно зарастање** кога карактерише: потпуно формирање ламине дуре око врха корена зуба, нормалан или лако проширен периодонтални простор али не више него двоструко у односу на незахваћени део корена зуба, потпуна регенерација кости, иако њена густина и структурисаност не морају бити исти као код незахваћеног дела кости.
- 2. Некомплетно зарастање** кога одликује: смањена рентгенска транспаренција са знацима коштаног зарастања на периферији зоне разређења неправилног облика, или демаркирана комплетном коштаном линијом, веза између зоне разређења и периодонталног простора је ангуларна .

3. **Неизвесно зарастање** : Смањена зона рентгенске транспаренције чија је ширина двоструко већа у односу на периодонтални простор, ограничена је чврстом ламином , има циркуларну или семициркуларну периферију. Може бити локализована симетрично око врха корена у облику проужетка периодонталног простора.

4. **Незадовољавајуће зарастање**: нема промена у степену рентгенске транспарентности или је она чак повећана у односу на радиорафије направљене непосредно после апикотомије.

Радиографску анализу ће радити независно ментор и докторант. У случају неслагања резултата предност ће се дати резултатима ментора, а у извесним случајевима може бити консултован и трећи евалуатор (специјалиста радиолог)

Клинички показатељи успеха апикотомије

Клинички показатељи успеха апикотомије биће процењивани на основу критеријума Mikkonen-а и сар.

1. **Потпуни успех**: одсуство бола, отока или фистула
2. **Неизвесан успех**: радиографски показатељи деструкције костију и присуство/одсуство клиничких симптома
3. **Неуспех**: радиографски показатељи деструкције костију, ресорпција корена и присуство клиничких симптома

Обједињени клинички и радиографски критеријуми

Процена зарастања периапексних лезија и успеха ендодонског хируршког лечења на основу обједињених клиничких и радиографских критеријума биће вршено на основу класификације von Arx-а и Kurt-а.

1. **Потпуни успех**: регенерација костију већа или једнака 90%, одсуство бола, отока или фистула
 2. **Побољшање**: регенерација костију између 50% и 90%, одсуство бола, отока или фистула
 3. **Неуспех**: регенерација костију мања од 50%, присуство клиничких симптома
- Анализу свих клиничких параметара вршиће заједно ментор и докторант.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА СТУДИЈА

Изолација ћелија из периапексних лезија

Ћелије ће бити изоловане из периапексних лезија након апикотомије. У том циљу киретирани материјал биће одмах пренет у бочице са медијумом за културу (RPMI медијум са додатком 10% феталног телећег серума и коктела антибиотика и антимицотика), а затим ће материјал бити транспортован у лабораторију. Изолација ћелија из лезија биће урађена помоћу коктела ензима колагеназе и ДНК-азе. Вијабилност ћелија биће одређена помоћу боје Трипан плаво. Ћелије ће се користити за: проучавање цитотоксичности амалгама и Биодентина; испитивање продукције цитокина у култури под утицајем ових материјала; успостављање култура MSC.

Успостављање култура MSC

Културе MSC биће успостављене дуготрајном култивацијом ћелија из периапексних лезија у присуству селективног комерцијалног медијума за MSC. Након четврте пасаже биће одређен фенотип успостављених ћелијских линија, испитан њихов клоногени потенцијал и потенцијал диференцијације у остеобласте, адипоците и хондробласте.

Способност формирања колонија - CFU-F тест

Тест способности формирања колонија биће рађен тако што ће MSC бити засађиване (25, 50, 100 или 200 ћелија по базену плоче са 6 места) у медијуму. Након 14-тог дана теста, колоније ће бити обојене MGG методом (May Grünwald-Giemsa) а затим избројане помоћу светлосног микроскопа, при чему ће се колонијом сматрати група од најмање 50 ћелија у блиском контакту. Процент клоногених MSC биће одређен према формули $N_c/N_t \times 100$ (N_c , број колонија; N_t , број засађених ћелија по базену).

Фенотипска анализа MSC

Анализа фенотипских карактеристика ћелија из култура обавиће се проточном цитофлуориметријом (*CellFlow CUBE6, PARTEC, Немачка*), помоћу комерцијалних моноклонских антитела реактивних са CD73, CD90, CD105, CD166, CD146, CD45, CD14, STRO-1 и SSEA4, обележених различитим флуоресцентним бојама. Ћелије из културе ће бити окарактерисане фенотипски као MSC ако у преко 90% испољавају CD73, CD90, и CD105 уз одсуство експресије CD45 и CD14.

Диференцијација MSC

Диференцијација MSC у остеобласте биће индукована култивацијом ћелија у комерцијалном медијуму за остеобласте у току 21 дана. Остеобласти ће се бити идентификовани након бојења култура са Ализарин црвеним. Диференцијација MSC у адипоците ће се вршити култивацијом ћелија у адипогеном медијуму у току две недеље а идентификација адипоцита ће се вршити бојењем са Oil црвеним. За хондрогену диференцијацију ћелије ће бити култивисане у облику пелета у полипропиленским спруветама у току 4 недеље у комерцијалном хондрогеном медијуму. После периода диференцијације пелет ће бити укалушљен, смрзнут а затим исечен на криотому. Хондробласти ће бити идентификовани бојењем са Alcian плавим.

Тестови цитотоксичности

Цитотоксичност ће бити процењивана на основу стандарда ISO-10993-5:2009, основног теста биокомпатибилности. Варијабле које ће се мерити су вијабилност и метаболичка активност ћелија (стандардних L929 ћелија, ћелија екстрахованих из периапексних лезија и MSC успостављених из периапексних лезија). Вијабилност ће бити процењивана на основу процента мртвих ћелија у култури након бојења са 1% раствором Трипан плавог. Метаболичка активност ће бити одређена помоћу МТТ (3-(4,5-dimethylthiazol2-yl)-2,5-

diphenyl tetrazolium bromide) теста, који мери активност ензима сукцинат дехидрогенезе у митохондријама вијабилних ћелија. Поступци су детаљно прописани горе наведеним ISO стандардом.

Тест апоптозе и некрозе

Апоптоза ћелија биће одређивана помоћу Annexin-V FITC/пропидијум јодида (PI) комплета (BD Bioscience) и проточне цитометрије (CellFlow CUBE6, PARTEC), а добијени дигитални подаци биће обрађени помоћу програмског софтвера FCS Express 6 RUO Edition (6.00.0053).

Методe за детекцију цитокина

За детекцију цитокина у супернатантима култура ћелија изолованих из периапексних лезија (TGF- β , RANKL i OPG) биће коришћена комерцијална сендвич ELISA где су за полистиренске плоче везана одговарајућа антицитокинска антитета. Поступак анализе биће прилагођен упутству произвођача, при чему ће концентрација цитокина бити израчуната на основу стандардних кривих. Криве ће бити успостављене на основу познатих концентрација цитокина. За детекцију осталих цитокина (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, TNF- α , IFN- γ) биће коришћена метода са имунокуглицама и проточна цитометрија (flow cytometry microbeads технологија). Концентрација цитокина биће одређена на основу софтверског програма уз помоћ познатих концентрација цитокина у стандарду.

Модулацијски ефекат Биодентина и амалгама на остеобластну диференцијацију MSC

Ефекат Биодентина и амалгама на остеобластну диференцијацију MSC биће процењиван индиректно тестирањем кондиционираног медијума ових материјала. Користиће се прва нецитотоксична концентрација медијума и у односу на њу четвороструко мања концентрација. MSC ћелије, успостављене из периапексних лезија, биће култивисане у плочама са 6 базена до 21 дана. За анализу гена карактеристичних за остеобластну диференцијацију културе ће бити сакупљане после два дана (анализа раних маркера диференцијације) и 14 дана (анализа касних маркера диференцијације). За анализу минерализације и алкалне фосфатазе биће коришћене ћелије одржаване у култури 21 дан.

У циљу одређивања експресије гена укључених у остеобластну диференцијацију MSC биће коришћена метода ланчаног умножавања ДНК у реалном времену (Real-time PCR). Из ћелијског пелета, који ће бити сакупљен центрифугирањем MSC, биће изолована укупна RNK помоћу Тризол реагенса. Комплементарна ДНК биће синтетисана помоћу комерцијалног комплета за реверзну транскрипциону реакцију према упутству произвођача. Real-time PCR биће урађен на апарату StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA). Биће коришћени прајмери за гене карактеристичне за рану или касну фазу остеобластне диференцијације *RUNX2* (главни коштан матриксни ген), *BGLAP* (коштани гама карбоксиглутаматни протеин), *COL1A1* (ген за тип 1 колагена), *DMP-1* (дентински матриксни кисели фосфопротеин

1), *SOST* (склеростин), *SP7* (osterix), *ALP* (алкална фосфатаза), *BSP* (коштани сијалопротеин), *BMP* (коштани морфогени протеин), *OP* (остеопонтин), *OC* (остеокалцин) и *GAPDH* (контролни ген).

Активности алкалне фосфатазе биће одређивана из лизата MSC колориметријском методом помоћу комерцијалног комплета а према упутству произвођача.

Тест пролиферације

Тест пролиферације MSC под утицајем различитих концентрација кондиционираног медијума припремљених од свежег и отврднутог амалгама и Биодентина биће урађен помоћу МТТ теста како је описано код цитотоксичности. Додатно ће бити коришћен тест уградње ³Н-тимидина. MSC ће бити култивисане у полистиренским плочама од 96 базена у трипликатима у присуству различитих разблажења кондиционираног медијума у току 3 дана. Степен пролиферације биће процењиван на основу метаболичке активности култура или количине уграђеног ³Н-тимидина у поређењу са контролом (пролиферација ћелија у контролном медијуму).

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Потребна величина узорка је израчуната коришћењем програма G power 3.1.9.2. С обзиром да ће се за статистичку анализу код клиничке студије користити χ -квадрат тест у програму је изабрана опција „Табеле контингенције“ (енг. Goodness-of-fit tests: Contingency tables). Потребни параметри за израчунавање величине узорка су: величина ефекта (Effect size): 0,33; алфа грешка (α): 0,05; снага студије (1- β грешка): 0,8. Величина ефекта (Effect size) је израчуната на основу једне студије спроведене на 278 пацијената у којој је вршена евалуација критеријума за процену успешности зарастања, када је за ретроградно пуњење канала корена зуба коришћен сребро-амалгам. Процент укупне успешности после 12 месеци, процењиван на основу комбинације радиографских и клиничких параметара је износио 62%. Наши прелиминарни резултати на основу ретроспективне анализе података за амалгам су врло слични. Такође нису уочене битније разлике у већини испитиваних параметара између 6 и 12 месеци праћења. Пошто за Биодентин нема података у литератури, његова боља ефикасност у зарастању периапексних лезија у односу на амалгам, која је садржана у хипотези, је процењивана у односу на друге биостимулацијске материјале, посебно МТА. Ефикасност МТА код ретроградног пуњења корена у ендодонтској хирургији је у неким студијама износила и више од 90%. Пошто у раду са Биодентином немамо искуства пошли смо од претпоставке да би минимално бољи ефекат овог материјала у односу на амалгам, који би био клинички прихватљив, износио 70% успешности. У прилог ове хипотезе треба узети у обзир и податак да ће се евалуација ефикасности вршити после 6 месеци. На основу датих претпостављених параметара израчунато је да је за ову студију потребно 27 испитаника. Ако се узме у обзир и могућа стопа губитка у праћењу пацијената од 10%, коначан број испитаника би био 30, који би били рандомизовани у две групе од по 15 испитаника. Ако се у прелиминарним

испитивањима покаже да је ефикасност Биодентина већа у том случају број испитаника по групама би био мањи.

За *in vitro* студију број ћелијских култура ће износити од 5 (MSC) до 10 (културе ћелија из периапексних лезија). Број је одређен на основу детаљне претраге литературе. Мањи број култура MSC се објашњава униформнијим биолошким одговором ових ћелија у односу на ћелије изоловане из периапексних лезија.

2.7.6. Статистичка обрада података

Од метода дескриптивне статистике биће примењене стандардне мере централне тенденције и варијабилитета, а процена нормалности дистрибуције вршиће се Kolmogorov Smirnov и Shapiro Wilk тестом. У зависности од расподеле користиће се одговарајући тестови корелације (Pearson тест линеарне корелације или Spearman тест корелације ранга), а за поређење између група Studentt тест или Mann-Whitney U тест у случајевима неправилне дистрибуције података. За поређење разлика између категоријских варијабли биће коришћен χ -квадрат тест. Сви подаци биће обрађени у статистичким програмима: SPSS v 21 и GraphPad Prism v 5.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да резултати ове комплексне студије потврде хипотезу да је Биодентин, примењен за ретроградно пуњење канала корена зуба, ефикаснији у зарастању периапексних лезија у односу на амалгам. На овај начин ће се добити подаци који могу бити веома корисни за процену ефикасности Биодентинау дужем временском периоду, када се генерално могу и донети дефинитивни закључци. Ова студија такође може помоћи у стицању драгоценог клиничког искуства у раду са Биодентином, што отвара перспективу за његову ширу клиничку примену у ендодонтској хирургији. Многе непознанице везане за биокомпатибилност и механизме деловања Биодентина, посебно са аспекта ефекта на инфламацију и биорегенерацију костију, се такође могу решити кроз предвиђене експерименте, обзиром да се ни једна до сада спроведена студија није бавила ефектима микрочестица које се из Биодентина ослобађају у воденим растворима.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Ова дисертација је осмишљена као комбинација клиничке и експерименталне студије на материјалу хуманог порекла. Кроз рандомизовану проспективну клиничку студију циљ је да се докаже да је ефикасност Биодентина у зарастању периапексних лезија, након ретроградног пуњења канала корена зуба, значајно боља у односу на стандардни материјал (амалгам), чија се примена задржала углавном у само у неразвијеним земљама. Експериментална студија би требало да покаже да је повољни ефекат Биодентина на периапексно ткиво узроковано смањењем инфламације и стимулацијом остеогене диференцијације MSC. Тиме ово истраживање чини јединствену истраживачку целину

3. Предлог ментора и његова компетентност

За ментора се предлаже проф др Милош Дука, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Орална медицина. Проф. др Милош Дука је дугододишњи специјалиста из Оралне хирургије који је до сада био ментор великом броју доктора стоматологије на специјализацији из ове клиничке гране стоматологије. Без његовог директног учешћа у овом пројекту није могућ његов успешан завршетак обзиром да се за ову врсту истраживања тражи велико стручно искуство. Проф. др Дука поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања, има публиковане радове из ове области и испуњава услове за ментора докторских дисертација у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

Селектоване публикације:

1. **Eraković M**, Duka M, Bekić M, Milanović M, Tomić S, Vučević D, Čolić M. Anti-inflammatory effect of amalgam on periapical lesion cells in culture. *Vojnosanit Pregl.* 2019; doi: 10.2298/VSP190225043E
2. **Duka M**, Eraković M, Dolićanin Z, Stefanović D, Čolić M. Production of Soluble Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand and Osteoprotegerin by Apical Periodontitis Cells in Culture and Their Modulation by Cytokines. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:8325380.
3. **Duka M**, Gazivoda D, Marković M, Majstorović I, Tatomirović Ž, Mihajlović D, Čolić M. Production of immunoregulatory cytokines in clinically asymptomatic periapical lesions depends on the size of lesions. *Vojnosanit Pregl.* 2018; doi: 10.2298/VSP170208036D
4. Marković M, Tomić S, Đokić J, Mihajlović D, Vučević D, Gazivoda Dn, **Duka M**, Čolić M. Mesenchymal stem cells from periapical lesions modulate cytokine production by local immune cells. *Vojnosanit Pregl.* 2018;75(5):473-480
5. Mihailović B, **Duka M**, Lazić Z, Mladenović D, Vujčić B, Miladinović M. Computer-aided technologies in diagnostics and therapy of impacted teeth. *Vojnosanit Pregl.* 2011;68(4):353-8

4. Научна област дисертације

Медицина, Стоматологија

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Александра Лукић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, председник

2. **Проф. др Слободанка Митровић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија, члан
3. **Доц. др Марија Бубало**, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Орална медицина, члан
4. **Проф. др Иван Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија; Онкологија, члан
5. **Проф. др Татјана Кањевац**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Дечја и превентивна стоматологија, члан

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу увида у досадашњи научно-истраживачки рад и публиковане радове кандидата Милета Ераковића, Комисија закључује да кандидат испуњава услове за одобрење теме и израду докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан а оригиналне хипотезе се могу тестирати коришћењем јасно дефинисаном савременом методологијом. Ради се о оргиналном научном раду чији је циљ да се испита терапијска ефикасност трикалцијум силикатног цемента (биодентина) у процесима зарастања периапексних лезија након ретроградног пуњења канала корена зуба. Објашњење механизма који су укључени у ове процесе кроз испитивање цитотоксичности, цитокинског профила ћелија периапексних лезија, пролиферативног и диференцијационог потенцијала локалних MSC у правцу остеобласта представљају оригинални истраживачки концепт.

Комисија сматра да ће предложена докторска теза кандидата Милета Ераковића имати научни и практични значај и да ће добијени резултати допринети проширењу индикација за клиничку примену Биодентина а објашњење механизма његових деловања на молекуларном нивоу има фундаментални научни значај.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата **Милета Ераковића** под називом: **„Ефекат трикалцијум силикатног цемента (биодентина) на зарастање хуманих периапексних лезија након ретроградног пуњења канала корена зуба: клиничка и експериментална студија“** и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

1. Проф. др Александра Лукић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, председник

Александра Лукић

2. Проф. др Слободанка Митровић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија, члан

Слободанка Митровић

3. Доц. др Марија Бубало, доцент Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Орална медицина, члан

Марија Бубало

4. Проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија; Онкологија, члан

Иван Јовановић

5. Проф. др Татјана Кањевац, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Дечја и превентивна стоматологија, члан

Татјана Кањевац