



Универзитет у Београду  
**СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ**

Београд, Улица др Суботића бр. 8, тел: 2685-288

e-mail: stomfak@rcub.bg.ac.rs

web: [www.stomf.bg.ac.rs](http://www.stomf.bg.ac.rs)

**ЕТИЧКИ ОДБОР**



БР-36/11

16-04-2024

На молбу др Милене Милановић, Етички одбор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, на електронској седници одржаној дана 10.04.2024. године, даје

**САГЛАСНОСТ**

др Милени Милановић за спровођење истраживања у оквиру израде докторске дисертације под називом:

**„Испитивање утицаја различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи на формирање биофилма, адхезију и вијабилност ћелија хумане гингиве и вредности микротврдоће глеђи”**

и у друге сврхе се не може користити.

Београд,

15.04.2024.



**ПРЕДСЕДНИК ЕТИЧКОГ ОДБОРА**

/Проф. др Наташа Николић Јакоба/

**ПРИЈАВА  
ТЕМЕ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

1. **Име (име родитеља) и презиме: Милена (Ружица) Милановић**
2. **Студијски програм: Базична и клиничка истраживања у стоматологији**
3. **Школска година уписа на студијски програм: 2018/2019.**
4. **Број индекса: 4004/2018**
5. **Претходно образовање кандидата (основне и мастер студије):  
Интегрисане основне и мастер академске студије, Стоматолошки факултет Универзитета у Београду**
6. **Радни наслов теме докторске дисертације:  
„Испитивање утицаја различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи на формирање биофилма, адхезију и вијабилност ћелија хумане гингиве и вредности микротврдоће глеђи“**
7. **Научне области које обухвата тема докторске дисертације:  
Стоматолошке науке**
8. **Контакти (телефон, мобилни телефон, e-mail):**  
Телефон :  
e-mail:

**Прилози:**

- Образложење теме (научна област из које је тема, предмет научног истраживања, основне хипотезе, циљ истраживања и очекиване резултате, методе истраживања и списак стручне литературе која ће се користити)
- Биографија кандидата
- Библиографија кандидата
- Изјава да предложеној тему кандидат није пријављивао на другој високошколској установи у земљи или иностранству
- Мишљење одговарајућих етичких комитета о етичким аспектима истраживања, уколико је предвиђено посебним прописима.

**Подносилац пријаве**

---

# **Образложење теме докторске дисертације**

**„Испитивање утицаја различитих третмана почетне каријесне лезије  
глеђи на формирање биофилма, адхезију и вијабилност ћелија хумане  
гингиве и вредности микротврдоће глеђи“**

**Кандидат: др Милена Милановић**

- Предмет истраживања
- Циљеви и хипотеза истраживања
- Материјал и метод
- Очекивани резултати истраживања
- Потенцијални научни допринос и клинички значај истраживања
- Референце

## ПРЕДМЕТ ИСТРАЖИВАЊА

Каријес представља један од највећих јавно-здравствених проблема са којим се сусрећемо. То је потврђено последњим извештајем Глобалне оптерећености обољењима (*Global Burden of Disease*). Процењује се да око 2,5 милијарде људи има каријес сталних зуба, а више од 530 милиона деце широм света има несаниране каријесне лезије млечних зуба (1, 2). Почетне каријесне лезије глеђи, познате као беле мрље, представљају први клинички знак каријесног процеса. У усној дупљи се непрекидно одвијају динамички процеси измене јона из зубне пелikle, биофилма и оралних флуида са једне стране и површине глеђи са друге стране. Будући да је глеђ аваскуларно и ацелуларно ткиво, интактност своје површине одржава равнотежом процеса деминерализације и реминерализације. Уколико се исцрпи хомеостатски механизми пљувачке и равнотежа се поремети у корист деминерализације, долази до формирања почетних каријесних лезија на глеђи прекривеној метаболички активним биофилмом. Деминерализација у потповршинском слоју глеђи доводи до настанка порозитета, што утиче на оптичке карактеристике глеђи. Ове порозне структуре садрже више ваздуха (индекс преламања светлости 1) и воде (вредност индекса 1,33). Услед поменутих разлика у вредности индекса преламања светлости, почетне каријесне лезије глеђи се виде као кредасто беле површине које се јасно уочавају у односу на околну здраву глеђ (3, 4).

Глеђ је, након ницања зуба, изложена оралној средини и при томе површински слој глеђи очвршћава депонованем минерала из пљувачке у њену порозну структуру (секундарна матурација глеђи). Овај процес, који је у суштини реминерализација, је изразито динамичан. Период мешовите дентиције је специфичан будући да се истовремено дешава више процеса у усној дупљи деце и представља изазован период за превентивне и дечје стоматологе.

Последњих деценија преваленца белих мрља се повећала. Неки аутори ово повећање доводе у везу са терапијом фиксним ортодонтским апаратима и сматрају да је очување оралног здравља у овим околностима изазов за стоматолога (5-7). Подаци из литературе указују да адолесценти представљају групу пацијената код којих је најчешће неопходан третман белих мрља (8). Уколико се не уоче правовремено, у реверзибилној фази, ове лезије ће напредовати и доћи ће до настанка кавитета на зубима. Такође, истраживања су показала да беле мрље на предњим зубима имају негативни психолошки ефекат код деце и адолесцената и утичу на њихов ниво самопоуздања (9-12).

Истовремено, након успешног третмана почетних каријесних лезија глеђи, запажено је побољшање квалитета живота и стања оралног здравља деце (13).

Савремена стоматологија је окренута максималном очувању зубних ткива и тежњи ка минималним интервенцијама. Неинвазивни и минимално инвазивни третмани су основа терапије почетних каријесних лезија глеђи чији је циљ заустављање каријесног процеса и подстицање реминерализације (7, 14, 15). Средства за реминерализацију са флуоридима, биоактивни препарати са аморфним калцијум фосфатом (*ACP*), казеин фосфопептидом (*CPP*) и калцијум силикати се често користе (16-20).

Лак са флуоридима и средства са казеин фосфопептидом – аморфним калцијум фосфатом уз правилно одржавање оралне хигијене и корекцију лоших навика у исхрани, су незаобилазни у терапији белих мрља (21, 22, 23). Ипак, неопходно је одређено време како би се остварила реминерализација почетних каријесних лезија глеђи и целокупни процес зависи од понашања пацијента и спровођења свих предложених превентивних мера. Један од потенцијалних недостатака је немогућност потпуног маскирања белих мрља (24).

Када се појавила идеја о инфилтрацији почетних каријесних лезија глеђи, истраживачи су спроводили различите студије, *in vivo* и *in vitro*, у циљу проналажења адекватног материјала (25-27). На основу добијених резултата, предложени су критеријуми које би требало да задовољи материјал за инфилтрацију: ниска вискозност, хидрофилност, антибактеријски ефекат, нетоксичност, прихватљив естетски исход третмана, могућност полимеризације (28). Испитивана је могућност коришћења заливача и адхезива, али истраживања су показала да не могу пенетрирати у дубље слојеве каријесне лезије глеђи и да долази до њихове дезинтеграције (29). Захваљујући низу нових истраживања, Парис и сарадници су развили савремени материјал који се не може лако дезинтегрисати, има могућност продирања у почетне каријесне лезије глеђи и заптивања порозитета (29, 30).

Сва ова истраживања, довела су до развоја микроинвазивног концепта као дела савременог приступа у терапији белих мрља. Подразумева инфилтрацију белих мрља нисковискозном композитном смолом (30, 31). Захваљујући дејству капиларних сила, ова смола инфилтрира лезију, попуњава поре настале процесом деминерализације у телу каријесне лезије и на тај начин формира дифузиону баријеру унутар саме лезије глеђи. Захваљујући вредности индекса преламања светлости инфилтрационе смоле (1, 46), која

је слична здравој глеђи (1,62), долази до естетског побољшања изгледа беле мрље. Доступни подаци из литературе указују на успешно маскирање белих мрља и постизање жељеног терапијског ефекта након примене нисковискозних смола (32). Постиже се тзв. ефекат камелеона при чему се изглед почетне каријесне лезије глеђи усклађује са околним ткивом, тако да се избегава спровођење инвазивнијих терапијских метода. Међутим, у доступној научној литератури уочава се потреба за даљим испитивањем утицаја ових смола на друге карактеристике глеђи, као што је храпавост површине, микротврдоћа глеђи, дубина пенетрације (5).

Према савременој дефиницији, каријес представља микроорганизмима и ферментабилним угљеним хидратима посредовано, биофилм - зависно орално обољење. Пријемчивост микроорганизама за специфичне површине у усној дупљи и формирање биофилма на површини зуба и различитих материјала су веома важни у етиопатогенези каријеса, али и обољења потпорног апарата зуба. Велику пажњу истраживача последњих година привлачи синергистичко деловање кариогене бактерије *Streptococcus mutans* и опортунистичке гљивице *Candida albicans* (33). Ове интеракције су значајне у патогенези различитих оралних обољења, као што су каријес, периодонтитис, периимплантитис, орални карциноми (34). Сматра се да *Candida albicans* може имати значајну улогу у развоју каријеса захваљујући својој ацидогеној природи, могућности да формира биофилм, ферментише угљене хидрате и производи одређене ензиме (35). Већина студија показала је да *Candida albicans* може модификовати биофилм и повећати његову вирулентност и кариогеност (36-38). Доступна научна литература потврђује везу између ове гљивице и каријеса раног детињства (39). Посебно су важни резултати мета анализе који указују на повезаност веће преваленце каријеса и ове гљивице, како код деце и адолесцената (од 6 до 18 година), тако и код одраслих (14).

Резултати досадашњих истраживања указали су да локална апликација флуорида утиче на смањење адхезије *S. mutans* за површине зуба (21), као и да долази до смањене продукције киселих метаболита (16, 17). Међутим, мање података је доступно о утицају лака са флуоридима на адхезију бактерија на глеђ зуба (21). Флуориди остварују антимикробно дејство захваљујући ометању производње ензима глукозил-трансферазе. Овај ензим омогућава искоришћавање глукозе у биофилму и формирање екстраћелијских полисахарида, што даље доприноси повећаној акумулацији бактерија и њиховом међусобном повезивању. Према нашим сазнањима, нема доступних података о

утицају препарата са флуоридима, казеин фосфопептидом-аморфним калцијум фосфатом и инфилтрационе смоле на адхезију *C. albicans*.

Будући да се ова средства апликују на површину зуба и да су у директном контакту са оралним ткивима, потребно је потврдити и њихову биокомпатибилност. Приликом употребе сва ова средства долазе у контакт са оралним ткивима укључујући гингиву. Тако да, последично, може доћи до појаве запаљења, алергијских реакција или испољавања цитотоксичног дејства (18-21, 40). Лакови са флуоридима ослобађају јоне флуора, док *CPP-ACP* пасте јоне калцијума и фосфата. Када се апликују на површину зуба, гингива долази у непосредни контакт са самим материјалом, као и са ослобођеним јонима. Сматра се да код примене композитних смола, услед непотпуне полимеризације или деградације, може доћи до ослобађања компоненти које могу утицати на ткива која окружују зуб (41, 42). Стога, неопходно је да наведена средства буду у биолошком складу са оралном слузницом (43, 44). Постоји потреба за даљим истраживањем утицаја препарата са флуоридима и средстава са *CPP-ACP* на оралну мукозу, будући да су доступне студије дале различите резултате у зависности од концентрације активних јона (45). Према нашим сазнањима, нема доступних података о утицају инфилтрационе смоле на ћелије хумане гингиве.

## ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Основни циљ овог *in vitro* истраживања био би утврдити успешност примене различитих средстава која се користе у терапији почетних каријесних лезија глеђи и њихов утицај на одређене микроорганизме и ћелије гингиве.

Анализом проблема истраживања постављени су следећи ближи циљеви:

1. Испитати утицај различитих средстава која се користе у терапији почетних каријесних лезија глеђи на вредности микротвдоће глеђи;
2. Испитати утицај различитих средстава која се користе у терапији почетних каријесних лезија глеђи на формирање биофилма (*Streptococcus mutans*, *Candida albicans*);
3. Испитати утицај средстава која се користе у терапији почетних каријесних лезија глеђи на вијабилност и адхезију ћелија хумане гингиве (фибробласти);

4. Упоредити дубину пенетрације коришћених средстава у терапији почетних каријесних лезија глеђи помоћу скенинг електронског микроскопа (СЕМ).

## **РАДНА ХИПОТЕЗА ИСТРАЖИВАЊА**

### 1. Радна хипотеза истраживања у вези са испитивањем вредности микротврдоће глеђи:

Испитивани третмани почетне каријесне лезије глеђи (лак са флуоридима, паста са аморфним калцијум фосфатом казеин фосфопептидом и нисковискозна инфилтрациона смола) статистички значајно утичу на повећање микротврдоће глеђи у односу на вредности микротврдоће глеђи почетне каријесне лезије.

### 2. Радна хипотеза истраживања у вези са испитивањем формирања биофилма:

Постоји статистички значајна разлика у пријемчивости бактерије *Streptococcus mutans* и гљивице *Candida albicans* за интактну глеђ, површину глеђи почетних каријесних лезија и површину белих мрља након различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи (лак са флуоридима, паста са аморфним калцијум фосфатом казеин фосфопептидом и нисковискозна инфилтрациона смола).

### 3. Радна хипотеза истраживања у вези са испитивањем утицаја на хумане фибробласте гингиве:

Постоји статистички значајна разлика у адхезији и вијабилности ћелија хумане гингиве у присуству различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи (лак са флуоридима, паста са аморфним калцијум фосфатом казеин фосфопептидом и нисковискозна инфилтрациона смола).

## **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

У предложеном лабораторијском истраживању би били коришћени премолари екстраховани пацијентима узраста 12-18 година на Клиници за дечју и превентивну стоматологију Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. Родитељи/старатељи деце би били обавештени о природи и циљевима истраживања и тражила би се њихова писана сагласност за употребу зуба, без могућности генетичке анализе (у прилогу). У

делу истраживања би били коришћени хумани фибробласти добијени из узорка гингиве (величине 3x3x3 mm) током хируршке екстракције трећих сталних молара на Клиници за оралну хирургију Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. У овом делу истраживања било би укључено 6 системски здравих пацијената узраста 18-22 године који су претходно обавештени о истраживању и који су потписали информисани пристанак за учешће у истом (у прилогу).

Критеријуми за селекцију зуба (премолара) за истраживање би били: интактни први и други, горњи и доњи премолари чија је екстракција индикована због планиране ортодонтске терапије.

Критеријуми за искључење зуба (премолара) из истраживања: постојање морфолошких варијација, кредастих или тамних замућења, каријесних лезија, хипопластичних промена, трауматских дефеката или испуна на зубима.

Величина узорка би била одређена помоћу анализе *Power of Study* у програму *SPSS*.

#### Истраживање би обухватило четири засебна дела:

I – Испитивање микротврдоће gleђи;

II – Испитивање пријемчивости за формирање биофилма (*Streptococcus mutans*, *Candida albicans*);

III – Испитивање утицаја на ћелије хумане гингиве;

IV – Испитивање дубине пенетрације материјала методом скенинг електрон микроскопије (SEM).

У свакој од наведених целина, зуби би били разврстани у пет група методом случајног узорка:

**Група А** - Зуби са интактном површином gleђи;

**Група Б** - Зуби са артефицијалном почетном каријесном лезијом gleђи (белом мрљом);

**Група Ц** - Зуби са третираном почетном каријесном лезијом gleђи висококонцентрованим лаком са флуоридима;

**Група Д** - Зуби са третираном почетном каријесном лезијом глеђи пастом са аморфним калцијум фосфатом казеин фосфопептидом;

**Група Е** - Зуби са третираном почетном каријесном лезијом глеђи нисковискозном смолом.

### Формирање артефицијалних почетних каријесних лезија глеђи (белих мрља)

Овај део истраживања би био спроведен на Клиници за дечју и превентивну стоматологију и у Лабораторији за биохемију (ОЈ Институтски предмети) Стоматолошког факултета Универзитета у Београду.

Након екстракције, све површине зуба биле би очишћене од меких наслага и остатака периодонталног лигамента. Коренови зуба би били уклоњени сечењем дијамантским диском мале брзине у апарату *Isomet* (Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA), уз водено хлађење, у нивоу глеђно – цементне границе. Садржај круничне коморе пулпе би био уклоњен екскаватором, а комора пулпе попуњена течним композитом (Flow-It ALC, Pentron).

На букалним и оралним површинама круница премолара, формирао би се прозор величине 4 x 4 mm, лепљењем адхезивне траке поменуте величине. Након тога, крунице би биле прелакиране танким слојем лака резистентним на дејство киселина (Essence, Cosnova GmbH, Zulcbach, Немачка). Након сушења лака, адхезивне траке би се уклониле. На овај начин, свака круница премолара би имала 2 прозора која би била изложена дејству деминерализационог раствора (2,2 mmol/l калцијум хлорида; 2,2 mmol/l монокалцијум фосфата; 0,05 mmol/l сирћетне киселине; pH =4,4; трајање процеса: 96 сати) (46-48).

Свака круница премолара би била потопљена у 20 ml раствора за деминерализацију, у стерилну пластичну бочицу. Свакодневно би се вршила провера pH вредности (Mi 150, pH/Temperature Bench Meter, Martini instruments) и помоћу калијум-хидроксида (KOH) одржавала на иницијално одређеној вредности. Узорци би били складиштени на собној температури, сходно препорукама из литературе.

Након истека деминерализационог периода, остаци лака за нокте би били уклоњени ацетоном без уља, а потом крунице зуба испране дестилованом водом. Све крунице би се анализирале како би се уочиле макроскопске одлике прозора који су били

изложени дејству раствора за деминерализацију (боја у односу на околну здраву глеђ, појава видљивих дефеката површине глеђи). Након тога, крунице премолара би биле пресечене на вестибуларну и оралну половину помоћу дијамантског диска мале брзине у апарату *Isomet*, уз водено хлађење.

### Протокол третмана почетних каријесних лезија глеђи

#### **Примена висококонцентрованог лака са флуором (*Fluor Protector S*) – група Ц**

Концентрација флуорида у хомогеном лаку износи 7,700 ppm, а након примене и сушења на зубима повећава се четири пута. Иницијалне каријесне лезије глеђи би биле третиране према упутству произвођача: након сушења површине зуба, бела мрља би била премазана лаком, у танком слоју помоћу четкице (*Vivabrush G*, *Ivoclar Vivadent*) и сачекало би се 60 секунди како би се лак осушио. Након тога, сваки узорак би се потопио у дејонизовану воду, у стерилну пластичну бочицу, на собној температури. Узорци би били потопљени током 28 дана.

#### **Примена пасте са аморфним калцијум фосфатом казеин фосфопептидом (*Tooth Mousse*) – група Д**

Након сушења, инцијалне каријесне лезије глеђи би биле премазиване пастом у трајању од 5 минута. Вишак пасте би се уклонио ватеролном. Сваки узорак би се потопио у дејонизовану воду, у стерилну пластичну бочицу, на собној температури. Процедура реминерализације би се понављала током 28 дана, једном дневно.

#### **Примена нисковискозне инфилтрационе смоле (*ICON*) – група Е**

Извршило би се нагризање површине беле мрље киселином - 15% HCl (*Icon Etch gel*) у трајању од 2 минута, уз периодично утрљавање гела. Након тога, гел се детаљно испира водом 30 секунди и врши се посушивање ваздушним млазом без уља. Следи примена етанола (*Icon Dry*), 30 секунди, и сушење млазом ваздуха без уља и воде. Помоћу микрочеткице вршило би се утрљавање инфилтрационе смоле (*Icon Infiltrant*) у трајању од 3 минута. Након истека предвиђеног временског периода, вишак материјала би био уклоњен ватеролном, а нанета смола просветљена VAFU лампом за полимеризацију (*VRN Products*), модом 1600mW/cm<sup>2</sup>. Апликација инфилтрата би се поновила још једном у трајању од 1 минут, након чега следи исти поступак уклањања вишка материјала и полимеризације. Сваки узорак би се потопио у дејонизовану воду, у

стерилну пластичну бочицу, на собној температури. Узорци би били потопљени током 28 дана.

Узорци у групама А и Б би били потопљени у дејонизовану воду, на собној температури до почетка наредних фаза истраживања.

Карактеристике материјала који би се користили у третману почетне каријесне лезије глеђи приказане су у табели 1.

Табела 1. Састав и произвођач материјала који би се користили у истраживању.

| Материјал                | Састав                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Произвођач                         |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Fluor Protector S</b> | 1,5% амонијум-флуорид (7,700 ppmF)<br>Етанол<br>Вода<br>Сахарин<br>Полимер<br>Адитиви                                                                                                                                                                                                                                               | Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn |
| <b>Tooth Mousse</b>      | казеин фосфопептид-аморфни калцијум фосфат, вода, глицерол, пропилен гликол, D-сорбитол, натријум-карбоксил-метил-целулоза, силицијум-диоксид, титанијум-диоксид, ксилитол, гуар гума, фосфорна киселина, натријум сахарин, цинк-оксид, магнезијум-оксид, етил-4-хидроксибензоат, пропил-4-хидроксибензоат, бутил-4-хидроксибензоат | GC, Tokio, Japan                   |
| <b>ICON</b>              | <u>Icon-Etch:</u><br>Хлороводонична киселина (15% HCl),<br>Пиросилицијумова киселина, површински активне супстанце<br><u>Icon-Dry:</u><br>99% раствор етанола<br><u>Icon-Infiltrant:</u><br>Нисковискозне смоле – триетилен гликол диметакрилат, иницијатори, адитиви                                                               | DMG, Hamburg, Nemačka              |

## **I Испитивање микротврдоће глеђи**

Испитивање микротврдоће би се спровело на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду помоћу *Oliver Pharr* методе (Shimadzu Indenter, Kyoto, Japan). У свакој групи (А, Б, Ц, Д, Е), број узорака би био 15 ( $n=15$ ). Укупан број узорака би био 75.

Пре мерења, узорци би били фиксирани у самовезујућем акрилату (Fuji Tempcon, GC, Tokyo, Japan) при чему би површина глеђи била експонирана и доступна сонди мерача. Вршила би се 3 мерења у централном делу формираног прозора на површини глеђи, а затим би се израчунала средња вредност за сваки узорак.

## **II Испитивање пријемчивости за формирање биофилма**

Испитивање би се вршило у Лабораторији за микробиологију Стоматолошког факултета Универзитета у Београду.

За овај део истраживања користило би се 5 узорака по групи за сваки испитивани микроорганизам ( $n=5$ ). Микробиолошке анализе би се вршиле у трипликату. Од преостала два узорка, један узорак би се користио за СЕМ, а други за проверу стерилности. Укупан број узорака би био 50.

Након завршеног процеса деминерализације, из сваке половине крунице зуба извршило би се исецање глеђног модела величине 4 x 4 mm и дебљине 2 mm помоћу дијамантског диска мале брзине у апарату *Isomet*, уз водено хлађење. Интактне половине круница премолара у групи А би на исти начин биле пресечене, како би се добили глеђни модели одговарајуће величине.

Овако добијени глеђни модели би били стерилисани у аутоклаву (121° C, 15 мин). Узорци у групама А и Б би били складиштени у дејонизованој води, а узорци у групама Ц, Д, Е би били третирани према претходно описаном протоколу.

Испитивала би се пријемчивост за формирање биофилма следећих референтних сојева микроорганизама: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) и *Candida albicans* (ATCC 10231). Након спровођења свих протокола терапије иницијалне каријесне лезије глеђи и провере стерилности узорака, приступило би се формирању мономикробних биофилмова. Након формирања примарне пеликле уз помоћ вештачке пљувачке, биофилмови би били формиран у одговарајућим медијумима (ВНІ бујон за *S. mutans* и

RPMI за *C. albicans*), на 37° C у трајању 48 сати у аеробним (*C. albicans*) односно анаеробним условима (*S. mutans*). Након тог периода, вршила би се квантификација биофилма формираног на узорцима засејавањем десетоструких серијских разблажења на одговарајуће чврсте хранљиве подлоге: Mutans Sanguinis агар за *S. mutans* и Saburo декстрозни агар за *C. albicans*. Резултати би били изражавани као број формираних колонија микроорганизама (*Colony Forming Units - CFU*) по милилитру узорка (*CFU/ml*). Узорак за СЕМ би био фиксиран у 2,5% глутаралдехиду 24 сата, а затим припремљен за посматрање уз дехидратацију узорка у одговарајућим концентрацијама алкохола и сирћетне киселине у трајању од 1 сат. Коришћењем скенинг електронске микроскопије би се додатно потврдило формирање мономикробног биофилма у свим испитиваним групама. СЕМ анализа би била одрађена на Одељењу за физику и математику Пољопривредног факултета Универзитета у Београду.

### **III Испитивање утицаја на ћелије хумане гингиве**

Овај део истраживања би се спровео у Имплантолошком истраживачком центру Стоматолошког факултета Универзитета у Београду.

Користило би се 5 узорака по групи (n=5). Процена ћелијске вијабилности би се вршила у трипликату. Преостала два узорка би се користила за СЕМ анализу. Укупан број узорака би био 25.

Након завршеног процеса деминерализације, из сваке половине крунице зуба извршило би се исецање глеђног модела величине 4 x 4 mm и дебљине 2 mm помоћу дијамантског диска мале брзине у апарату *Isomet*, уз водено хлађење. Интактне половине круница премолара у групи А би на исти начин биле пресечене, како би се добили глеђни модели одговарајуће величине.

Овако добијени глеђни модели би били стерилисани у аутоклаву (121° C, 15 мин). Узорци у групама А и Б би били складиштени у дејонизованој води, а узорци у групама Ц, Д, Е би били третирани према претходно описаном протоколу.

Хумани гингивални фибробласти, претходно изоловани из ткива гингиве, били би коришћени у истраживању. Користиле би се ћелије од 3. до 5. пасаже култивисане у стандардним условима у влажној атмосфери са 5% CO<sub>2</sub> на 37°С. Ћелије би биле култивисане у медијуму Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), допуњене са 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 100 U/mL пеницилин-стрептомицин раствора. Све

компоненте би биле набављене од Invitrogena (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

### **III.1. Митохондријална активност (MTT)**

За процену ћелијске вијабилности користио би се тест митохондријалне активности (MTT тест). Припремљени, стерилни узорци би били стављени у бунаре са 96 поља. Ћелије би се засејавале на површини узорака у концентрацији 10 000 ћелија/cm<sup>2</sup> и култивисале у условима 55% CO<sub>2</sub> на 37°C. Након 24 сата медијум би био уклоњен, а медијум који садржи 3-(4,5-диметилтиазол-2-ул)-2,5 дифенилтетразолиум бромид (MTT, 0,5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) би био додат сваком бунару, и инкубиран током 4 сата. Након инкубације, супернатант би се уклонио, а сваком бунару би се додало по 100 µL диметил сулфоксида (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) како би се растворили формазански кристали. Плоче би биле постављене на мешалицу током 20 минута, на 250 обртаја/мин, у мраку, на 37°C. Очитавање би се вршило на 540 nm користећи читач RT-2100с (Rayto, Kina). Шест бунара без узорака би било коришћено као унутрашња контрола експеримента. Проценат митохондријске активности би се израчунао као разлика у односу на контролну групу.

### **III.2. Адхезија фибробласта за површину узорака (SEM)**

Узорци би били припремљени на идентичан начин као и за тест митохондријске активности. Након 24 сата гајења ћелија на узорцима, урадиће се фиксација 2% глутаралдехидом у трајању од 2 сата, на + 4°C, након чега би се узорци излагали растућим концентрацијама алкохола (30%, 50%, 70%, 90% и 100%) у трајању од по 10 минута. Тако припремљени узорци би се даље анализирали методом скенинг електронске микроскопије (SEM). SEM анализа би била одрађена на Одељењу за физику и математику Пољопривредног факултета Универзитета у Београду.

## **IV Испитивање дубине пенетрације материјала методом скенинг електрон микроскопије (SEM)**

SEM анализа би била одрађена на Одељењу за физику и математику Пољопривредног факултета Универзитета у Београду. За овај део истраживања користила би се 3 узорка по групи (n=3). Укупан број узорака би био 15.

Након завршеног третмана почетне каријесне лезије глеђи према претходно описаној процедури, узорци би били припремљени за скенинг електрон микроскопију.

Како би се омогућило исецање узорака на одговарајући начин, узорци би се фиксирани лепљивим воском (Галео, Галеника, Србија) за стаклену плочицу. Свака половина крунице премолара би била сечена у буко-оралном смеру, како би се добио узорак за микроскопију дебљине 1 mm, помоћу дијамантског диска мале брзине у апарату *Isomet*, уз водено хлађење. Тако формирану узорци (плочице) би били полирани силикон карбидним папиром растуће финоће зрна (600, 800, 1000, 1200) под воденим хлађењем. Након обилног испирања дестилованом водом, узорци третирали би се 37% ортофосфорном киселином у трајању од 30 секунди (Gel Etchant, Kerr), након чега би били детаљно испрани дестилованом водом. Након сушења ваздушним млазом без уља, узорци би се дехидрирали у серији алкохолних раствора (25%, 50%, 70%, 90%, 95%). Узорци би се поново сушили ваздушним млазом без уља и напарили златом (Bal-Tec SCD 005 Sputter Coater, Balzers, Lihtenštajn), а затим би били посматрани у скенинг електрон микроскопу (JEOL-JSM-6460LV, Tokio, Japan) под различитим увећањима (40, 100, 700, 1000, 1500, 4000).

Посматрала би се дубина почетних каријесних лезија глеђи као и дубина пенетрације материјала. Такође, биле би описане уочене промене у структури глеђи и вршило би се њихово упоређивање са изгледом интактних глеђних призми.

### **Статистичка обрада података**

Статистичка анализа прикупљених података би била извршена одговарајућим статистичким тестовима у програмском пакету *SPSS* за Windows (IBM Corp, Njujork, SAD). Избор одговарајућих статистичких тестова који би се користили зависиће од природе расподеле података добијених истраживањем.

## ОЧЕКИВАНИ РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Очекује се побољшање вредности микротврдоће након различитих третмана почетних каријесних лезија глеђи у односу на вредности микротврдоће почетне каријесне лезије глеђи. Такође, очекује се да након инфилтрације белих мрља нисковискозном смолом, вредности микротврдоће буду приближне вредностима интактне глеђи.

Сва три третмана белих мрља требало би да утичу на количину формираног мономикробног биофилма, а очекује се да ће бити нижа у поређењу са формирањем биофилма на почетној каријесној лезији глеђи. Информације о *C. albicans* и овим средствима за реминерализацију глеђи и нисковискозној инфилтрационој смоли су оскудне, тако да би резултати добијени овим истраживањем били научно и клинички значајни. Очекивани резултати у вези са утицајем на ћелије гингиве се не могу јасно дефинисати, с обзиром да у литератури нема довољно доказа у вези са директним контактом истражених материјала и хуманих гингивалних фибробласта.

На скенинг електронској микроскопији очекује се да нисковискозна инфилтрациона смола покаже највећу дубину пенетрације унутар почетних каријесних лезија глеђи.

## ПОТЕНЦИЈАЛНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС И КЛИНИЧКИ ЗНАЧАЈ ИСТРАЖИВАЊА

Каријес представља најзаступљеније обољење код деце у свету. Као што је већ наглашено, преваленца белих мрља, првог клиничног знака каријесног процеса, се последњих деценија повећала. Традиционални оперативни приступ са екстензивним рестаурацијама замењен је правовременим превентивним, неинвазивним и минимално инвазивним третманом. Индивидуални превентивни план са контролом ризика за настанак каријеса и раном дијагностиком почетних каријесних лезија глеђи је основа савременог лечења каријеса. Како би се то постигло, постоји стална потреба за додатним истраживањима и проналажењем одговарајућих средстава за реминерализацију. Ово истраживање би могло да пружи шира сазнања о савременим средствима која се користе у терапији почетних каријесних лезија глеђи и њиховом утицају на микроорганизме значајне у етиопатогенези каријеса и на ћелије гингиве. Научни допринос и значај ове *in*

*vitro* студије се огледа у томе да може послужити као основа за даља *in vitro* истраживања, као и клиничка испитивања и формирање препорука за добру клиничку праксу.

## Референце:

1. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, et al. Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J Dent Res*. 2017;96(4):380-7.
2. Nassar HM, Lippert F. Artificial Caries Lesion Characteristics after Secondary Demineralization with Theobromine-Containing Protocol. *Molecules*. 2021;26(2).
3. Theodory TG, Kolker JL, Vargas MA, Maia RR, Dawson DV. Masking and Penetration Ability of Various Sealants and ICON in Artificial Initial Caries Lesions In Vitro. *J Adhes Dent*. 2019;21(3):265-72.
4. Bandekar S, Patil S, Dudulwar D, Moogi PP, Ghosh S, Kshirsagar S. Remineralization potential of fluoride, amorphous calcium phosphate-casein phosphopeptide, and combination of hydroxylapatite and fluoride on enamel lesions: An. *J Conserv Dent*. 2019;22(3):305-9.
5. Soveral M, Machado V, Botelho J, Mendes JJ, Manso C. Effect of Resin Infiltration on Enamel: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Funct Biomater*. 2021;12(3).
6. Sundararaj D, Venkatachalapathy S, Tandon A, Pereira A. Critical evaluation of incidence and prevalence of white spot lesions during fixed orthodontic appliance treatment: A meta-analysis. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2015;5(6):433-9.
7. Rana N, Singh N, Shaila, Thomas AM, Jairath R. A comparative evaluation of penetration depth and surface microhardness of Resin Infiltrant, CPP-ACPF and Novamin on enamel demineralization after banding: an. *Biomater Investig Dent*. 2021;8(1):64-71.
8. Lee JH, Kim DG, Park CJ, Cho LR. Minimally invasive treatment for esthetic enhancement of white spot lesion in adjacent tooth. *J Adv Prosthodont*. 2013;5(3):359-63.
9. Perdigão J. Resin infiltration of enamel white spot lesions: An ultramorphological analysis. *J Esthet Restor Dent*. 2020;32(3):317-24.
10. Nayak UA, Pawar A, Kappadi D, Prajapati D, Roy KJ, Wadhwa S. Visible Enamel Defects in Adolescents: How Do their Peers View Them? *Int J Clin Pediatr Dent*. 2018;11(6):479-82.
11. Nayak UA, Kailani T, Althagafy R. Microinvasive, Esthetic Management of White Spot Lesion following Orthodontic Treatment Using Resin Infiltration: A Case Report. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2023;16(2):396-9.
12. Benson PE, Javidi H, DiBiase AT. What is the value of orthodontic treatment? *Br Dent J*. 2015;218(3):185-90.

13. Hasmun N, Vettore MV, Lawson JA, Elcock C, Zaitoun H, Rodd HD. Determinants of children's oral health-related quality of life following aesthetic treatment of enamel opacities. *J Dent*. 2020;98:103372.
14. Eidt G, Waltermann EDM, Hilgert JB, Arthur RA. Candida and dental caries in children, adolescents and adults: A systematic review and meta-analysis. *Arch Oral Biol*. 2020;119:104876.
15. Aref NS, Alrasheed MK. Casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate and universal adhesive resin as a complementary approach for management of white spot lesions: an in-vitro study. *Progress in Orthodontics*. 2022;23(1):12.
16. Pinar Erdem A, Sepet E, Kulekci G, Trosola SC, Guven Y. Effects of two fluoride varnishes and one fluoride/chlorhexidine varnish on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* biofilm formation in vitro. *Int J Med Sci*. 2012;9(2):129-36.
17. Van Loveren C. Antimicrobial activity of fluoride and its in vivo importance: identification of research questions. *Caries Res*. 2001;35 Suppl 1:65-70.
18. Oliveira PRA, Barboza CM, Barreto LSDC, Tostes MA. Effect of CPP-ACP on remineralization of artificial caries-like lesion: an in situ study. *Braz Oral Res*. 2020;34:e061.
19. Sebastian R, Paul ST, Azher U, Reddy D. Comparison of Remineralization Potential of Casein Phosphopeptide: Amorphous Calcium Phosphate, Nano-hydroxyapatite and Calcium Sucrose Phosphate on Artificial Enamel Lesions: An. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2022;15(1):69-73.
20. Almansouri N, Bakry AS, Abbassy MA, Linjawi AI, Hassan AH. Evaluation of Resin Infiltration, Fluoride and the Biomimetic Mineralization of CPP-ACP in Protecting Enamel after Orthodontic Inter-Proximal Enamel Reduction. *Biomimetics (Basel)*. 2023;8(1).
21. Aziznezhad M, Alaghemand H, Shahande Z, Pasdar N, Bijani A, Eslami A, et al. Comparison of the effect of resin infiltrant, fluoride varnish, and nano-hydroxy apatite paste on surface hardness and. *Electron Physician*. 2017;9(3):3934-42.
22. Cochrane NJ, Reynolds EC. Calcium phosphopeptides -- mechanisms of action and evidence for clinical efficacy. *Adv Dent Res*. 2012;24(2):41-7.
23. Marinho VC. Cochrane reviews of randomized trials of fluoride therapies for preventing dental caries. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2009;10(3):183-91.
24. Willmot DR. White lesions after orthodontic treatment: does low fluoride make a difference? *J Orthod*. 2004;31(3):235-42; discussion 02.
25. Davila JM, Buonocore MG, Greeley CB, Provenza DV. Adhesive penetration in human artificial and natural white spots. *J Dent Res*. 1975;54(5):999-1008.

26. Robinson C, Brookes SJ, Kirkham J, Wood SR, Shore RC. In vitro studies of the penetration of adhesive resins into artificial caries-like lesions. *Caries Research*. 2001;35(2):136-41.
27. Mueller J, Meyer-Lueckel H, Paris S, Hopfenmuller W, Kielbassa AM. Inhibition of lesion progression by the penetration of resins in vitro: influence of the application procedure. *Oper Dent*. 2006;31(3):338-45.
28. Robinson C, Hallsworth AS, Weatherell JA, Kunzel W. Arrest and control of carious lesions: a study based on preliminary experiments with resorcinol-formaldehyde resin. *J Dent Res*. 1976;55(5):812-8.
29. Meyer-Lueckel H, Paris S, Mueller J, Cölfen H, Kielbassa AM. Influence of the application time on the penetration of different dental adhesives and a fissure sealant into artificial subsurface lesions in bovine enamel. *Dent Mater*. 2006;22(1):22-8.
30. Paris S, Meyer-Lueckel H, Cölfen H, Kielbassa AM. Resin infiltration of artificial enamel caries lesions with experimental light curing resins. *Dent Mater J*. 2007;26(4):582-8.
31. Ibrahim DFA, Venkiteswaran A, Hasmun NN. The Penetration Depth of Resin Infiltration Into Enamel: A Systematic Review. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2023;13(3):194-207.
32. Wierichs RJ, Langer F, Kobbe C, Abou-Ayash B, Esteves-Oliveira M, Wolf M, et al. Aesthetic caries infiltration - Long-term masking efficacy after 6 years. *J Dent*. 2023;132:104474.
33. Liu Y, Daniel SG, Kim HE, Koo H, Korostoff J, Teles F, et al. Addition of cariogenic pathogens to complex oral microflora drives significant changes in biofilm compositions and functionalities. *Microbiome*. 2023;11(1):123.
34. Du Q, Ren B, Zhou X, Zhang L, Xu X. Cross-kingdom interaction between. *Front Microbiol*. 2022;13:911623.
35. Pereira D, Seneviratne CJ, Koga-Ito CY, Samaranayake LP. Is the oral fungal pathogen *Candida albicans* a cariogen? *Oral Dis*. 2018;24(4):518-26.
36. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun*. 2014;82(5):1968-81.
37. Gregoire S, Xiao J, Silva BB, Gonzalez I, Agidi PS, Klein MI, et al. Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(18):6357-67.

38. Sztajer H, Szafranski SP, Tomasch J, Reck M, Nimtz M, Rohde M, et al. Cross-feeding and interkingdom communication in dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *ISME J*. 2014;8(11):2256-71.
39. Xiao J, Huang X, Alkhers N, Alzamil H, Alzoubi S, Wu TT, et al. *Candida albicans* and Early Childhood Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Caries Res*. 2018;52(1-2):102-12.
40. Alamoush RA, Kushnerev E, Yates JM, Satterthwaite JD, Silikas N. Response of two gingival cell lines to CAD/CAM composite blocks. *Dent Mater*. 2020;36(9):1214-25.
41. Gupta SK, Saxena P, Pant VA, Pant AB. Release and toxicity of dental resin composite. *Toxicol Int*. 2012;19(3):225-34.
42. Van Landuyt KL, Nawrot T, Geebelen B, De Munck J, Snauwaert J, Yoshihara K, et al. How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dent Mater*. 2011;27(8):723-47.
43. Salomão PMA, Oliveira FA, Rodrigues PD, Al-Ahij LP, Gasque KCDS, Jeggle P, et al. The cytotoxic effect of TiF<sub>4</sub> and NaF on fibroblasts is influenced by the experimental model, fluoride concentration and exposure time. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179471.
44. López-García S, Guerrero-Gironés J, Pecci-Lloret MP, Pecci-Lloret MR, Rodríguez-Lozano FJ, García-Bernal D. In Vitro Biocompatibility of CPP-ACP and Fluoride-containing Desensitizers on Human Gingival Cells. *Oper Dent*. 2021;46(6):E264-E75.
45. Seshadri VRA, Varghese NS, Gurunathan D. Evaluation of the Cytocompatibility of Fluoride Varnish and Its Effect on Human Gingival Fibroblasts (hGFs): An In Vitro Study. *Cureus*. 2023;15(7):e41735.
46. Mandava J, Reddy YS, Kantheti S, Chalasani U, Ravi RC, Borugadda R, et al. Microhardness and Penetration of Artificial White Spot Lesions Treated with Resin or Colloidal Silica Infiltration. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(4):ZC142-ZC6.
47. Arora TC, Arora D, Tripathi AM, Yadav G, Saha S, Dhinsa K. An In-Vitro evaluation of resin infiltration system and conventional pit and fissure sealant on enamel properties in white spot lesions. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2019;37(2):133-9.
48. Behrouzi P, Heshmat H, Hoorizad Ganjkar M, Tabatabaei SF, Kharazifard MJ. Effect of Two Methods of Remineralization and Resin Infiltration on Surface Hardness of Artificially Induced Enamel Lesions. *J Dent (Shiraz)*. 2020;21(1):12-7.

## **Информације за родитеље/старатеље пацијената о истраживању**

**„Испитивање утицаја различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи на формирање биофилма, адхезију и вијабилност ћелија хумане гингиве и вредности микротврдоће глеђи“**

### **План и сврха истраживања**

Ово истраживање има за циљ испитивање успешности примене различитих средстава која се користе у терапији почетних каријесних лезија зуба. За потребе овог истраживања користиће се здрави стални зуби (четворке или петице) који су извађени из ортодонтских разлога, према предвиђеном плану терапије.

Сматрамо да ће резултати овог истраживања допринети бољем разумевању и ефикаснијој клиничкој примени различитих препарата у терапији почетних каријесних лезија сталних зуба.

Истраживање ће бити спроведено на Стоматолошком факултету Универзитета у Београду, Пољопривредном факултету и Технолошко металуршком факултету Универзитета у Београду.

За учешће у студији не постоји новчана надокнада.

Не постоји сукоб интереса од стране истраживача укључених у истраживање.

Након потписивања сагласности и завршетка планираног третмана, извађени зуби ће бити транспортовани на одговарајући начин у лабораторију Клинике за дечју и превентивну стоматологију Стоматолошког факултета ради даљег истраживања.

### **Значај истраживања**

Могућа корист ове студије огледа се у ефикаснијем одабиру средстава у лечењу почетних каријесних лезија глеђи сталних зуба и бољем разумевању начина њиховог деловања.

### **Тајност података**

Документација о пацијенту је строго поверљива. Увид у стоматолошки картон, осим ординирајућег лекара, имаће само истраживач (др Милена Милановић), а објављивање ће укључити анонимност података.

### **Пацијент ће благовремено бити обавештен ако нове информације буду доступне**

Родитељ/Старатељ ће на време бити обавештен уколико дође до промена у истраживању или ако нове информације у науци и/или пракси буду доступне. Све информације ће моћи да добије од истраживача.

### **Добровољно учешће и услови повлачења из студије**

Учествовање у студији је добровољно. Повлачење узорака је могуће у сваком тренутку из било ког разлога.

### **Контакт особа**

Уколико желите додатне информације о овој студији, молимо Вас да се обратите др Милени Милановић ([milena.milanovic@stomf.bg.ac.rs](mailto:milena.milanovic@stomf.bg.ac.rs)).

Хвала Вам на сарадњи.

*Образац за информисани пристапак родитеља/старатеља за учешће пацијента у истраживању*

**САГЛАСНОСТ**

Родитеља/старатеља за узимање узорка зуба у случају индикованог вађења сталног зуба (премолара) у истраживању „Испитивање утицаја различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи на формирање биофилма, адхезију и вијабилност ћелија хумане гингиве и вредности микротврдоће глеђи”

| Име и презиме детета | Број картона детета |
|----------------------|---------------------|
|                      |                     |

Прочитао/ла сам (или ми је неко други прочитао) и у потпуности сам разумео/ла све наведене информације у документу **Информације за родитеље/старатеље пацијената**. Поставио/ла сам питања да решим било какве нејасноће и добио/ла одговарајуће одговоре. Добровољно дајем свој пристапак за коришћење извађеног сталног зуба мог детета/штићеника у предложеној студији.

Неприхватање учешћа у овој студији или повлачење пристанка неће утицати на неопходну терапију мог детета/штићеника, тако да ће остварити своја законска права као пацијент. Својим добровољним пристанком за учешће мог детета/штићеника у предложеној студији нећу остварити никакву личну нити материјалну корист.

Име и презиме родитеља/старатеља: \_\_\_\_\_

Потпис родитеља/старатеља: \_\_\_\_\_

Потпис надлежног лекара: \_\_\_\_\_

Датум: \_\_\_\_\_

## **Информације за пацијенте за учешће у истраживању**

**„Испитивање утицаја различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи на формирање биофилма, адхезију и вијабилност ћелија хумане гингиве и вредности микротврдоће глеђи“**

### **План и сврха истраживања**

Један од циљева овог истраживања је испитивање утицаја савремених средстава која се користе у терапији почетних каријесних лезија зуба на ткива која окружују зуб. За потребе овог истраживања користиће се део гингиве („десни“) величине 3x3x3 mm који ће бити узети приликом хирушког вађења умњака на Клиници за оралну хирургију Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. Након тога рана ће се ушити према стандардном протоколу.

Сматрамо да ће резултати овог истраживања допринети бољем разумевању и ефикаснијој клиничкој примени различитих препарата у терапији почетних каријесних лезија сталних зуба.

Истраживање ће бити спроведено на Стоматолошком факултету Универзитета у Београду, Пољопривредном факултету и Технолошко металуршком факултету Универзитета у Београду.

За учешће у студији не постоји новчана надокнада.

Не постоји сукоб интереса од стране истраживача укључених у истраживање.

Након потписивања сагласности и завршетка планираног третмана, узорци ткива ће бити транспортовани на одговарајући начин у Имплантолошки истраживачки центар Стоматолошког факултета ради даљег истраживања.

### **Значај истраживања**

Могућа корист ове студије огледа се у ефикаснијем одабиру средстава у лечењу почетних каријесних лезија глеђи сталних зуба и бољем разумевању начина њиховог деловања на ткиво које окружује зуб.

### **Тајност података**

Документација о пацијенту је строго поверљива. Увид у стоматолошки картон, осим ординирајућег лекара, имаће само истраживач (др Милена Милановић), а објављивање ће укључити анонимност података.

### **Пацијент ће благовремено бити обавештен ако нове информације буду доступне**

Пацијент ће на време бити обавештен уколико дође до промена у истраживању или ако нове информације у науци и/или пракси буду доступне. Све информације ће моћи да добије од истраживача.

### **Добровољно учешће и услови повлачења из студије**

Учествовање у студији је добровољно. Повлачење узорака је могуће у сваком тренутку из било ког разлога.

### **Контакт особа**

Уколико желите додатне информације о овом истраживању, молимо Вас да се обратите др Милени Милановић ([milena.milanovic@stomf.bg.ac.rs](mailto:milena.milanovic@stomf.bg.ac.rs)).

Хвала Вам на сарадњи.

## САГЛАСНОСТ

Пацијента за узимање узорка ткива гингиве у случају индикованог хируршког вађења умњака у истраживању **„Испитивање утицаја различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи на формирање биофилма, адхезију и вијабилност ћелија хумане гингиве и вредности микротврдоће глеђи”**

| Име и презиме пацијента | Број картона пацијента |
|-------------------------|------------------------|
|                         |                        |

Прочитао/ла сам (или ми је неко други прочитао) и у потпуности сам разумео/ла све наведене информације у документу **Информације за пацијенте за учешће у истраживању**. Поставио/ла сам питања да решим било какве нејасноће и добио/ла одговарајуће одговоре. Добровољно дајем свој пристапак за коришћење узорка ткива у предложеном истраживању.

Неприхватање учешћа у овој студији или повлачење пристапка неће утицати на неопходну терапију, тако да ћу остварити своја законска права као пацијент. Својим добровољним пристапком за учешће у предложеној студији нећу остварити никакву личну нити материјалну корист.

Потпис пацијента: \_\_\_\_\_

Потпис надлежног лекара: \_\_\_\_\_

Датум: \_\_\_\_\_

На основу члана 53. Статута Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, Наставно научно веће Стоматолошког факултета, на седници одржаној 28.05.2024. године, донело је следећу

## О Д Л У К У

Именује се комисија за оцену предлога теме докторске дисертације **др Милене Милановић**, под називом **„Испитивање утицаја различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи на формирање биофилма, адхезију и вијабилност ћелија хумане гингиве и вредности микротврдоће глеђи“**, у саставу:

- Проф. др Дејан Марковић
- Доц. др Јелена Јулоски
- Проф. др Душка Благојевић (Медицински факултет у Новом Саду)

## О б р а з л о ж е њ е

Комисија за научно-истраживачки рад, на иницијативу одговарајуће катедре, утврдила је предлог састава комисије, а Наставно научно веће је одлучило као у диспозитиву.

Одлуку доставити: Кандидату, Комисији (3), Одсеку за наставу, Већу и Писарници.

Референт кадровског одсека  
Виолета Растовић

Декан  
Стоматолошког факултета  
Универзитета у Београду

Проф. др Алекса Марковић

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ СТОМАТОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА  
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

Одлуком Наставно-научног већа Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, донетој на редовној седници одржаној 28.05.2024. године, именована је комисија за оцену предлога теме докторске дисертације др Милене Милановић под називом **„Испитивање утицаја различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи на формирање биофилма, адхезију и вијабилност ћелија хумане гингиве и вредности микротврдоће глеђи“**, у саставу:

1. **Проф. др Дејан Марковић** – редовни професор, Клиника за дечју и превентивну стоматологију, Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду – председник комисије;

2. **Доц. др Јелена Јулоски** – доцент, Клиника за дечју и превентивну стоматологију, Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду;

3. **Проф. др Душка Благојевић** – редовни професор, Клиника за стоматологију Војводине, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду.

На основу приложене документације, комисија Наставно-научном већу подноси следећи

**ИЗВЕШТАЈ**

**1. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ**

Милена Ж. Милановић рођена је 8. септембра 1992. у Крушевцу, Република Србија. У родном граду завршила је ОШ „Драгомир Марковић”, а потом и Гимназију са одличним успехом и носилац је дипломе *„Вук Караџић”*.

Стоматолошки факултет Универзитета у Београду уписала је 2011. године и завршила 2017. године са просечном оценом 9,77. Током студирања бавила се студентским научно-истраживачким радом, највише из области Дечје и превентивне стоматологије. Носилац је *„Colgate Palmolive Adria”* стипендије за најбољег студента V

године, стипендије „Доситеја” коју додељује Фонд за младе таленте Републике Србије, као и награде за најбољег дипломираног студента школске 2016/2017. године.

Током интегрисаних студија стоматологије била је један од главних организатора манифестације „Осмехом обасјај свет” у оквиру обележавања Светског дана оралног здравља, у Београду 2016. године. Исте године била је волонтер на 13. EAPD Конгресу (Сава Центар, Београд). Такође, учествовала је у организацији радионица на Фестивалу науке 2018. године „Авантуре једног зуба” и 2019. године „Стоматологија какву још ниси видео”.

Приправнички стаж обављала је на клиникама Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. Након положеног стручног испита, 2018. године уписује Докторске академске студије – Базична и клиничка истраживања у стоматологији.

Од 2019. године ангажована је као сарадник у високом образовању на Клиници за дечју и превентивну стоматологију Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. Током 2022. године уписује специјализацију из Превентивне и дечје стоматологије.

Учесница је пројекта „Примјена озона код хируршког вађења импактираних доњих трећих молара: утицај на појаву постоперативних компликација и процесе зарастања“, подржаном од стране Министарства за научнотехнолошки развој и високо образовање Републике Српске (број: 19.032/961-110/23).

Говори енглески и италијански језик. Активан је члан Стоматолошке коморе Србије и Српског лекарског друштва. Од новембра 2023. године постаје сертификовани iTOP инструктор у циљу даљег рада на едукацији и унапређењу оралног здравља.

Аутор је 4 објављена рада, као и више научних и стручних радова презентованих на националним и међународним скуповима.

## **2. ОБРАЗЛОЖЕЊЕ ТЕМЕ**

Достављени материјал предлога теме докторске дисертације др Милене Милановић садржи: предмет истраживања, циљеве и хипотезу истраживања, материјал и методе, очекиване резултате, потенцијални научни допринос и клинички значај истраживања и библиографију.

## 2.1. Научна област – Стоматолошке науке

## 2.2. Предмет истраживања

Каријес представља један од највећих јавно-здравствених проблема са којим се сусрећемо. То је потврђено последњим извештајем Глобалне оптерећености обољењима (*Global Burden of Disease*). Процењује се да око 2,5 милијарде људи има каријес сталних зуба, а више од 530 милиона деце широм света има несаниране каријесне лезије млечних зуба. Почетне каријесне лезије глеђи, познате као беле мрље, представљају први клинички знак каријесног процеса. У усној дупљи се непрекидно одвијају динамички процеси измене јона из зубне пеликле, биофилма и оралних флуида са једне стране и површине глеђи са друге стране. Будући да је глеђ аваскуларно и ацелуларно ткиво, интактност своје површине одржава равнотежом процеса деминерализације и реминерализације. Уколико се исцрпе хомеостатски механизми пљувачке и равнотежа се поремети у корист деминерализације, долази до формирања почетних каријесних лезија на глеђи прекривеној метаболички активним биофилмом. Деминерализација у потповршинском слоју глеђи доводи до настанка порозитета, што утиче на оптичке карактеристике глеђи. Ове порозне структуре садрже више ваздуха (индекс преламања светлости 1) и воде (вредност индекса 1,33). Услед поменутих разлика у вредности индекса преламања светлости, почетне каријесне лезије глеђи се виде као кредасто беле површине које се јасно уочавају у односу на околну здраву глеђ.

Последњих деценија преваленца белих мрља се повећала. Неки аутори ово повећање доводе у везу са терапијом фиксним ортодонтским апаратима и сматрају да је очување оралног здравља у овим околностима изазов за стоматолога. Подаци из литературе указују да адолесценти представљају групу пацијената код којих је најчешће неопходан третман белих мрља. Уколико се не уоче правовремено, у реверзибилној фази, ове лезије ће напредовати и доћи ће до настанка кавитета на зубима. Такође, истраживања су показала да беле мрље на предњим зубима имају негативни психолошки ефекат код деце и адолесцената и утичу на њихов ниво самопоуздања. Истовремено, након успешног третмана почетних каријесних лезија глеђи, запажено је побољшање квалитета живота и стања оралног здравља деце.

Савремена стоматологија је окренута максималном очувању зубних ткива и тежи ка минималним интервенцијама. Неинвазивни и минимално инвазивни третмани су основа терапије почетних каријесних лезија глеђи чији је циљ заустављање каријесног

процеса и подстицање реминерализације. Средства за реминерализацију са флуоридима, биоактивни препарати са аморфним калцијум фосфатом (*ACP*), казеин фосфопептидом (*CPP*) и калцијум силикати се често користе.

Лак са флуоридима и средства са казеин фосфопептидом – аморфним калцијум фосфатом уз правилно одржавање оралне хигијене и корекцију лоших навика у исхрани, су незаобилазни у терапији белих мрља. Ипак, неопходно је одређено време како би се остварила реминерализација почетних каријесних лезија глеђи и целокупни процес зависи од понашања пацијента и спровођења свих предложених превентивних мера. Један од потенцијалних недостатака је немогућност потпуног маскирања белих мрља.

Када се појавила идеја о инфилтрацији почетних каријесних лезија глеђи, истраживачи су спроводили различите студије, *in vivo* и *in vitro*, у циљу проналажења адекватног материјала. На основу добијених резултата, предложени су критеријуми које би требало да задовољи материјал за инфилтрацију: ниска вискозност, хидрофилност, антибактеријски ефекат, нетоксичност, прихватљив естетски исход третмана, могућност полимеризације. Испитивана је могућност коришћења заливача и адхезива, али истраживања су показала да не могу пенетрирати у дубље слојеве каријесне лезије глеђи и да долази до њихове дезинтеграције. Захваљујући низу нових истраживања, Парис и сарадници су развили савремени материјал који се не може лако дезинтегрисати, има могућност продирања у почетне каријесне лезије глеђи и заптивања порозитета.

Сва ова истраживања, довела су до развоја микроинвазивног концепта као дела савременог приступа у терапији белих мрља. Подразумева инфилтрацију белих мрља нисковискозном композитном смолом. Захваљујући дејству капиларних сила, ова смола инфилтрира лезију, попуњава поре настале процесом деминерализације у телу каријесне лезије и на тај начин формира дифузиону баријеру унутар саме лезије глеђи. Захваљујући вредности индекса преламања светлости инфилтрационе смоле (1,46), која је слична здравој глеђи (1,62), долази до естетског побољшања изгледа беле мрље. Доступни подаци из литературе указују на успешно маскирање белих мрља и постизање жељеног терапијског ефекта након примене нисковискозних смола. Постиже се тзв. ефекат камелеона при чему се изглед почетне каријесне лезије глеђи усклађује са околним ткивом, тако да се избегава спровођење инвазивнијих терапијских метода. Међутим, у доступној научној литератури уочава се потреба за даљим испитивањем утицаја ових

смола на друге карактеристике глеђи, као што је храпавост површине, микротврдоћа глеђи, дубина пенетрације.

Према савременој дефиницији, каријес представља микроорганизмима и ферментабилним угљеним хидратима посредовано, биофилм - зависно орално обољење. Пријемчивост микроорганизама за специфичне површине у усној дупљи и формирање биофилма на површини зуба и различитих материјала су веома важни у етиопатогенези каријеса, али и обољења потпорног апарата зуба. Велику пажњу истраживача последњих година привлачи синергистичко деловање кариогене бактерије *Streptococcus mutans* и опортунистичке гљивице *Candida albicans*. Ове интеракције су значајне у патогенези различитих оралних обољења, као што су каријес, периодонтитис, периимплантитис, орални карциноми. Сматра се да *Candida albicans* може имати значајну улогу у развоју каријеса захваљујући својој ацидогеној природи, могућности да формира биофилм, ферментише угљене хидрате и производи одређене ензиме. Већина студија показала је да *Candida albicans* може модификовати биофилм и повећати његову вирулентност и кариогеност. Доступна научна литература потврђује везу измеђи ове гљивице и каријеса раног детињства. Посебно су важни резултати мета анализе који указују на повезаност веће преваленце каријеса и ове гљивице, како код деце и адолесцената (од 6 до 18 година), тако и код одраслих.

Резултати досадашњих истраживања указали су да локална апликација флуорида утиче на смањење адхезије *S. mutans* за површине зуба, као и да долази до смањене продукције киселих метаболита. Међутим, мање података је доступно о утицају лака са флуоридима на адхезију бактерија на глеђ зуба. Флуориди остварују антимикубно дејство захваљујући ометању производње ензима глукозил-трансферазе. Овај ензим омогућава искоришћавање глукозе у биофилму и формирање екстраћелијских полисахарида, што даље доприноси повећаној акумулацији бактерија и њиховом међусобном повезивању. Према нашим сазнањима, нема доступних података о утицају препарата са флуоридима, казеин фосфопептидом-аморфним калцијум фосфатом и инфилтрационе смоле на адхезију *C. albicans*.

Будући да се ова средства апликују на површину зуба и да су у директном контакту са оралним ткивима, потребно је потврдити и њихову биокомпатибилност. Приликом употребе сва ова средства долазе у контакт са оралним ткивима укључујући гингиву. Тако да, последично, може доћи до појаве запаљења, алергијских реакција или

испољавања цитотоксичног дејства. Лакови са флуоридима ослобађају јоне флуора, док *CPP-ACP* пасте јоне калцијума и фосфата. Када се апликују на површину зуба, гингива долази у непосредни контакт са самим материјалом, као и са ослобођеним јонима. Сматра се да код примене композитних смола, услед непотпуне полимеризације или деградације, може доћи до ослобађања компоненти које могу утицати на ткива која окружују зуб. Стога, неопходно је да наведена средства буду у биолошком складу са оралном слuzницом. Постоји потреба за даљим истраживањем утицаја препарата са флуоридима и средстава са *CPP-ACP* на оралну мукозу, будући да су доступне студије дале различите резултате у зависности од концентрације активних јона. Према нашим сазнањима, нема доступних података о утицају инфилтрационе смоле на ћелије хумане гингиве.

### 2.3. Циљ истраживања

Основни циљ овог *in vitro* истраживања био би утврдити успешност примене различитих средстава која се користе у терапији почетних каријесних лезија глеђи и њихов утицај на одређене микроорганизме и ћелије гингиве.

Анализом проблема истраживања постављени су следећи ближи циљеви:

1. Испитати утицај различитих средстава која се користе у терапији почетних каријесних лезија глеђи на вредности микротвдоће глеђи;
2. Испитати утицај различитих средстава која се користе у терапији почетних каријесних лезија глеђи на формирање биофилма (*Streptococcus mutans*, *Candida albicans*);
3. Испитати утицај средстава која се користе у терапији почетних каријесних лезија глеђи на вијабилност и адхезију ћелија хумане гингиве (фибробласти);
4. Упоредити дубину пенетрације коришћених средстава у терапији почетних каријесних лезија глеђи помоћу скенинг електронског микроскопа (SEM).

## **2.4. Радна хипотеза истраживања**

### 1. Радна хипотеза истраживања у вези са испитивањем вредности микротврдоће глеђи:

Испитивани третмани почетне каријесне лезије глеђи (лак са флуоридима, паста са аморфним калцијум фосфатом казеин фосфопептидом и нисковискозна инфилтрациона смола) статистички значајно утичу на повећање микротврдоће глеђи у односу на вредности микротврдоће глеђи почетне каријесне лезије.

### 2. Радна хипотеза истраживања у вези са испитивањем формирања биофилма:

Постоји статистички значајна разлика у пријемчивости бактерије *Streptococcus mutans* и гљивице *Candida albicans* за интактну глеђ, површину глеђи почетних каријесних лезија и површину белих мрља након различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи (лак са флуоридима, паста са аморфним калцијум фосфатом казеин фосфопептидом и нисковискозна инфилтрациона смола).

### 3. Радна хипотеза истраживања у вези са испитивањем утицаја на хумане фибробласте гингиве:

Постоји статистички значајна разлика у адхезији и вијабилности ћелија хумане гингиве у присуству различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи (лак са флуоридима, паста са аморфним калцијум фосфатом казеин фосфопептидом и нисковискозна инфилтрациона смола).

## **2.5. Материјал и методе**

У предложеном лабораторијском истраживању би били коришћени премолари екстраховани пацијентима узраста 12-18 година на Клиници за децу и превентивну стоматологију Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. Родитељи/старатељи деце би били обавештени о природи и циљевима истраживања и тражила би се њихова писана сагласност за употребу зуба, без могућности генетичке анализе. У делу истраживања би били коришћени хумани фибробласти добијени из узорка гингиве (величине 3x3x3 mm) током хируршке екстракције трећих сталних молара на Клиници за оралну хирургију Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. У овом делу истраживања било би укључено 6 системски здравих пацијената узраста 18-22 године

који су претходно обавештени о истраживању и који су потписали информисани пристанак за учешће у истом.

Критеријуми за селекцију зуба (премолара) за истраживање би били: интактни први и други, горњи и доњи премолари чија је екстракција индикована због планиране ортодонтске терапије.

Критеријуми за искључење зуба (премолара) из истраживања: постојање морфолошких варијација, крдастих или тамних замућења, каријесних лезија, хипопластичних промена, трауматских дефеката или испуна на зубима.

Величина узорка би била одређена помоћу анализе *Power of Study* у програму *SPSS*.

#### Истраживање би обухватило четири засебна дела:

**I** – Испитивање микротврдоће gleђи;

**II** – Испитивање пријемчивости за формирање биофилма (*Streptococcus mutans*, *Candida albicans*);

**III** – Испитивање утицаја на ћелије хумане гингиве;

**IV** – Испитивање дубине пенетрације материјала методом скенинг електрон микроскопије (SEM).

У свакој од наведених целина, зуби би били разврстани у пет група методом случајног узорка:

**Група А** - Зуби са интактном површином gleђи;

**Група Б** - Зуби са артефицијалном почетном каријесном лезијом gleђи (белом мрљом);

**Група Ц** - Зуби са третираном почетном каријесном лезијом gleђи висококонцентрованим лаком са флуоридима;

**Група Д** - Зуби са третираном почетном каријесном лезијом gleђи пастом са аморфним калцијум фосфатом казеин фосфопептидом;

**Група Е** - Зуби са третираном почетном каријесном лезијом gleђи нисковискозном смолом.

## Формирање артефицијалних почетних каријесних лезија глеђи (белих мрља)

Овај део истраживања би био спроведен на Клиници за дечју и превентивну стоматологију и у Лабораторији за биохемију (ОЈ Институтски предмети) Стоматолошког факултета Универзитета у Београду.

Након екстракције, све површине зуба биле би очишћене од меких наслага и остатака периодонталног лигамента. Коренови зуба би били уклоњени сечењем дијамантским диском мале брзине у апарату *Isomet* (Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA), уз водено хлађење, у нивоу глеђно – цементне границе. Садржај круничне коморе пулпе би био уклоњен екскаватором, а комора пулпе попуњена течним композитом (Flow-It ALC, Pentron).

На букалним и оралним површинама круница премолара, формирао би се прозор величине 4 x 4 mm, лепљењем адхезивне траке поменуте величине. Након тога, крунице би биле прелакиране танким слојем лака резистентним на дејство киселина (Essence, Cosnova GmbH, Zulcbach, Немачка). Након сушења лака, адхезивне траке би се уклониле. На овај начин, свака круница премолара би имала 2 прозора која би била изложена дејству деминерализационог раствора (2,2 mmol/l калцијум хлорида; 2,2 mmol/l монокалијум фосфата; 0,05 mmol/l сирћетне киселине; pH =4,4; трајање процеса: 96 сати).

Свака круница премолара би била потопљена у 20 ml раствора за деминерализацију, у стерилну пластичну бочицу. Свакодневно би се вршила провера pH вредности (Mi 150, pH/Temperature Bench Meter, Martini instruments) и помоћу калијум-хидроксида (KOH) одржавала на иницијално одређеној вредности. Узорци би били складиштени на собној температури, сходно препорукама из литературе.

Након истека деминерализационог периода, остаци лака за нокте би били уклоњени ацетоном без уља, а потом крунице зуба испране дестилованом водом. Све крунице би се анализирале како би се уочиле макроскопске одлике прозора који су били изложени дејству раствора за деминерализацију (боја у односу на околну здраву глеђ, појава видљивих дефеката површине глеђи). Након тога, крунице премолара би биле пресечене на вестибуларну и оралну половину помоћу дијамантског диска мале брзине у апарату *Isomet*, уз водено хлађење.

## Протокол третмана почетних каријесних лезија глеђи

### **Примена висококонцентрованог лака са флуором (*Fluor Protector S*) – група Ц**

Концентрација флуорида у хомогеном лаку износи 7,700 ppm, а након примене и сушења на зубима повећава се четири пута. Иницијалне каријесне лезије глеђи би биле третиране према упутству произвођача: након сушења површине зуба, бела мрља би била премазана лаком, у танком слоју помоћу четкице (*Vivabrush G*, Ivoclar Vivadent) и сачекало би се 60 секунди како би се лак осушио. Након тога, сваки узорак би се потопио у дејонизовану воду, у стерилну пластичну бочицу, на собној температури. Узорци би били потопљени током 28 дана.

### **Примена пасте са аморфним калцијум фосфатом казеин фосфопептидом (*Tooth Mousse*) – група Д**

Након сушења, иницијалне каријесне лезије глеђи би биле премазиване пастом у трајању од 5 мин. Вишак пасте би се уклонио ватеролном. Сваки узорак би се потопио у дејонизовану воду, у стерилну пластичну бочицу, на собној температури. Процедура реминерализације би се понављала током 28 дана, једном дневно.

### **Примена нисковискозне инфилтрационе смоле (*ICON*) – група Е**

Извршило би се нагризање површине беле мрље киселином - 15% HCl (*Icon Etch gel*) у трајању од 2 минута, уз периодично утрљавање гела. Након тога, гел се детаљно испира водом 30 секунди и врши се посушивање ваздушним млазом без уља. Следи примена етанола (*Icon Dry*), 30 секунди, и сушење млазом ваздуха без уља и воде. Помоћу микрочеткице вршило би се утрљавање инфилтрационе смоле (*Icon Infiltrant*) у трајању од 3 минута. Након истека предвиђеног временског периода, вишак материјала би био уклоњен ватеролном, а нанета смола просветљена VAFU лампом за полимеризацију (*VRN Products*), модом 1600mW/cm<sup>2</sup>. Апликација инфилтрата би се поновила још једном у трајању од 1 минут, након чега следи исти поступак уклањања вишка материјала и полимеризације. Сваки узорак би се потопио у дејонизовану воду, у стерилну пластичну бочицу, на собној температури. Узорци би били потопљени током 28 дана.

Узорци у групама А и Б би били потопљени у дејонизовану воду, на собној температури до почетка наредних фаза истраживања.

Карактеристике материјала који би се користили у третману почетне каријесне лезије глеђи приказане су у табели 1.

Табела 1. Састав и произвођач материјала који би се користили у истраживању.

| Материјал                | Састав                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Произвођач                         |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Fluor Protector S</b> | 1,5% амонијум-флуорид (7,700 ppmF)<br>Етанол<br>Вода<br>Сахарин<br>Полимер<br>Адитиви                                                                                                                                                                                                                                               | Ivoclar Vivadent, Šan, Lihtenštajn |
| <b>Tooth Mousse</b>      | казеин фосфопептид-аморфни калцијум фосфат, вода, глицерол, пропилен гликол, D-сорбитол, натријум-карбоксил-метил-целулоза, силицијум-диоксид, титанијум-диоксид, ксилитол, гуар гума, фосфорна киселина, натријум сахарин, цинк-оксид, магнезијум-оксид, етил-4-хидроксибензоат, пропил-4-хидроксибензоат, бутил-4-хидроксибензоат | GC, Tokio, Japan                   |
| <b>ICON</b>              | <u>Icon-Etch:</u><br>Хлороводонична киселина (15% HCl),<br>Пиросилицијумова киселина, површински активне супстанце<br><u>Icon-Dry:</u><br>99% раствор етанола<br><u>Icon-Infiltrant:</u><br>Нисковискозне смоле – триетилен гликол диметакрилат, иницијатори, адитиви                                                               | DMG, Hamburg, Nemačka              |

## I Испитивање микротврдоће глеђи

Испитивање микротврдоће би се спровело на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду помоћу *Oliver Pharr* методе (Shimadzu Indenter, Kyoto, Japan).

У свакој групи (А, Б, Ц, Д, Е), број узорака би био 15 ( $n=15$ ). Укупан број узорака би био 75.

Пре мерења, узорци би били фиксирани у самовезујућем акрилату (Fuji Tempcon, GC, Tokyo, Japan) при чему би површина глеђи била експонирана и доступна сонди мерача. Вршила би се 3 мерења у централном делу формираног прозора на површини глеђи, а затим би се израчунала средња вредност за сваки узорак.

## **II Испитивање пријемчивости за формирање биофилма**

Испитивање би се вршило у Лабораторији за микробиологију Стоматолошког факултета Универзитета у Београду.

За овај део истраживања користило би се 5 узорака по групи за сваки испитивани микроорганизам ( $n=5$ ). Микробиолошке анализе би се вршиле у трипликату. Од преостала два узорка, један узорак би се користио за СЕМ, а други за проверу стерилности. Укупан број узорака би био 50.

Након завршеног процеса деминерализације, из сваке половине крунице зуба извршило би се исецање глеђног модела величине 4 x 4 mm и дебљине 2 mm помоћу дијамантског диска мале брзине у апарату *Isomet*, уз водено хлађење. Интактне половине круница премолара у групи А би на исти начин биле пресечене, како би се добили глеђни модели одговарајуће величине.

Овако добијени глеђни модели би били стерилисани у аутоклаву ( $121^{\circ}\text{C}$ , 15 мин). Узорци у групама А и Б би били складиштени у дејонизованој води, а узорци у групама Ц, Д, Е би били третирани према претходно описаном протоколу.

Испитивала би се пријемчивост за формирање биофилма следећих референтних сојева микроорганизма: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) и *Candida albicans* (ATCC 10231). Након спровођења свих протокола терапије иницијалне каријесне лезије глеђи и провере стерилности узорака, приступило би се формирању мономикробних биофилмова. Након формирања примарне пеликле уз помоћ вештачке пљувачке, биофилмови би били формирани у одговарајућим медијумима (ВНІ бујон за *S. mutans* и RPMI за *C. albicans*), на  $37^{\circ}\text{C}$  у трајању 48 сати у аеробним (*C. albicans*) односно анаеробним условима (*S. mutans*). Након тог периода, вршила би се квантификација биофилма формираног на узорцима засејавањем десетоструких серијских разблажења на одговарајуће чврсте хранљиве подлоге: Mutans Sanguinis агар за *S. mutans* и Saburo

декстрозни агар за *C. albicans*. Резултати би били изражавани као број формираних колонија микроорганизама (*Colony Forming Units - CFU*) по милилитру узорка (CFU/ml). Узорак за СЕМ би био фиксиран у 2,5% глутаралдехиду 24 сата, а затим припремљен за посматрање уз дехидратацију узорка у одговарајућим концентрацијама алкохола и сирћетне киселине у трајању од 1 сат. Коришћењем скенинг електронске микроскопије би се додатно потврдило формирање мономикробног биофилма у свим испитиваним групама. СЕМ анализа би била одрађена на Одељењу за физику и математику Пољопривредног факултета Универзитета у Београду.

### **III Испитивање утицаја на ћелије хумане гингиве**

Овај део истраживања би се спровео у Имплантолошком истраживачком центру Стоматолошког факултета Универзитета у Београду.

Користило би се 5 узорак по групи (n=5). Процена ћелијске вијабилности би се вршила у трипликату. Преостала два узорка би се користила за СЕМ анализу. Укупан број узорак би био 25.

Након завршеног процеса деминерализације, из сваке половине крунице зуба извршило би се исецање глеђног модела величине 4 x 4 mm и дебљине 2 mm помоћу дијамантског диска мале брзине у апарату *Isomet*, уз водено хлађење. Интактне половине круница премолара у групи А би на исти начин биле пресечене, како би се добили глеђни модели одговарајуће величине.

Овако добијени глеђни модели би били стерилисани у аутоклаву (121° C, 15 мин). Узорци у групама А и Б би били складиштени у дејонизованој води, а узорци у групама Ц, Д, Е би били третирани према претходно описаном протоколу.

Хумани гингивални фибробласти, претходно изоловани из ткива гингиве, били би коришћени у истраживању. Користиле би се ћелије од 3. до 5. пасаже култивисане у стандардним условима у влажној атмосфери са 5% CO<sub>2</sub> на 37°C. Ћелије би биле култивисане у медијуму Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), допуњене са 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 100 U/mL пеницилин-стрептомицин раствора. Све компоненте би биле набављене од Invitrogena (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

### **III.1. Митохондријална активност (МТТ)**

За процену ћелијске вијабилности користио би се тест митохондријалне активности (МТТ тест). Припремљени, стерилни узорци би били стављени у бунаре са 96 поља. Ћелије би се засејавале на површини узорака у концентрацији 10 000 ћелија/cm<sup>2</sup> и култивисале у условима 55% CO<sub>2</sub> на 37<sup>0</sup>C. Након 24 сата медијум би био уклоњен, а медијум који садржи 3-(4,5-диметилтиазол-2-ул)-2,5 дифенилтетразолиум бромид (МТТ, 0,5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) би био додат сваком бунару, и инкубиран током 4 сата. Након инкубације, супернатант би се уклонио, а сваком бунару би се додало по 100 µL диметил сулфоксида (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) како би се растворили формагански кристали. Плоче би биле постављене на мешалицу током 20 минута, на 250 обртаја/мин, у мраку, на 37<sup>0</sup>C. Очитавање би се вршило на 540 nm користећи читач RT-2100с (Rayto, Kina). Шест бунара без узорака би било коришћено као унутрашња контрола експеримента. Проценат митохондријске активности би се израчунао као разлика у односу на контролну групу.

### **III.2. Адхезија фибробласта за површину узорака (СЕМ)**

Узорци би били припремљени на идентичан начин као и за тест митохондријске активности. Након 24 сата гајења ћелија на узорцима, урадиће се фиксација 2% глутаралдехидом у трајању од 2 сата, на + 4°C, након чега би се узорци излагали растућим концентрацијама алкохола (30%, 50%, 70%, 90% и 100%) у трајању од по 10 минута. Тако припремљени узорци би се даље анализирали методом скенинг електронске микроскопије (СЕМ). СЕМ анализа би била одрађена на Одељењу за физику и математику Пољопривредног факултета Универзитета у Београду.

## **IV Испитивање дубине пенетрације материјала методом скенинг електрон микроскопије (СЕМ)**

СЕМ анализа би била одрађена на Одељењу за физику и математику Пољопривредног факултета Универзитета у Београду. За овај део истраживања користила би се 3 узорка по групи (n=3). Укупан број узорака би био 15.

Након завршеног третмана почетне каријесне лезије глеђи према претходно описаној процедури, узорци би били припремљени за скенинг електрон микроскопију. Како би се омогућило исецање узорака на одговарајући начин, узорци би се фиксирали

лепљивим воском (Галео, Галеника, Србија) за стаклену плочицу. Свака половина крунице премолара би била сечена у буко-оралном смеру, како би се добио узорак за микроскопију дебљине 1 mm, помоћу дијамантског диска мале брзине у апарату *Isomet*, уз водено хлађење. Тако формирану узорци (плочице) би били полирани силикон карбидним папиром растуће финоће зрна (600, 800, 1000, 1200) под воденим хлађењем. Након обилног испирања дестилованом водом, узорци третирали би се 37% ортофосфорном киселином у трајању од 30 секунди (Gel Etchant, Kerr), након чега би били детаљно испрани дестилованом водом. Након сушења ваздушним млазом без уља, узорци би се дехидрирали у серији алкохолних раствора (25%, 50%, 70%, 90%, 95%). Узорци би се поново сушили ваздушним млазом без уља и напарили златом (Bal-Tec SCD 005 Sputter Coater, Balzers, Lihtenštajn), а затим би били посматрани у скенинг електрон микроскопу (JEOL-JSM-6460LV, Tokio, Japan) под различитим увећањима (40, 100, 700, 1000, 1500, 4000).

Посматрала би се дубина почетних каријесних лезија глеђи као и дубина пенетрације материјала. Такође, биле би описане уочене промене у структури глеђи и вршило би се њихово упоређивање са изгледом интактних глеђних призми.

### **Статистичка обрада података**

Статистичка анализа прикупљених података би била извршена одговарајућим статистичким тестовима у програмском пакету *SPSS* за Windows (IBM Corp, Njujork, SAD). Избор одговарајућих статистичких тестова који би се користили зависиће од природе расподеле података добијених истраживањем.

## 2.6. Очекивани резултати истраживања

Очекује се побољшање вредности микротврдоће након различитих третмана почетних каријесних лезија глеђи у односу на вредности микротврдоће почетне каријесне лезије глеђи. Такође, очекује се да након инфилтрације белих мрља нисковискозном смолом, вредности микротврдоће буду приближне вредностима интактне глеђи.

Сва три третмана белих мрља требало би да утичу на количину формираног мономикробног биофилма, а очекује се да ће бити нижа у поређењу са формирањем биофилма на почетној каријесној лезији глеђи. Информације о *C. albicans* и овим средствима за реминерализацију глеђи и нисковискозној инфилтрационој смоли су оскудне, тако да би резултати добијени овим истраживањем били научно и клинички значајни. Очекивани резултати у вези са утицајем на ћелије гингиве се не могу јасно дефинисати, с обзиром да у литератури нема довољно доказа у вези са директним контактом истражених материјала и хуманих гингивалних фибробласта.

На скенинг електронској микроскопији очекује се да нисковискозна инфилтрациона смола покаже највећу дубину пенетрације унутар почетних каријесних лезија глеђи.

## 2.7. Потенцијални научни допринос и клинички значај истраживања

Каријес представља најзаступљеније обољење код деце у свету. Као што је већ наглашено, преваленца белих мрља, првог клиничног знака каријесног процеса, се последњих деценија повећала. Традиционални оперативни приступ са екстензивним рестаурацијама замењен је правовременим превентивним, неинвазивним и минимално инвазивним третманом. Индивидуални превентивни план са контролом ризика за настанак каријеса и раном дијагностиком почетних каријесних лезија глеђи је основа савременог лечења каријеса. Како би се то постигло, постоји стална потреба за додатним истраживањима и проналажењем одговарајућих средстава за реминерализацију. Ово истраживање би могло да пружи шира сазнања о савременим средствима која се користе у терапији почетних каријесних лезија глеђи и њиховом утицају на микроорганизме значајне у етиопатогенези каријеса и на ћелије гингиве. Научни допринос и значај ове *in vitro* студије се огледа у томе да може послужити као основа за даља *in vitro* истраживања, као и клиничка испитивања и формирање препорука за добру клиничку праксу.

### 3. ЗАКЉУЧАК

Предложена тема докторске дисертације др Милене Милановић под називом **„Испитивање утицаја различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи на формирање биофилма, адхезију и вијабилност ћелија хумане гингиве и вредности микротврдоће глеђи“** представља добро дизајнирану студију која даје значајан и оригиналан научни и клинички допринос у области превентивне и дечје стоматологије. Научни проблем је детаљно образложен, циљеви истраживања су јасно дефинисани и методе истраживања су одговарајуће. Према мишљењу Комисије предложена тема је оригинална, актуелна и може представљати значајан научни искорак у области превентивне и дечје стоматологије, тако да испуњава све услове неопходне за приступање изради докторске дисертације.

Након увида и анализе целокупне документације, Комисија једногласном одлуком предлаже Наставно-научном већу да прихвати предлог теме докторске дисертације.

За менторе у изради ове докторске дисертације предлажу се:

- Први ментор: доц. др Милош Белоица, Стоматолошки факултет Универзитета у Београду
- Други ментор: проф. др Биљана Миличић, Стоматолошки факултет Универзитета у Београду.

Чланови Комисије:

---

Проф. др Дејан Марковић  
Стоматолошки факултет Универзитета  
у Београду

---

Доц. др Јелена Јулоски  
Стоматолошки факултет Универзитета  
у Београду

---

Проф. др Душка Благојевић  
Медицински факултет Универзитета у  
Новом Саду

На основу члана 53. Статута Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, Наставно научно веће Стоматолошког факултета, на седници одржаној 25.06.2024. године, донело је следећу

## О Д Л У К У

Усваја се позитиван извештај стручне комисије за оцену предлога теме докторске дисертације **др Милене Милановић**, под називом: **„Испитивање утицаја различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи на формирање биофилма, адхезију и вијабилност ћелија хумане гингиве и вредности микротврдоће глеђи“**.

Утврђује се да кандидат може приступити раду на докторској дисертацији под наведеним називом, под условом да се са извештајем комисије и одлуком овог Већа сагласи Веће научних области медицинских наука Универзитета у Београду.

За менторе кандидату, именују се доц. др Милош Белоица и проф. др Биљана Миличић.

Доставити: Већу научних области медицинских наука Универзитета у Београду, Именованом/ој, Менторима (2), Наставно научном већу, Одсеку за наставу и Писарници

Референт кадровског одсека  
Виолета Растовић

Декан  
Стоматолошког факултета  
Универзитета у Београду

Проф. др Алекса Марковић

Факултет Стоматолошки факултет

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

---

(Број захтева)

---

Веће научних области медицинских наука(Назив већа научне области коме се захтев  
упућује)

---

(Датум)**ЗАХТЕВ****за давање сагласности на одлуку о прихватању теме докторске дисертације и  
о одређивању ментора**

Молимо да, сходно чл. 48 ст. 5 тач. 3) Статута Универзитета у Београду („Гласник Универзитета“ бр. 201/2018, 207/2019, 213/2020, 214/2020, 217/2020, 230/21, 232/22, 233/22 и 236/22), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

**Испитивање утицаја различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи на формирање биофилма, адхезију и вијабилност ћелија хумане гингиве и вредности микротврдоће глеђи**

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ Стоматолошке науке

## ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног од родитеља и презиме кандидата:

Милена (Ружица) Милановић

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета, студијски програм):

Стоматолошки факултет Универзитета у Београду, Интегрисане основне и мастер академске студије

3. Година завршетка

претходног нивоа студија: 2017

4. Година уписа на докторске студије:

2018

5. Назив студијског програма
- 
- докторских студија:

Базична и клиничка истраживања у стоматологији

6. Датум подношења пријаве
- 
- теме докторске дисертације

22.05.2024.

#### ПОДАЦИ О МЕНТОРУ:

Име и презиме ментора: **Милош Белонца**

Звање: **Доцент**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Radovanović J, Antonijević B, Baralić K, Ćurčić M, Đukić-Ćosić D, Bulat Z, Javorac D, Buha Đorđević A, Kotur-Stevuljević J, Sudar-Milovanović E, Antonijević Miljaković E, **Beloica M**, Mandinić Z. Redox and biometal status in Wistar rats after subacute exposure to fluoride and selenium counter-effects. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2022 Sep 30;73(3):207-222. doi: 10.2478/aiht-2022-73-3650.
2. Milanović M, **Beloica M**, Jovičić O, Mandinić Z, Janjić B, Juloski J. Oral manifestations and rehabilitation of a patient with osteogenesis imperfecta. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*. 2021 Nov-Dec; 149(11-12): 708-712. doi: 10.2298/SARH210722083M
3. Mandinic Z, Prokić A, Ivanović M, Jovanovic S, Jovičić O, **Beloica M**. Habits, attitudes and behavior of refugees and migrants in Serbia in relation to oral health. *Vojnosanitetski preglod*. 2021. 79(00):46-46; doi: 298/VSP210127046M
4. Josic U, Radovic I, Juloski J, **Beloica M**, Popovic M, Alil A, Mandic J. Can Fiber-post Placement Reinforce Structurally Compromised Roots? *J Adhes Dent*. 2020;22(4):409-414. doi: 10.3290/j.jad.a44872. PMID: 32666067.
5. Vukovic A, Vukovic R, Markovic D, Soldatovic I, Mandinic Z, **Beloica M**, Stojan G. After-Hours Versus Office-Hours Dental Injuries in Children: Does Timing Influence Outcome? *Clin Pediatr (Phila)*. 2016 Jan;55(1):29-35. doi: 10.1177/0009922815584214.

#### ПОДАЦИ О МЕНТОРУ:

Име и презиме ментора: **Биљана Миличич**

Звање: **Редовни професор**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Jakovljevic A, Nikolic N, Jacimovic J, Pavlovic O, **Milicic B**, Beljic-Ivanovic K, Miletic M, Andric M, Maasin J. Prevalence of Apical Periodontitis and Conventional Nonsurgical Root Canal Treatment in General Adult Population: An Updated Systematic Review and Meta-analysis of Cross-sectional Studies Published between 2012 and 2020. *J Endod*. 2020 Oct;46(10):1371-1386.e8. doi: 10.1016/j.joen.2020.07.007.
2. Lackovic M, Filimonovic D, Mihajlovic S, **Milicic B**, Filipovic I, Rovcanin M, Dimitrijevic D, Nikolic D. The Influence of Increased Prepregnancy Body Mass Index and Excessive Gestational Weight Gain on Pregnancy Course and Fetal and Maternal Perinatal Outcomes. *Healthcare (Basel)*. 2020 Sep 24;8(4):362. doi: 10.3390/healthcare8040362.
3. Kuzmanovic Pfcier J, Dodic S, Lazic V, Trajkovic G, Milic N, **Milicic B**. Occlusal stabilization splint for patients with temporomandibular disorders: Meta-analysis of short and long term effects. *PLoS One*. 2017 Feb 6;12(2):e0171296. doi: 10.1371/journal.pone.0171296.
4. Dragovic M, Pejovic M, Stepic J, Colic S, Dozic B, Dragovic S, Lazarevic M, Nikolic N, Milasin J, **Milicic B**. Comparison of four different suture materials in respect to oral wound healing, microbial colonization, tissue reaction and clinical features-randomized clinical study. *Clin Oral Investig*. 2020 Apr;24(4):1527-1541. doi: 10.1007/s00784-019-03034-4.
5. Stasic JN, Pfcier JK, **Milicic B**, Puač N, Miletic V. Effects of non-thermal atmospheric plasma on dentin wetting and adhesive bonding efficiency: Systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2021 Sep;112:103765. doi: 10.1016/j.jdent.2021.103765.

Обавештавамо вас да је

**НАСТАВНО НАУЧНО ВЕЋЕ**

(назив надлежног тела факултета)

на седници одржаној 25.06.2024. размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације јер садржи оригиналну идеју и да је од значаја за развој науке, примену њених резултата, односно развој научне мисли уопште.

**ДЕКАН ФАКУЛТЕТА**

Проф. др Алекса Марковић

- Прилог
1. Одлука Наставно-научног већа о прихватању теме и одређивању ментора
  2. Извештај Комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

**Напомена:** Факултет доставља Универзитету захтев са прилозима у електронској форми и у једном писаном примерку за архиву Универзитета

На основу члана 21. и члана 92. став 1. тачка 1. Статута Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, продекан за научноистраживачку делатност доноси следећу

## **ОДЛУКУ**

**Милени Милановић**, број индекса: 4004/2018, студенту докторских академских студија Стоматологије, одобрава се мировање права и обавеза студента у школској 2022/23. години због болести.

## **Образложење**

**Милена Милановић**, број индекса: 4004/2018, студент докторских академских студија Стоматологије упутила је допис бр. 31/54 од 04.07.2023. године са молбом да јој се одобри мировање права и обавеза студената у школској 2022/23. години због болести.

Разматрајући молбу именоване, као и приложену документацију, донета је одлука као у диспозитиву.

### **Одлуку доставити:**

*Именованој;  
Студентској служби;  
Писарници.*

**Дипломирани правник  
Николија Мартић**

---

**Продекан за научноистраживачку  
делатност  
Стоматолошког факултета  
проф. др Ивана Радовић**

---