Универзитет у Београду
СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ
Београд, Улица др Суботића бр. 8, тел: 2685-288
e-mail: stomf@stomf.bg.ac.rs
web: www.stomf.bg.ac.rs

ISO 9001 BUREAU VERITAS Certification

ЕТИЧКИ ОДБОР

61-36/54

11-06-2026

На молбу др Јована Бадњара Етички одбор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, на електронској седници одржаној дана 08.06.2026. године, даје

САГЛАСНОСТ

Др Јовану Бадњар за спровођење истраживања у оквиру израде докторске дисертације под називом:

„ЕФЕКАТ КОНТИНУИРАНЕ ХЕЛАЦИЈЕ И КАЛЦИЈУМ СИЛИКАТНИХ МАТЕРИЈАЛА НА ОСЛОБАЂАЊЕ БИОАКТИВНИХ МОЛЕКУЛА ИЗ ХУМАНОГ ДЕНТИНА И ОДОНТОГЕНУ ДИФЕРЕНЦИЈАЦИЈУ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА АПИКАЛНЕ ПАПИЛЕ“

и у друге сврхе се не може користити.

Београд,
08.06.2026.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ 1948 БЕОГРАД

ПРЕДСЕДНИК ЕТИЧКОГ ОДБОРА

/Проф. др Наташа Николић Јакоба/

ЕФЕКАТ КОНТИНУИРАНЕ ХЕЛАЦИЈЕ И КАЛЦИЈУМ СИЛИКАТНИХ МАТЕРИЈАЛА НА ОСЛОБАЂАЊЕ БИОАКТИВНИХ МОЛЕКУЛА ИЗ ХУМАНОГ ДЕНТИНА И ОДОНТОГЕНУ ДИФЕРЕНЦИЈАЦИЈУ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА АПИКАЛНЕ ПАПИЛЕ

ПРЕДМЕТ ИСТРАЖИВАЊА

Дентин представља минерализовано ткиво које садржи 70% неорганског, 20% органског дела и 10% воде. Неорганski део чине соли калцијума и фосфата организоване у виду кристала хидроксиапатита. Органски део дентина, односно дентински матрикс, већински се састоји од колагена тип I (90%) док остатак чине неколагени протеини (NCP, енг. *non-collagenous proteins*) (Nanci, 2018). Неколагени протеини обухватају различите структуралне протеине, факторе раста, хемокине, цитокине и ензиме који се једним именом називају биоактивни (сигнални) молекули (Smith и сар., 2012). Дентин је препознат као резервоар (депо) биоактивних молекула који остварују кључну улогу у процесима репарације и регенерације пулпо-дентинског комплекса (Smith и сар., 2012). Наиме, током дентиногенезе, биоактивни молекули секретовани од стране одонтобласта уграђују се у структуру дентина и формирају депо (Smith и сар., 1998; Baker и сар., 2009). Услед оштећења дентина, било каријесним процесом или јатрогено, посредством различитих средстава (нпр. ириганаси) или стоматолошких материјала, долази до њиховог ослобађања и последичне стимулације ћелијске миграције, пролиферације и диференцијације што резултује ткивном репарацијом или регенерацијом (Dung и сар., 1995; Chae и сар., 2018; Wattanapakkavong и Srisuwan, 2019).

Фактори раста су кључни биоактивни молекули који учествују у регулацији пролиферације, диференцијације и миграције ћелија, чиме доприносе репараторним процесима и очувању функционалног интегритета пулпо-дентинског комплекса (Schmalz и сар., 2017). У дентинском матриксу до сада је забележено присуство великог броја фактора раста попут трансформишућег фактора раста β1 (енгл. *Transforming growth factor β1* – TGF-β1), васкуларног ендотелног фактора раста (енгл. *Vascular endothelial growth factor* – VEGF), тромбоцитног фактора раста (енгл. *Platelet-derived growth factor* – PDGF) и других (Smith и сар., 2012). TGF-β1 је један од најважнијих дентиногених фактора раста који усмерава диференцијацију мезенхималних ћелија у одонтобластима сличне ћелије (Bai и сар., 2023). Ипак, овај ефекат је ограничен на фазу ране диференцијације јер продужено излагање мезенхималних ћелија овом фактору раста инхибира експресију *dspp* гена и смањује депоновање минерализованог ткива (Bai и сар., 2022). С друге стране, иако се VEGF и PDGF најчешће повезују са процесима ангиогенезе (Zhang и сар., 2011; Jiang и сар., 2025), студије су показале да ови фактори раста могу усмерити диференцијацију мезенхималних матичних ћелија у правцу одонтобластима сличних ћелија, чиме се истиче њихов дентиногени потенцијал (Aksel и Huang, 2017; Zhang и сар., 2017; Okada и сар., 2025). Такође, показано

је да VEGF и PDGF испољавају изражене митогене и хемотактичке ефекте на мезенхималним матичним ћелијама (Pan и сар., 2024; Xu и сар., 2024).

Осим фактора раста, кључну улогу у репараторним процесима зубних ткива имају и SIBILING молекули (енг. *small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein;* мали интегрин-везујући лиганд, N-везани гликопротеин) (Butler и Ritchie, 1995). Ова породица структуралних не-колагених протеина обухвата више молекула укључујући дентин сијалофосфопротеин (енгл. *Dentin Sialophosphoprotein* - DSPP) и дентински матриксни протеин 1 (енгл. *Dentin matrix acidic phosphoprotein 1* - DMP-1) (Fisher и сар., 2001). Синтетисани од стране одонтобласта током дентиногенезе, ови молекули имају кључну улогу у процесима минерализације дентина (Ye и сар., 2004; Liu и сар., 2021). DSPP представља инактивни прекурсорски протеин који се активира деобом, чиме настају функционални фрагменти попут дентин сијалопротеина (енгл. *Dentine sialoprotein* – DSP) (Yamakoshi и сар., 2005). DSP учествује у иницијацији минерализације дентинског матрикса (Suzuki и сар., 2009). Такође, показано је да DSP доводи до пролиферације, миграције и одонтобластне диференцијације мезенхималних матичних ћелија (Wan и сар., 2016; Li и сар., 2017). Експресија гена за DMP-1 је у одонтобластима најизраженија током секреције примарног дентина, а касније опада (Hao и сар., 2004). Показано је да се у присуству DMP-1 промовише одонтобластна диференцијација матичних ћелија зубне пулпе (Chaussain и сар., 2009). Индукцијом експресије гена за DMP-1 у мезенхималним матичним ћелијама иницира се њихова одонтобластна диференцијација (Narayanan и сар., 2001) праћена стимулацијом експресије гена за DSPP (Narayanan и сар., 2006). Стога, DMP-1 представља регулатор нивоа DSPP (Ye и сар., 2004).

Основни принцип успешне репарације односно регенерације ткива подразумева сигналну каскаду која функционише као сложен секвенцијални механизам укључујући компоненте као што су биоактивне сигналне молекуле и циљне ћелије. Циљне ћелије од посебног значаја за регенерацију и репарацију ткива су матичне ћелије (Kim и Kim, 2025). Зубна ткива представљају богат извор мезенхималних матичних ћелија (Egusa и сар., 2012). У ткиву апикалне папиле, идентификоване су мезенхималне матичне ћелије познатије као матичне ћелије апикалне папиле (SCAP; енг. *stem cells from the apical papilla*) (Sonoyama и сар., 2008). Захваљујући израженом пролиферативном потенцијалу, способности миграције и мултипотентности, SCAP представља значајан ћелијски извор у процесима репарације пулпо-дентинског комплекса (Huang и сар., 2025). Поред могућности диференцијације у одонтобластима сличне ћелије и учешћа у формирању репараторног дентина (Sonoyama и сар., 2006), њихов потенцијал за диференцијацију у ендотелу сличне (Yi и сар., 2021) и неуронима сличне ћелије (Liu и сар., 2022) указује на могућу улогу у регенерацији васкуларних и нервних компоненти пулпног ткива. Ово је од посебног значаја у регенеративној ендодонцији (Huang и сар., 2025).

Ендодонтски третман зуба представља једну од најчешћих стоматолошких интервенција. Светска преваленција особа са најмање једним ендодонтски леченим зубом износи чак 55,7%, док посматрано на нивоу свих зуба у општој популацији, преваленција

ендодонтски лечених зуба износи 8,2% (León-López и сар., 2022). Преваленција ендодонтски лечених зуба значајно варира у зависности од географског подручја. Европа бележи високу преваленцију где 59,6% популације има најмање један ендодонтски лечен зуб (León-López и сар., 2022). У појединим деловима Скандинавије и Источне Европе, ови проценти у старијим популацијама достижу и преко 80% (León-López и сар., 2022). Познато је да савремени ендодонтски третман укључује примену средстава за иригацију канала корена зуба (ириганаси) и биоактивних стоматолошких материјала као што су калцијум силикатни материјали (Wang и сар., 2023; Zou и сар., 2024). Ова средства односно материјали имају различите, али комплементарне улоге у дезинфекцији и заптивању система коренских канала што је од великог значаја за успех ендодонтске терапије. Међутим, потребно је истаћи да позитивном клиничком терапијском исходу ендодонтске терапије у значајној мери доприноси ефекат ириганаса и биоактивних материјала на мобилизацију биоактивних молекула из локалних ткива што заправо одражава природни механизам зарастања рана (Schmalz и сар., 2017). Стога, са физиолошког аспекта, а у контексту репарације и регенерације ткива, предност ослобађања биоактивних молекула из дентина је локална доступност, на месту одвијања процеса репарације/регенерације, и погодност за брзо индуковање сигналних процеса на ћелијском нивоу у зубној пулпи и другим околним ткивима (Schmalz и сар., 2017).

Званичан протокол иригације за већину ендодонтских терапијских захвата до данас није формиран, и у клиничкој пракси су у употреби различити протоколи (Boutsioukis и Arias-Moliz, 2022). Препоручени протокол иригације подразумева коришћење натријум хипохлорита (NaOCl), снажног органолитика и антимикробног средства, током читавог трајања механичке инструментације канала, чиме се константно обезбеђује нова количина свежег раствора, неопходна због убрзаног трошења слободног хлора у контакту са органским ткивом и дентинским дебријем (Boutsioukis и Arias-Moliz, 2022). Након завршене механичке препарације канала, приступа се финалној иригацији која подразумева коришћење хелатора ради уклањања размазног слоја, као и следствену иригацију са NaOCl ради уклањања заосталих микроорганизама из дентинских тубула (Zou и сар., 2024). Овакав концепт иригације где се раствор NaOCl и хелатора користе један за другим без мешања назива се секвенцијална хелација (Ballal и сар., 2024). У сврхе секвенцијалне хелације у ендодонтској терапији се користе различити раствори попут етилендиаминотетраацетата (EDTA), лимунске киселине, и др. (Fortea и сар., 2024).

Насупрот томе, концепт континуиране хелације заснива се на коришћењу једног раствора током читавог трајања ендодонтске терапије. Идеја да се хелатор, отпоран на оксидацију, комбинује директно са раствором натријум хипохлорита, како би се убрзало и поједноставило чишћење коренског канала током ендодонтских процедура, датира пре више од 20 година (Girard и сар., 2005). Континуираном хелацијом постижу се органолитички, антимикробни и минералолитички ефекти у једном раствору, чиме се поједностављује и убрзава процедура иригације (La Rosa и сар., 2024). Раствори за континуирану хелацију остварују компарабилне или чак боље антимикробне и

органолитичке и минералолитичке ефекте у односу на NaOCl и секвенцијалну хелацију (Giardino и сар., 2019; Kfir и сар., 2020; Wright и сар., 2020b; Campello и сар., 2022; La Rosa и сар., 2024; Razumova и сар., 2025).

Бисфосфонати представљају класу лекова намењених третману ресорптивних коштаних обољења попут Пагетове болести, остеопорозе, мултиплог мијелома, као и метастатских тумора на костима. Први пут синтетисани средином 19. века, бисфосфонати су се примарно користили као индустријски хелатни агенси, а тек од 60-их година 20. века користе се за лечење клиничких поремећаја метаболизма калцијума (Russell, 2011). У зависности од присуства азота у оквиру бочних ланаца, бисфосфонати су подељени у две велике групе – без- азотне бисфосфонате (NN-BP; нпр, етидронат, клодронат) и азотне бисфосфонате (N-BP; памидронат, алендронат, золедронат). Ове две групе се разликују, како по афинитету за везивање хидроксилапатита у корист N-BP, тако и по другачијим ћелијским механизмима инхибиције ресорпције коштаног ткива (Russell и сар., 2008). Појавом N-BP који представљају новије и потентније инхибиторе ресорпције коштаног ткива, клинички значај NN-BP у терапији примарних индикација је смањен (Ganesan и сар., 2025). Међутим, данас, етидронат се и даље користи као хелатор у индустрији, тачније козметичкој индустрији (Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, 2017), а даљом пренаменом, индикација за његову примену укључује и континуирану хелацију у стоматологији.

Етидронат (HEDP; енг. *hydroxyethylidene diphosphonic acid*) је слаб хелатор, алкалног pH, и представља једини, до сада регистровани раствор (на територији ЕУ) на бази бисфосфоната, за употребу у континуираној хелацији, под фабричким називом *Dual Rinse HEDP* (Zollinger и сар., 2018). *In vitro* студије су показале да 2,5% NaOCl + 9% HEDP мешавина има боља антимикробна својства у односу на хипохлорит (Campello и сар., 2022), што је нарочито изражено у присуству дентинског дебрија и размазног слоја (Arias-Moliz и сар., 2016; Morago и сар., 2016). Ово се објашњава константним уклањањем размазног слоја и дебрија од стране HEDP, што омогућава раствору NaOCl да континуирано буде у контакту са микроорганизмима унутар дентинских тубула (Paqué и сар., 2012; Arias-Moliz и сар., 2016). Органолитички ефекти раствора за континуирану хелацију са HEDP су благо редуковани у односу на хипохлорит што је последица реакције NaOCl и HEDP и смањења концентрације OCl^- јона, главних јона одговорних за органолитички ефекат NaOCl (Tartari и сар., 2015; Wright и сар., 2020b). Минералолитички ефекти у мешавини 2,5% NaOCl + 9% HEDP су очувани (Ballal и сар., 2019). Ипак, како се зарад компатибилности са NaOCl користе тетранатријумове соли HEDP са високим pH, хелација је спорија у поређењу са секвенцијалном хелацијом, али резултати показују да је једнако ефективна (Deari и сар., 2019; Kfir и сар., 2020). С обзиром на чињеницу да је HEDP слабији хелатор од EDTA, показано је да континуирана хелација етидронатом мање оштећује механичка својства дентина у односу на секвенцијалну хелацију (Ballal и сар., 2024).

Клодронат представља други бисфосфонат предложен 2020. године као потенцијални хелатор за коришћење у протоколу континуиране хелације као алтернатива HEDP-у (Wright и сар., 2020a). Највећа предност клодроната у односу на HEDP је чињеница да у мешавини

са 5% NaOCl, задржава непромењене концентрације слободног хлора преко 18 сати (Wright и сар., 2020a). Установљено је да мешавина 5% NaOCl + 7,6% клодроната има унапређена органолитичка својства у односу на 5% NaOCl + 7,7% HEDP (Wright и сар., 2020b). Оваква органолитичка својства мешавине клодроната су компарабилна са 5% NaOCl (Wright и сар., 2020b). Антимикробна својства мешавине клодроната и хипохлорита су очувана и компарабилна са NaOCl (Wright и сар., 2021a). Иако мешавина NaOCl и клодроната уклања размазни слој са зидова канала, примећено је да заостаје део размазног слоја који оклудира улазе у дентинске тубуле (Wright и сар., 2020a). Проценат оклудираних тубула је већи у односу на NaOCl и HEDP мешавину (Wright и сар., 2020a). Претпоставља се да је разлог томе нижи афинитет клодроната ка калцијуму од HEDP, што се огледа у нижој константи стабилности са калцијумом (Martell и Smith, 1989). Механичка својства дентина након иригације раствором NaOCl и клодроната, укупног трајања од 1 сата, компарабилна су са протоколом секвенцијалне хелације, где је EDTA била у контакту са дентином 2 минута, што потврђује да је клодронат слабији хелатор од EDTA, као и чињеницу да у алкалној средини, попут оној у растворима за континуирану хелацију, мање Ca^{2+} јона бива доступно хелацији, јер базна средина погодује преципитацији, а не дисолуцији хидроксиапатита (Dawes, 2003; Wright и сар., 2021b).

Раствори за иригацију, као што су NaOCl, EDTA и друга хелатна средства, могу изменити састав и структуру дентина, чиме утичу на ослобађање биоактивних молекула пореклом из дентина (Tavares и сар., 2021). Као што је већ поменуто, ово иригацији даје важну биолошку димензију, нарочито у регенеративној ендодонцији, где ослобођени молекули могу утицати на понашање матичних ћелија, ангиогенезу и регенерацију/репарацију ткива (Smith и сар., 2016; De Oliveira и сар., 2025). С обзиром на органолитичко својство, раствор NaOCl денатурише факторе раста из дентина (Galler и сар., 2015). У секвенцијалној хелацији показано је да раствор 17% EDTA значајно ублажује негативне ефекте нижих концентрација NaOCl (*0,5%, 1,5%, 3%*) те га је неопходно применити у случајевима када је репарација пулпо- дентинског комплекса од значаја у терапији (Martin и сар., 2014; Kim и сар., 2018). EDTA може да ослободи биоактивне молекуле из дентинског матрикса као последица хелатних и деминерализујућих ефеката овог раствора на дентин (Dos Reis-Prado и сар., 2022). Најчешће испитивано је ослобађање TGF-β1 са највећим бројем студија које показују успешно ослобађање овог фактора раста посредством EDTA (Galler и сар., 2015; Chae и сар., 2018; Ivica и сар., 2019; Sungur и сар., 2019; Atesci и сар., 2020). EDTA није била у стању да ослободи VEGF (Sadaghiani и сар., 2016; Atesci и сар., 2020) или су ослобођене концентрације ниске (Galler и сар., 2015). PDGF је детектован у дентинском матриксу након излагања дентинског праха дејству EDTA (Roberts-Clark i Smith, 2000; Duncan и сар., 2017).

Малобројне студије о утицају етидроната примењеног у оквиру секвенцијалне хелације на ослобађање биоактивних молекула из дентина су показале да 9% раствор етидроната ослобађа компарабилне или веће концентрације фактора раста (TGF-β1, VEGF) у поређењу са 17% EDTA (Sungur и сар., 2019; Khan и сар., 2021; Mumcu и сар., 2024). Једина студија

која се бавила утицајем континуиране хелације (етидронатом и клодронатом) на ослобађање биоактивних молекула из дентина је испитивала ослобађање TGF-β1, након апликације интраканалних медикамената и следствене иригације (Sridhar и сар., 2025). Резултати ове студије су показали да раствор 9% етидроната са 1,5% NaOCl ослобађа компарабилне концентрације TGF-β1 у поређењу са протоколом секвенцијалне хелације (1,5% NaOCl/17% EDTA) док 1,5% NaOCl + 7,6% клодронат, у зависности од примењеног медикамента, ослобађа компарабилне или веће концентрације TGF-β1 у односу на исти протокол секвенцијалне хелације (Sridhar и сар., 2025). Такође, 1,5% NaOCl + 7,6% клодронат ослобађа веће концентрације TGF-β1 у односу на 1,5% NaOCl + 9% етидронат, независно од примењеног медикамента (Sridhar и сар., 2025).

Што се тиче цитотоксичности раствора за континуирану хелацију на матичне ћелије литературни подаци су такође малобројни. Етидронат испољава индиректни цитотоксични ефекат на мезенхималним матичним ћелијама пулпе, највероватније као последица хелације јона калцијума и магнезијума неопходних за адхезију ћелија за подлогу (Ballal и сар., 2019; Sungur и сар., 2019). Ипак, у раствору за континуирану хелацију са 2,5% NaOCl, 9% етидронат нема већу цитотоксичност од 2,5% хипохлорита, што показује да је цитотоксичност раствора за континуирану хелацију последица присуства слободних јона хлора порекла од NaOCl (Ballal и сар., 2019). Међутим, до сада нема литературних података о цитотоксичном ефекту бисфосфонатних раствора (етидроната и клодроната), како самих тако и у раствору за континуирану хелацију, на SCAP, као ни о утицају раствора за континуирану хелацију на њихову диференцијацију.

Литературни подаци показују потенцијалну примену раствора за континуирану хелацију у току регенеративних ендодонтских процедура (Akyüz и сар., 2025), стога испитивање биолошких ефеката ових раствора, односно утицаја на ослобађање биоактивних молекула из дентина и вијабилност и одонтогену диференцијацију SCAP је од посебног значаја јер, иако присутни само кратак, ограничени временски период у каналу корена зуба, потенцијално могу утицати на регенеративне/репараторне процесе зубних ткива ремећи сигналне процесе.

Калцијум силикатни материјали (engl. *Calcium silicate based materials* – CSBM) представљају биокомпатибилне и биоактивне материјале који налазе примену у великом броју индикација где долазе у директан контакт са дентинским, пулпним и периапикалним ткивима (Küçükkaya Eren, 2023). Материјали попут минерал триоксид агрегата (engl. *mineral trioxide aggregate* – MTA) и Биодентина (*Biodentine, Septodont, France*) представљају неке од најзначајнијих представника CSBM. Биоактивност CSBM се огледа у њиховој способности покретања и модулације молекуларних и ћелијских механизама који воде ка репарацији пулпо- дентинског комплекса (Schmalz и сар., 2023). Између осталог, показано је да MTA и Биодентин могу да ослободе различите биоактивне молекуле попут TGFβ1 из дентина (Tomson и сар., 2017; Wattanapakkavong и Srisuwan, 2019). Ово се дешава током процеса везивања CSBM где долази до стварања калцијум хидроксида ($CaOH_2$) и последичне протеолизе дентинског матрикса под утицајем хидроксилних јона (Huang и сар.,

2018).

Познато је да је Биодентин биокомпатибилан CSBM са временски зависним ефектом на вијабилност SCAP. У *in vitro* студијама је показано да Биодентин може да индукује одонтогену диференцијацију SCAP, што се огледа у појачаној експресији гена карактеристичних за одонтогену диференцијацију (DSPP, DMP-1, остеокалцин, транскрипциони фактор 2 (енг. *Runt-related transcription factor 2* – Runx2), алкална фосфатаза) (Wongwatanasanti и сар., 2018; Saberi и сар., 2019). Ефекти Биодентина на одонтогену диференцијацију SCAP се могу запазити и кроз минерализациони потенцијал као и активност алкалне фосфатазе (енг. *Alkaline phosphatase* – ALP). Наиме, у присуству Биодентина долази до депоновања калцијума и минерализације (Wongwatanasanti и сар., 2018). Активност ALP је испитивана у само једној студији где је примећен дозно зависан ефекат овог материјала на ензимску активност (Saberi и сар., 2019).

Примена раствора за иригацију и биоактивних стоматолошких материјала, као што су калцијум силикатни материјали, током ендодонтске терапије је неопходна за постизање задовољавајућег терапијског исхода. Како терапијски исход зависи од одговора ткива на примену терапијских средстава и материјала, разумевање њихових ефекта са биолошког аспекта је од великог значаја и захтева пажљив приступ у истраживањима. Њихово адекватно комбиновање и редослед примене је круцијалан како би се избегли нежељени биолошки ефекти. Значај разумевања ефекта симултане примене средстава за иригацију и материјала на сигналне путеве одговорне за репарацију и регенерацију ткива је препознат у литератури (Schmalz и сар., 2017). Међутим, у литератури нема података о утицају континуиране хелације, посебно новог раствора, клодроната са натријум хипохлоритом, на нивоу ослобађања биоактивних молекула из дентина, као ни на одонтогени диференцијациони потенцијал матичних ћелија апикалне папиле, како самостално, тако ни у присуству калцијум силикатних материјала.

РАДНЕ ХИПОТЕЗЕ

Имајући у виду досадашња сазнања постављене су следеће хипотезе:

1. Раствори за континуирану хелацију (мешавина етидроната са натријум хипохлоритом и мешавина клодроната са натријум хипохлоритом) ослобађају веће концентрације биоактивних молекула из дентина у поређењу са секвенцијалном хелацијом (применом натријум хипохлорита и EDTA) и позитивно утичу на исти ефекат Биодентина, при чему мешавина клодроната са натријум хипохлоритом ослобађа веће концентрације биоактивних молекула из дентина у односу на мешавину етидроната са натријум хипохлоритом;
2. Раствори за континуирану хелацију (мешавина етидроната са натријум хипохлоритом и мешавина клодроната са натријум хипохлоритом) испољавају цитотоксичне ефекте на матичне ћелије апикалне папиле и инхибирају диференцијацију SCAP, док присуство Биодентина умањује ову инхибицију.

ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу свега наведеног постављени су следећи циљеви истраживања:
А. Испитивање ослобађања биоактивних молекула:

1. испитати ефекат Биодентина, MTA и калцијум хидроксида на ослобађање биоактивних молекула (TGFβ1, VEGF, PDGF и DSP) на моделу парова дентинских дискова, одредити њихове концентрације и извршити компаративну анализу;
2. испитати ефекат раствора за континуирану хелацију, како раствора који већ постоји у клиничкој примени (етидронат са натријум хипохлоритом), тако и новог раствора, клодроната са натријум хипохлоритом, на ослобађање биоактивних молекула (TGFβ1, VEGF, PDGF и DSP) на моделу парова коренских сегмената, одредити њихове концентрације и извршити компаративну анализу;
3. испитати ефекат раствора за континуирану хелацију, како раствора који већ постоји у клиничкој примени (етидронат са натријум хипохлоритом), тако и новог раствора, клодроната са натријум хипохлоритом, на ослобађање биоактивних молекула (TGFβ1, VEGF, PDGF и DSP) у присуству Биодентина на моделу парова коренских сегмената, одредити њихове концентрације и извршити компаративну анализу.

Б. Испитивање цитотоксичног ефекта и диференцијације матичних ћелија апикалне папиле (SCAP):

1. испитати цитотоксични ефекат раствора за континуирану хелацију, како раствора који већ постоји у клиничкој примени (етидронат са натријум хипохлоритом), тако и новог раствора, клодроната са натријум хипохлоритом, на матичним ћелијама апикалне папиле (SCAP) и извршити компаративну анализу;
2. испитати утицај раствора за континуирану хелацију, како раствора који већ постоји у клиничкој примени (етидронат са натријум хипохлоритом), тако и новог раствора, клодроната са натријум хипохлоритом, на одонтогени диференцијациони потенцијал матичних целија апикалне папиле (SCAP) у присуству Биодентина и извршити компаративну анализу

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Предложено истраживање представља академско некомерцијално *in vitro* научно истраживање неинвазивног карактера на екстрахованим зубима и на матичним ћелијама изолованим из апикалне папиле (SCAP; енг. *stem cells of apical papilla*) које ће бити спроведено у складу са принципима Хелсиншке декларације, Добре клиничке праксе (енгл. *Good Clinical Practice - GCP*) и Добре лабораторијске праксе (енгл. *Good Laboratory Practice - GLP*) уз одобрење Етичког одбора Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. Истраживање ће бити спроведено у организационим јединицама Стоматолошког факултета

Универзитета у Београду, и то у лабораторијама Имлантолошко истраживачког центра и на Клиници за оралну хирургију, уз сагласност управника организационих јединица по добијању одобрења Етичког одбора.

Сви материјали и препарати који ће бити коришћени у студији користиће се искључиво у истраживачке сврхе у *in vitro* условима у складу са стандардним процедурама и упутствима произвођача.

Испитивање ефекта калцијум силикатних материјала Биодентина и MTA (контролни калцијум силикатни материјал), као и калцијум хидроксида (контрола) на ослобађање биоактивних молекула на моделу парова дентинских дискова

Истраживање ће бити спроведено на екстрахованим трећим доњим моларима који су прикупљени од пацијената Клинике за оралну хирургију Стоматолошког факултета у Београду код којих је индикована екстракција трећих доњих молара из ортодонтских разлога. За потребе истраживања биће потребно укупно 32 интактна зуба без присутних каријесних лезија, фрактура, претходних терапијских процедура и без значајних анатомских аномалија. Имајући у виду да ће се истраживање спроводити на моделу парова дентинских дискова, од укупно 32 зуба биће изрезана 64 диска.

Величина узорка и снага студије за прву целину – Према литературним подацима у студијама о испитивању ослобађања фактора раста из дентина (независно од тога да ли је коришћен дентински диск или корен), величина узорка од 3 до 4 узорка по групи представља најчешћи број узорака адекватан за постизање релевантних резултата студије (Zeng и сар., 2016; Chae и сар., 2018). Међутим, како ће у овом истраживању бити коришћен модел парова дентинских дискова (литературни подаци на сличном моделу нису доступни), да би се обезбедило да потенцијално добијене разлике у ефектима буду последица примењених материјала, а не интериндивидуалних разлика у базалним нивоима биоактивних молекула дентина између независних узорака ткива, величина узорка и снага студије су одређене на основу података добијених анализом резултата спроведеног прелиминарног истраживања на истом моделу парова дентинских дискова на основу вредности концентрација TGFβ1, као модела биоактивног молекула (истраживање одобрено од стране Етичког одбора Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, број одобрења: 36/20). Како би се обезбедио довољно велики узорак да би се са поузданошћу забележила разлика између ефеката испитиваних материјала, са величином ефекта од 2,68, снагом студије од 80%, нивоом значајности (α) од 0,05 потребно је укључити 4 пара дентинских дискова по групи, односно 4 узорка по подгрупи. Величина узорка је израчуната помоћу софтверског пакета G*Power 3.1 software for Windows (Heinrich Heine-Universität, Düsseldorf, Germany) применом t-test family procedure (Means: Difference between two dependent means (matched pairs)). Дискови ће бити распоређени у 8 група (укупно 32 пара дискова), односно 16 подгрупа (укупно 64 диска).

Лабораторијски протокол *in vitro* студије на моделу парова дентинских дискова

Након екстракције доњи трећи молари биће испрани физиолошким раствором, а периодонцијум уклоњен са површине коренова пародонтолошком киретом. Зуби ће бити чувани у стерилним посудама са физиолошким раствором на 4°C до започињања лабораторијских процедура, не дуже од месец дана од дана екстракције.

Дискови дебљине 1,5mm биће изрезани из круничног дела зуба управно на њихову уздужну осовину дијамантским диском при брзини окретања од 600 обртаја/минуту, при константном воденом хлађењу. Помоћу трепан сврдала унутрашњег пречника 3,5mm, уз хлађење водом, из сваког тако добијеног диска биће изрезана по 2 истоветна дентинска диска пречника 3,5mm и висине 1,5mm. Због анатомске величине зуба, могуће је изрезати максимално два идентична дентинска диска наведених димензија (пречника 3,5mm и висине 1,5mm) и извршити међусобно поређење два везана узорка. Стога, формиране су следеће групе и подгрупе у оквиру којих ће парови дентинских дискова бити случајним избором распоређени:

Група 1 (негативна контрола модела):
- подгрупа 1 – без третмана
- подгрупа 2 – без третмана

Група 2 (позитивна контрола модела):
- подгрупа 1 – калцијум хидроксид
- подгрупа 2 – калцијум хидроксид

Група 3:
- подгрупа 1 – калцијум хидроксид
- подгрупа 2 – без третмана

Група 4:
- подгрупа 1 – МТА
- подгрупа 2 – без третмана

Група 5:
- подгрупа 1 – калцијум хидроксид
- подгрупа 2 – МТА

Група 6:
- подгрупа 1 – Биодентин
- подгрупа 2 – без третмана

Група 7:
- подгрупа 1 – калцијум хидроксид
- подгрупа 2 – Биодентин

Група 8:
- подгрупа 1 – Биодентин
- подгрупа 2 – МТА

У свакој групи ће бити распоређено по 4 пара дискова, тако да је сваком материјалу изложено по 4 узорка. Након апликације материјала, дискови ће бити постављени у инкубатор на 37°C са контролисаном влажности од 100% током 14 дана. Након 14 дана, дискови ће пажљиво бити очишћени од материјала, урођени у 1ml пуферисаног физиолошког раствора (PBS) и инкубирани на 37°C у току 24 часа. Раствори са PBS-ом ће потом бити замрзнути на -70°C све до квантификације биоактивних молекула ЕЛИСА (енгл. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA) методом.

Квантификација фактора раста и дентин сијалопротеина ЕЛИСА методом

За квантификацију фактора раста од интереса за ово истраживање (TGF-β1, VEGF, PDGF, DSP) биће коришћени доступни комерцијални ЕЛИСА китови. Процедура квантификације ЕЛИСА методом биће спроведена у складу са протоколом произвођача за сваки молекул. Добијене вредности оптичких густина биће очитане на ЕЛИСА читачу Rayto RT 2100C Microplate Reader (China). Резултати ће бити изражени у pg/ml.

Испитивање ефекта раствора за континуирану хелацију на ослобађање биоактивних молекула без и са присуством Биодентина на моделу парова коренских сегмената

Истраживање ће бити спроведено на екстрахованим доњим секутићима који су прикупљени од пацијената Клинике за оралну хирургију Стоматолошког факултета у Београду код којих је индикована обострана екстракција доњих секутића из протетских или пародонтолошких разлога. За потребе истраживања биће потребно укупно 44 интактних парова зуба, односно 88 доњих секутића, без присутних каријесних лезија, фрактура, претходних терапијских процедура и без значајних анатомских аномалија.

Величина узорка и снага студије за другу целину – Одређивање величине узорка је спроведено према истим принципима као за испитивање ефекта калцијум силикатних материјала на ослобађање дентинских биоактивних молекула на моделу парова дентинских дискова. Како ће у овом делу истраживања бити коришћен модел парова коренских сегмената (литературни подаци на сличном моделу, такође, нису доступни) како би се обезбедило да потенцијално добијене разлике у ефектима буду последица примењених ириганаса односно материјала, а не интериндивидуалних разлика у базалним нивоима биоактивних молекула дентина из независних узорака ткива, величина узорка и снага студије су одређене на основу података добијених анализом резултата спроведеног прелиминарног истраживања на истом моделу парова коренских сегмената на основу вредности концентрација TGFβ1, као модела биоактивног молекула (истраживање одобрено од стране Етичког одбора Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, број одобрења: 36/13). Како би се обезбедио довољно велики узорак да би се са поузданошћу забележила разлика између ефеката испитиваних ириганаса, са величином ефекта од 2,61, снагом студије од 80%, нивоом значајности (α) од 0,05 потребно је укључити 4 пара коренских сегмената по групи, односно 4 узорка по подгрупи. Величина узорка је израчуната помоћу софтверског пакета G*Power 3.1 software for Windows (Heinrich Heine-

Universität, Düsseldorf, Germany) применом t-test family procedure (Means: Difference between two dependent means (matched pairs)). Сегменти коренова ће бити распоређени у 11 група (укупно 44 пара сегмената корена), односно 22 подгрупе (укупно 88 сегмената корена).

Припрема раствора ириганаса

Сви раствори који ће бити коришћени у студији користиће се искључиво у истраживачке сврхе у *in vitro* условима у складу са стандардним процедурама и упутствима произвођача. У експериментима ће бити коришћен концентрован раствор 4% натријум-хипохлорита (*АДХИ Панонија, Панчево, Србија*), прах етидроната (*Dual Rinse HEDP, Medcem, Switzerland*) и прах клодроната (*Disodium Clodronate Tetrahydrate, TCI, Tokyo, Japan*). Од концентрованог раствора 4% хипохлорита биће направљена разблажења у испитиваним експерименталним концентрацијама применом редестиловане воде намењене за аналитичку и лабораторијску употребу (*Реахем, Нови Сад, Србија*) и то 1,5% и 3% раствор натријум-хипохлорита. Раствор 18% клодроната биће направљен мешањем праха клодроната и редестиловане воде. pH вредност овог раствора ће бити подешена на 10,7 применом натријум хидроксида (*NaOH, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA*). Мешањем 3% хипохлорита и 18% раствора клодроната у односу 1:1, биће добијена коначна концентрација раствора која ће бити коришћена у експериментима: 9% клодронат/1,5% хипохлорит. Раствор 9% етидроната/1,5% хипохлорита биће направљен према упутству произвођача, мешањем 10 mL 1,5% хипохлорита са саджајем капсуле у којој се прах етидроната испоручује. Поред њих, биће коришћени раствори 9% клодроната и 9% етидроната добијени додатним разблаживањем са редестилованом водом. Сви раствори ће бити прављени непосредно пре експеримената.

Лабораторијски протокол *in vitro* студије на моделу парова коренских сегмената

Након екстракције, доњи секутићи биће испрани физиолошким раствором, а периодонцијум уклоњен са површине коренова пародонтолошком киретом. Зуби ће бити чувани на -70°C до започињања лабораторијских процедура.

Сегменти коренова зуба биће формирани као што је описано у раду (Zeng и сар., 2016). Укратко, дужине сегмената корена биће стандардизоване на 12 mm, а канали корена биће припремљени до величине 100 ручним ендодонтским инструментима за препарацију канала корена зуба. Спољашња површина коренских сегмената ће бити прекривена лаком, тако да само унутрашња површина канала корена зуба остаје непокривена, односно изложена дејству ириганаса. Коренски сегменти ће са доње стране бити затворени кондензационим силиконом (*Oranwash L, Zhermack, Badia Polesine, Italy*) чиме се симулира затворени апекс у *in vitro* условима. Парови коренских сегмената ће случајним избором бити распоређени у следеће групе и подгрупе и третирани растворима ириганаса према протоколу дефинисаном за сваку групу, односно подгрупу:

Група 1 (контрола модела):
подгрупа 1- 1,5% NaOCl (20ml/5min) / 17% EDTA (20ml/5min)
подгрупа 2- 1,5% NaOCl (20ml/5min) / 17% EDTA (20ml/5min)
Група 2:
подгрупа 1- 1,5% NaOCl + 9% етидронат (20ml/5min)
подгрупа 2- 1,5% NaOCl (20ml/5min) / 17% EDTA (20ml/5min)
Група 3:
подгрупа 1- 1,5% NaOCl + 9% етидронат (20ml/5min)
подгрупа 2- дестилата (20ml/5min)
Група 4:
подгрупа 1- 1,5% NaOCl + 9% етидронат (20ml/5min)
подгрупа 2- 1,5% NaOCl (20ml/5min)
Група 5:
подгрупа 1- 1,5% NaOCl + 9% клодронат (20ml/5min)
подгрупа 2- 1,5% NaOCl (20ml/5min) / 17% EDTA (20ml/5min)
Група 6:
подгрупа 1 – 1,5% NaOCl + 9% клодронат (20ml/5min)
подгрупа 2 – дестилата (20ml/5min)
Група 7:
подгрупа 1 – 1,5% NaOCl + 9% клодронат (20ml/5min)
подгрупа 2 – 1,5% NaOCl (20ml/5min)
Група 8:
подгрупа 1 – 1,5% NaOCl + 9% клодронат (20ml/5min)
подгрупа 2 – 1,5% NaOCl + 9% етидронат (20ml/5min)
Група 9:
подгрупа 1 – 1,5% NaOCl + 9% етидронат
подгрупа 2 – 1,5% NaOCl + 9% етидронат → Биодентин
Група 10:
подгрупа 1 – 1,5% NaOCl + 9% клодронат
подгрупа 2 – 1,5% NaOCl + 9% етидронат → Биодентин
Група 11:
подгрупа 1 – 1,5% NaOCl / 17% EDTA
подгрупа 2 – 1,5% NaOCl / 17% EDTA → Биодентин

Након иригације, коренски сегменти ће бити урођени у 1ml PBS-а и инкубирани на 37°C у току 14 дана. Раствор PBS-а ће бити чуван на -70 °C све до квантификације биоактивних молекула ЕЛИСА методом.

Унутрашња површина канала коренских сегмената у групама 9, 10 и 11 ће након иригације бити испуњена Биодентином. По завршетку иницијалног везивања од 12 минута, Биодентин ће са горње и доње стране бити прекривен кондензационим силиконом ради

спречавања контакта материјала са CO2. Коренски сегменти ће бити постављени у инкубатор на 37°C са контролисаном влажности од 100% током 14 дана. Након 14 дана, коренски сегменти ће бити пресечени на два дела, Биодентин пажљиво уклоњен, а подељени сегменти урођени у по 1ml PBS-а и инкубирани на 37°C током 14 дана. Сви раствори ће потом бити замрзнути на -70°C све до квантификације биоактивних молекула ЕЛИСА методом.

Квантификација биоактивних молекула ЕЛИСА методом

Као и у делу истраживања везаном за одређивање концентрација биоактивних молекула ослобођених из дентина под дејством калцијум силикатних материјала, за квантификацију биоактивних молекула од интереса за овај део истраживања (TGF-β1, VEGF, PDGF, DSP) биће коришћени доступни комерцијални ЕЛИСА китови. Процедура квантификације ЕЛИСА методом биће спроведена у складу са протоколом произвођача за сваки молекул. Добијене вредности оптичких густина биће очитане на ЕЛИСА читачу Rayto RT 2100C Microplate Reader (China). Резултати ће бити изражени у pg/ml.

Испитивање цитотоксичности раствора за континуирану хелацију на матичним ћелијама апикалне папиле (SCAP) и њихов ефекат на одонтогени диференцијациони потенцијал матичних целија апикалне папиле (SCAP) у присуству Биодентина

У истраживање ће бити укључено 3 системски здрава пацијента Клинике за оралну хирургију Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, оба пола, старости 18 и више година код којих је индикована екстракција импактираних или непотпуно изниклих доњих трећих молара због потреба ортодонтског лечења. У студији ће бити коришћени екстраховани доњи трећи молари код којих се на ортопантомограму јасно уочава зуб са незавршеним растом корена. Пре укључивања у студију, поступак студије ће бити детаљно објашњен пацијентима, а узорци ће бити прикупљени искључиво од оних пацијената који су потписали информисани пристанак и дали сагласност за коришћење биолошког материјала.

Лабораторијски протокол *in vitro* студије на матичним ћелијама апикалне папиле

Након екстракције, зуби ће бити пребачени у пластичну посуду са транспортним медијумом (енгл. Dulbecco's Modified Eagle's Medium -DMEM, 20% Fetal Bovine Serum – FBS, Gibco, USA) и пренети до Имлантолошко истраживачко центра Стоматолошког факултета Унивезитета у Београду. Након дезинфекције 70% етанолом, посуда ће бити унета у биолошки безбедни кабинет. Зуби ће бити пребачени у петри шољу и три пута испрани раствором фосфатног пуфера (енгл. Dulbecco's Phospate Buffer Saline - DPBS, Gibco, USA). Апикална папила ће пажљиво бити одвојена од корена стерилним скалпелом, испрана DPBS раствором и пребачена у нову стерилну петри шољу. Ткиво апикалне папиле ће бити пажљиво уситњено на фрагменте, водећи рачуна да се ткиво не гњечи. У петри

шољу ће бити додато 2 ml комплетног медијума (DMEM, 10 % FBS, 1 x Antibiotic antimycotic, Gibco, USA), а затим ће делићи ткива заједно са медијумом бити аспирирани и пребачени у фласк T-25 намењеним за култивацију ћелија. T-25 фласк ће бити пребачен у CO_2 инкубатор (Galaxy 170s, New Brunswick, Canada) на 37°C у атмосфери са 5% CO_2. На свака 2-3 дана, комплетни медијум ће бити замењен свежим, претходно загрејаним (37°C) комплетним медијумом. Након 5 до 7 дана, на инвертном микроскопу се очекује пролиферација ћелија из делића ткива. Ове ћелије ће бити означене као ћелије нулте пасаже (P0). Ћелије ће бити култивисане до постизања субконфлуентности, тј. до прекривања 70-80% површине фласка, а онда би се сукцесивним експанзијама (пасажама) умножавале.

Експресија мезенхималних и хематопоетских маркера SCAP ћелија четврте пасаже ће бити проверена проточном цитометријом. Биће коришћена мишја моноклонална антитела за мезенхималне маркере: CD90, CD73, CD105 и за хематопоезне маркере: CD 45 i CD 34. Ова антитела су обележена флуоресцин-изоцијанатом (FITC) и фикоеритрином (PE). За идентификацију мезенхималних матичних ћелија вршила би се имунофенотипизација преко доказивања позитивне експресије (≥ 95% позитивних ћелија) мезенхималних трансмембранских маркера (CD73, CD105, CD90 антиген), односно одсуства других хетерогених популација ћелија помоћу тестирања негативне експресије хематопоетских маркера (≤5% позитивних ћелија), као што су CD34 (молекул присутан на популацији примитивних хематопоетских ћелија) и CD45 (трансмембрански протеин тирозин фосфатаза). Након потврде матичности, ћелије ће бити коришћене за даље анализе.

Припрема елуата калцијум-силикатног цемента (Биодентина)

У експериментима ће бити коришћен калцијум-силикатни цемент Биодентин (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, France). Овај материјал ће бити замешан по упутству произвођача у биолошки безбедном кабинету и унет у стерилне силиконске калупе пречника 5 mm и висине 2 mm. Након везивања од 48 сати, дискови ће бити урођени у DMEM са антибиотиком/антимикотиком и остављени у CO_2 инкубатору у периоду од 24 сата ради екстракције елуата материјала. Елуат ће бити формиран у складу са захтевима ISO стандарда 10993-12 из 2021. године (International Organization for Standardization, 2021). Након 24 сата, елуат ће бити центрифугиран на 1000xg ради уклањања крупнијих честица из елуата.

MTT тест ћелијске вијабилности

Цитотоксичност експерименталних раствора биће испитивана MTT тестом вијабилности. Ћелијска вијабилност биће одређивана након третмана експерименталним растворима, како имедијантно након њихове примене, тако и након 24, 48 и 72h. SCAP ћелије биће засејане у густини од 5000 ћелија по бунарићу и инкубиране у CO_2 инкубатору на 37°C у атмосфери са 5% CO_2 ради везивања за подлогу. Након 24-часовне инкубације, ћелије ће бити третиране са по 100µl експерименталних раствора, додатно разблажених у DMEM-u, (1:10, 1:100, 1:1000) у периоду од 15 минута. Као негативна контрола биће

коришћен комплетни медијум. Апсорбанце ће бити очитане помоћу спектрофотометра (RT-2100C Multiplate Reader, Rayto, China) на таласној дужини од 570nm. Вијабилност ћелија ће бити израчуната по следећој формули: % вијабилних ћелија = (апсорбанца узорка – бланк апсорбанца) / (апсорбанца контроле – бланк апсорбанца) × 100 (Ballal и сар., 2019).

Испитивање ефекта раствора за континуирану хелацију на одонтогени потенцијал SCAP

Одонтогена диференцијација SCAP након третмана растворима за континуирану хелацију, биће испитана уз помоћ анализе генске експресије. Минерализациони потенцијал ћелија након третмана ће бити испитан Alizarin Red S бојењем и активношћу алкалне фосфатазе (ALP). Поред тога, медијум у којем ће ћелије бити култивисане ће бити сачуван, а из њега ће бити квантификовани протеини карактеристични за одонтогену диференцијацију уз помоћ ЕЛИСА (енгл. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) методе.

За доказивање потенцијала за диференцијацију биће коришћене ћелије пете пасаже. SCAP ћелије ће за потребе извођења анализе генске експресије бити засејане на плочама од 12 бунарића, у густини од 25×10^3 ћелија по бунарићу. За извођење експеримената активности ALP и ализарин ред бојења, SCAP ће бити засејане на плочама од 96 бунарића у густини од 10×10^3 ћелија по бунарићу. Ћелије ће бити инкубиране у CO_2 инкубатору на 37°C у атмосфери са 5% CO_2 ради везивања за подлогу. Након 24-часовне инкубације, ћелије ће бити третиране експерименталним растворима у периоду од 15 минута, у разблажењу у којем ћелије покажу вијабилност од преко 50% на MTT тесту, у складу са следећим групама:

I. без третмана – позитивна контрола
II. без третмана – негативна контрола
III. 9% етидронат + 1,5% NaOCl
IV. 9% клодронат + 1,5% NaOCl
V. 9% етидронат + 1,5% NaOCl у присуству Биодентина
VI. 9% клодронат + 1,5% NaOCl у присуству Биодентина
VII. 9% етидронат
VIII. 9% клодронат
IX. 9% етидронат у присуству Биодентина
X. 9% клодронат у присуству Биодентина
XI. Биодентин

Након третмана, ћелије ће бити испране PBS-ом, а затим инкубиране у присуству остеодиференцијационог медијума и елуата Биодентина (StemMACS OsteoDiff Medium, Miltenyi Biotec, Germany) у четири временска интервала (7, 10, 14 и 21 дан). Освежавање медијума ће се вршити на свака 3-4 дана.

Бојење Alizarin-ом Red S - Alizarin Red S је органско једињење које се везује за Ca^{2+}, стога се користи као хистолошка боја за бојење поља минерализације и калцијумских нодула у ткивима и доказивање позитивне остеодиференцијације. По истеку испитиваног временског периода, медијум за остеодиференцијацију ће бити аспириран и одбачен, ћелије ће бити фиксиране и обојене. Након бојења, бунарићи ће бити фотографисани на инвертној микроскопији, након чега ће везана боја бити растворена хлороводоничном киселином, а интензитет минерализације ће бити квантификован помоћу спектрофотометра (RT-2100C Multiplate Reader, Rayto, China) на таласној дужини од 450nm.

Активност алкалне фосфатазе - Алкална фосфатаза је ензим кога секретују остеобласти и одонтобласти а има кључну улогу у формирању чврстих зубних као и коштаних ткива јер повећава концентрацију фосфатних јона неопходних за минерализацију ткива. Тест активности алкалне фосфатазе заснива се на употреби синтетичког супстрата, најчешће рнитрофенил фосфата (pNPP). Након истека испитиваног временског периода, медијум за остеодиференцијацију ће бити аспириран и одбачен, а ћелије испране три пута DPBS-ом. Додавањем 55µl 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) реагенса биће извршена пермеабилизација ћелијске мембране, а плоча са ћелијама остављена преко ноћи на 4°C. Раствор pNPP ће бити направљен према упутству произвођача (Genaxxon bioscience, Ulm, Germany) након додавања. 100µl pNPP раствора по бунарићу и тридесетоминутне инкубације на собној температури, апсорбанце ће бити очитане на спектрофотометру (RT 2100C Multiplate Reader, Rayto, China) на таласној дужини од 405nm.

Испитивање генске експресије циљних гена од значаја за одонтогену диференцијацију SCAP - Након изолације РНК и реверзне транскрипције, добијена цДНК би се користила у испитивању генске експресије *Realtime PCR* анализом, где би се посматрали нивои експресије маркера од значаја за одонтогену диференцијацију SCAP (DSPP, DMP1, ALP, COL1A, OCN, RUNX2).

Квантификација протеина специфичних за одонтогену диференцијацију – Одонтогена диференцијација биће испитана квантификацијом протеина карактеристичних за одонтобласте. Квантификација протеина ће се вршити из медијума у којем ће ћелије бити култивисане током процеса диференцијације. Медијум ће бити мењан на 3 – 4 дана, при чему ће прикупљени стари медијум бити складиштен и замрзнут на −70 °C до даље анализе. За квантификацију протеина од интереса (DSPP, DMP-1) биће коришћени доступни комерцијални ЕЛИСА китови. Процедура квантификације ЕЛИСА методом биће спроведена у складу са протоколом произвођача за сваки молекул, а резултати ће бити изражени у pg/ml.

СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Статистичка анализа прикупљених података биће извршена у статистичком софтверском пакету GraphPad Prism (version 10.4; GraphPad Software, Boston, MA, USA). Као методе дескриптивне статистике користиће се мере централне тенденције и мере дисперзије. Избор теста за анализу нумеричких обележја посматрања зависиће од природе расподеле података. У циљу одређивања нормалности расподеле користиће се Колмогоров Смирнов (*Kolmogorov–Smirnov*) и Шапиро Вилк (*Shapiro-Wilk*) тестови. За потребе статистичке обраде резултата добијених испитивањем ослобађања биоактивних молекула из дентина, у случају нормалне расподеле користиће се т-тест за везане узорке (Paired samples t-test), док ће се код расподела различитих од нормалне користити Вилкоксонов тест (Wilcoxon Signed-Rank Test). За потребе статистичке обраде резултата добијених испитивањем цитотоксичности и одонтогене диференцијације матичних ћелија апикалне папиле, користиће се АНОВА са Бонферонијевом корекцијом за анализу разлика између група у случају нормалне расподеле, односно Краскал Волисов тест (Kruskal- Wallis Test) уз Ман Витнијев У тест (Mann Whitney U Test) за међугрупну анализу, код расподела различитих од нормалне.

ОЧЕКИВАНИ РЕЗУЛТАТИ

С обзиром на то да су студије на предложену тему малобројне и у неким областима потпуности недостају, очекујемо да резултати нашег истраживања по први пут покажу *in vitro* биолошке ефекте новог раствора за континуирану хелацију, клодроната са натријум хипохлоритом, на нивоу компоненти сигналних путева од значаја за процесе репарације и регенерације зубних ткива (ослобађање биоактивних молекула из дентина, и то TGF-β1, VEGF, PDGF, DSP, и одонтогена диференцијација матичних ћелија апикалне папиле). Имајући у виду да клодронат у раствору за континуирану хелацију показује боље физичко-хемијске карактеристике од постојећег регистрованог раствора са етидронатом на основу чега је препоручен као потенцијална алтернатива етидронату, очекујемо да клодронат показује компарабилне, ако не и боље, биолошке ефекте од раствора са етидронатом као што су већа способност ослобађања биоактивних молекула из дентина, мања цитотоксичност и већа стимулација одонтогене диференцијације матичних ћелија апикалне папиле. Такође, с обзиром да се ириганси примењују у комбинацији са биоактивним материјалима у току ендодонтског лечења, очекујемо да примена ириганаса у склопу континуиране хелације не умањује биолошке ефекте Биодентина.

ОПРАВДАНОСТ ИСТРАЖИВАЊА

До данас није пронађен идеалан ириганс погодан за већину ендодонтских терапијских захвата, било да су они рутински, или у оквиру регенеративних процедура, због чега се испитују нови потенцијални раствори за иригацију. Нови ириганс, клодронат са натријум

хипохлоритом, са потенцијалном применом у оквиру континуиране хелације, испољава супериорније физичко-хемијске карактеристике у односу на једини ириганс који је тренутно у клиничкој употреби, етидронат са натријум хипохлоритом, али истраживања која испитују његов биолошки ефекат су спорадична или недостају. Такође, недостају истраживања ефеката овог ириганса на биолошке ефекте биоактивних стоматолошких материјала као што је Биодентин. Стога, научни допринос ове студије је испитивање биолошких ефеката потенцијалног новог ириганса у *in vitro* условима што ће допринети бољем разумевању његових ефеката и омогућити одређивање индикација за његову примену. Посебан допринос ове студије је прво испитивање потенцијалне примене раствора за континуирану хелацију у регенеративној ендодонцији.

ИСТРАЖИВАЧКИ ТИМ

1. др Јован Бадњар, студент докторских студија, Стоматолошког факултета Универзитета у Београду
2. Проф. др Љиљана Ђукић, Фармакологија у стоматологији, ОЈ Институтски предмети, Стоматолошки факултет Универзитета у Београду
3. Доц. др Бојан Џелетовић, Клиника за болести зуба, Стоматолошки факултет Универзитета у Београду
4. Доц. др Јелена Симоновић, Општа и орална хистологија и ембриологија, ОЈ Институтски предмети, Стоматолошки факултет Универзитета у Београду
5. Доц. др Александар Јаковљевић, Патолошка физиологија, ОЈ Институтски предмети, Стоматолошки факултет Универзитета у Београду
6. Виши научни сарадник др Дијана Митић, Истраживачке лабораторије, ОЈ Имплантолошко-истраживачки центар, Стоматолошки факултет Универзитета у Београду

РЕФЕРЕНЦЕ КОЈЕ СЕ ОДНОСЕ НА ПРЕДЛОЖЕНИ ПРЕДМЕТ ИСТРАЖИВАЊА

Aksel H и Huang GT-J (2017) Combined Effects of Vascular Endothelial Growth Factor and Bone Morphogenetic Protein 2 on Odonto/Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells *In Vitro Journal of Endodontics* **43**, 930–935.

Akyüz İE, Eminsoy Avcı AT, Üstün Y, Kolçakoğlu KS и Kızılcı E (2025) Evaluation of the effect of different irrigation solutions used in regenerative endodontic treatment of necrotic molar teeth with open apex on postoperative pain- randomized clinical trial *Clinical Oral Investigations* **29**, 66.

Arias-Moliz MT, Morago A, Ordinola-Zapata R, Ferrer-Luque CM, Ruiz-Linares M и Baca P (2016) Effects of Dentin Debris on the Antimicrobial Properties of Sodium Hypochlorite and Etidronic Acid *Journal of Endodontics* **42**, 771–775.

Atesci AA, Avci CB, Tuglu MI, Ozates Ay NP и Eronat AC (2020) Effect of Different Dentin Conditioning Agents on Growth Factor Release, Mesenchymal Stem Cell Attachment and Morphology *Journal of Endodontics* **46**, 200–208.

Bai Y, Cheng X, Liu X, и cap. (2023) Transforming growth factor-β1 promotes early odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells via activating AKT, Erk1/2 and p38 MAPK pathways *Journal of Dental Sciences* **18**, 87–94.

Bai Y, Liu X, Li J, и cap. (2022) Stage-Dependent Regulation of Dental Pulp Stem Cell Odontogenic Differentiation by Transforming Growth Factor-β1 *Stem Cells International* **2022**, 1–13.

Baker SM, Sugars RV, Wendel M, и cap. (2009) TGF-beta/extracellular matrix interactions in dentin matrix: a role in regulating sequestration and protection of bioactivity *Calcif Tissue Int* **85**, 66–74.

Ballal NV, Das S, Rao BSS, Zehnder M и Mohn D (2019) Chemical, cytotoxic and genotoxic analysis of etidronate in sodium hypochlorite solution *International Endodontic Journal* **52**, 1228–1234.

Ballal NV, Ray AB, Narkedamalli R, и cap. (2024) Effect of continuous vs sequential chelation on the mechanical properties of root dentin: An ex vivo study *J Dent* **148**, 105214.

Boutsioukis C и Arias-Moliz MT (2022) Present status and future directions - irrigants and irrigation methods *International Endodontic Journal* **55 Suppl 3**, 588–612.

Butler WT и Ritchie H (1995) The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins *The International Journal of Developmental Biology* **39**, 169–179.

Campello AF, Rodrigues RCV, Alves FRF, и cap. (2022) Enhancing the Intracanal Antibacterial Effects of Sodium Hypochlorite with Etidronic Acid or Citric Acid *Journal of Endodontics* **48**, 1161–1168.

Chae Y, Yang M и Kim J (2018) Release of TGF-β1 into root canals with various final irrigants in regenerative endodontics: an in vitro analysis *International Endodontic Journal* **51**, 1389–1397.

Chaussain C, Eapen AS, Huet E, и cap. (2009) MMP2-cleavage of DMP1 generates a bioactive peptide promoting differentiation of dental pulp stem/progenitor cell *European Cells & Materials* **18**, 84–95.

Cosmetic Ingredient Review Expert Panel (2017) Safety Assessment of Etidronic Acid and Salts of Etidronic Acid as Used in Cosmetics.

Dawes C (2003) What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *Journal (Canadian Dental Association)* **69**, 722–724.

De Oliveira CLL, Ferreira FM, Puppin-Rontani J, Puppin-Rontani RM и Pascon FM (2025) Potential of irrigants and medicaments in regenerative endodontics: insights from a systematic review on dentin growth factor release *Odontology*.

Deari S, Mohn D и Zehnder M (2019) Dentine decalcification and smear layer removal by different ethylenediaminetetraacetic acid and 1-hydroxyethane-1,1-diphosphonic acid species *International Endodontic Journal* **52**, 237–243.

Dos Reis-Prado AH, Abreu LG, Fagundes RR, и cap. (2022) Influence of ethylenediaminetetraacetic acid on regenerative endodontics: A systematic review *International Endodontic Journal* **55**, 579–612.

Duncan HF, Smith AJ, Fleming GJP, Reid C, Smith G и Cooper PR (2017) Release of bio-active dentine extracellular matrix components by histone deacetylase inhibitors (HDACi) *International Endodontic Journal* **50**, 24–38.

Dung SZ, Gregory RL, Li Y и Stookey GK (1995) Effect of lactic acid and proteolytic enzymes on the release of organic matrix components from human root dentin. *Caries research* **29**, 483–489.

Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I и Akiyama K (2012) Stem cells in dentistry – Part I: Stem cell sources *Journal of Prosthodontic Research* **56**, 151–165.

Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF и Fedarko NS (2001) Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin *Biochemical and Biophysical Research Communications* **280**, 460–465.

Fortea L, Sanz-Serrano D, Luz L-B, Bardini G и Mercade M (2024) Update on chelating agents in endodontic treatment: A systematic review *Journal of Clinical and Experimental Dentistry* **16**, e516–e538.

Galler KM, Buchalla W, Hiller KA, и cap. (2015) Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin *Journal of Endodontics* **41**, 363–8.

Ganesan K, Goyal A и Roane D (2025) Bisphosphonate In: *StatPearls*, pp. p. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing.

Giardino L, Del Fabbro M, Morra M, и cap. (2019) Dual Rinse(®) HEDP increases the surface tension of NaOCl but may increase its dentin disinfection efficacy *Odontology* **107**, 521– 529.

Girard S, Paqué F, Badertscher M, Sener B и Zehnder M (2005) Assessment of a gel-type chelating preparation containing 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate *International Endodontic Journal* **38**, 810–816.

Hao J, Zou B, Narayanan K и George A (2004) Differential expression patterns of the dentin matrix proteins during mineralized tissue formation *Bone* **34**, 921–932.

Huang M, Dissanayaka WL и Yiu CK (2025) Exploring the potential of stem cells from the apical papilla (SCAPs) in regenerative medicine: advantages, applications, challenges and opportunities *Stem Cell Research & Therapy* **16**, 626.

Huang X, Camba J, Gu L, и cap. (2018) Mechanism of bioactive molecular extraction from mineralized dentin by calcium hydroxide and tricalcium silicate cement *Dental Materials* **34**, 317–330.

International Organization for Standardization (2021) ISO 10993-12 Part 12: Sample preparation and reference materials.

Ivica A, Zehnder M, Mateos JM, Ghayor C и Weber FE (2019) Biomimetic Conditioning of Human Dentin Using Citric Acid *Journal of Endodontics* **45**, 45–50.

Jiang W, Duan S, Li W, и cap. (2025) PDGF-BB overexpressing dental pulp stem cells improve angiogenesis in dental pulp regeneration *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **13**.

Kfir A, Goldenberg C, Metzger Z, Hülsmann M и Baxter S (2020) Cleanliness and erosion of root canal walls after irrigation with a new HEDP-based solution vs. traditional sodium hypochlorite followed by EDTA. A scanning electron microscope study *Clinical Oral Investigations* **24**, 3699–3706.

Khan JA, Hasan A, Dossa S и Ali B (2021) Effect of Natural and Artificial Dentin Conditioners on the Release of Vascular Endothelial Growth Factor *Journal of Endodontics* **47**, 800–805.

Kim D i Kim SG (2025) Cell Homing Strategies in Regenerative Endodontic Therapy *Cells* **14**, 201.

Kim SG, Malek M, Sigurdsson A, Lin LM и Kahler B (2018) Regenerative endodontics: a comprehensive review. *International Endodontic Journal* **51**, 1367–1388.

Küçükkaya Eren S (2023) Clinical applications of calcium silicate-based materials: a narrative review *Australian Dental Journal* **68**.

La Rosa GRM, Plotino G, Nagendrababu V и Pedullà E (2024) Effectiveness of continuous chelation irrigation protocol in endodontics: a scoping review of laboratory studies *Odontology* **112**, 1–18.

León-López M, Cabanillas-Balsera D, Martín-González J, Montero-Miralles P, Saúco-Márquez JJ и Segura-Egea JJ (2022) Prevalence of root canal treatment worldwide: A systematic review and meta-analysis *International Endodontic Journal* **55**, 1105–1127.

Li W, Chen L, Chen Z, и cap. (2017) Dentin sialoprotein facilitates dental mesenchymal cell differentiation and dentin formation *Scientific Reports* **7**, 300.

Liu J, Zou T, Zhang Y, и cap. (2022) Three-dimensional electroconductive carbon nanotube-based hydrogel scaffolds enhance neural differentiation of stem cells from apical papilla *Biomaterials Advances* **138**, 212868.

Liu MM, Li WT, Xia XM, Wang F, MacDougall M и Chen S (2021) Dentine sialophosphoprotein signal in dentineogenesis and dentine regeneration *European Cells & Materials* **42**, 43–62.

Martell AE и Smith RM (1989) *Critical Stability Constants: Second Supplement* Springer US.

Martin DE, De Almeida JF, Henry MA, и cap. (2014) Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation *Journal of Endodontics* **40**, 51–5.

Morago A, Ordinola-Zapata R, Ferrer-Luque C, Baca P, Ruiz-Linares M и Arias Moliz T (2016) Influence of Smear Layer on the Antimicrobial Activity of a Sodium Hypochlorite/Etidronic Acid Irrigating Solution in Infected Dentin *Journal of Endodontics* **42**.

Mumcu AK, Kurnaz S, Kiraz G и Gündüz MK (2024) Comparative effects of 17% ethylenediaminetetraacetic acid and 9% etidronic acid applied with different irrigant activation techniques on the release of growth factors from dentin: in vitro study *BMC Oral Health* **24**, 612.

Nanci A (2018) Dentin-Pulp Complex In: *Ten Cate's oral histology : development, structure, and function*, 9th edition; pp. p. Elsevier.

Narayanan K, Gajjeraman S, Ramachandran A, Hao J и George A (2006) Dentin matrix protein 1 regulates dentin sialophosphoprotein gene transcription during early odontoblast

differentiation *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 19064–19071.

Narayanan K, Srinivas R, Ramachandran A, Hao J, Quinn B и George A (2001) Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 4516–4521.

Okada Y, Kawashima N, Noda S, и сар. (2025) VEGFA promotes odonto/osteoblastic differentiation in dental pulp stem cells via ERK/p38 signaling *Journal of Dental Sciences* **20**, 1590–1597.

Pan G, Zhou Q, Pan C и Zhang Y (2024) The Impact of the VEGF/VEGFR2/PI3K/AKT Signaling Axis on the Proliferation and Migration Abilities of Human Dental Pulp Stem Cells *Cell Biochemistry and Biophysics* **82**, 2787–2795.

Paqué F, Rechenberg D-K и Zehnder M (2012) Reduction of hard-tissue debris accumulation during rotary root canal instrumentation by etidronic acid in a sodium hypochlorite irrigant *Journal of Endodontics* **38**, 692–695.

Razumova S, Brago A, Kryuchkova A, Troitskiy V, Bragunova R и Barakat H (2025) Evaluation of the efficiency of smear layer removal during endodontic treatment using scanning electron microscopy: an in vitro study *BMC Oral Health* **25**, 151.

Roberts-Clark DJ и Smith AJ (2000) Angiogenic growth factors in human dentine matrix *Archives of Oral Biology* **45**, 1013–1016.

Russell RGG (2011) Bisphosphonates: the first 40 years *Bone* **49**, 2–19.

Russell RGG, Watts NB, Ebetino FH и Rogers MJ (2008) Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy *Osteoporosis International* **19**, 733–759.

Saberi EA, Farhad-Mollashahi N, Sargolzaei Aval F и Saberi M (2019) Proliferation, odontogenic/osteogenic differentiation, and cytokine production by human stem cells of the apical papilla induced by biomaterials: a comparative study *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry* **Volume 11**, 181–193.

Sadaghiani L, Gleeson HB, Youde S, Waddington RJ, Lynch CD и Sloan AJ (2016) Growth factor liberation and DPSC response following dentine conditioning *J Dent Res* **95**, 1298–1307.

Schmalz G, Hickel R, Price RB и Platt JA (2023) Bioactivity of Dental Restorative Materials: FDI Policy Statement *International dental journal* **73**, 21–27.

Schmalz G, Widbiller M и Galler KM (2017) Signaling Molecules and Pulp Regeneration *Journal of Endodontics* **43**, S7–S11.

Smith AJ, Duncan HF, Diogenes A, Simon S и Cooper PR (2016) Exploiting the Bioactive Properties of the Dentin-Pulp Complex in Regenerative Endodontics *Journal of Endodontics* **42**, 47–56.

Smith AJ, Matthews JB и Hall RC (1998) Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression *Eur J Oral Sci* **106 Suppl 1**.

Smith AJ, Scheven BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM и Cooper PR (2012) Dentine as a bioactive extracellular matrix *Archives of Oral Biology* **57**, 109–121.

Sonoyama W, Liu Y, Fang D, и cap. (2006) Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine *PLoS ONE* **1**, e79.

Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, и cap. (2008) Characterization of the Apical Papilla and Its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth: A Pilot Study *Journal of Endodontics* **34**, 166–171.

Sridhar SV, Kumaravadivel K, Vishwanath S, Mathew S, Thangavel B и Thangaraj DN (2025) Effect of continuous chelation irrigation on transforming growth factor-β1 release: An in vitro assay *Journal of Conservative Dentistry and Endodontics* **28**, 481–485.

Sungur D, Aksel H, Ozturk S, Yılmaz Z и Ulubayram K (2019) Effect of dentine conditioning with phytic acid or etidronic acid on growth factor release, dental pulp stem cell migration and viability *International Endodontic Journal* **52**, 838–846.

Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, и cap. (2009) Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization *Matrix Biology* **28**, 221–229.

Tartari T, Guimarães BM, Amoras LS, Duarte MA, Silva e Souza PA и Bramante CM (2015) Etidronate causes minimal changes in the ability of sodium hypochlorite to dissolve organic matter *International Endodontic Journal* **48**, 399–404.

Tavares S, Pintor A, de Almeida Barros Mourão CF, и cap. (2021) Effect of different root canal irrigant solutions on the release of dentin-growth factors: A systematic review and meta-analysis *Materials* **14**.

Tomson PL, Lumley PJ, Smith AJ и Cooper PR (2017) Growth factor release from dentine matrix by pulp-capping agents promotes pulp tissue repair-associated events *International Endodontic Journal* **50**, 281–292.

Wan C, Yuan G, Luo D, и cap. (2016) The Dentin Sialoprotein (DSP) Domain Regulates Dental Mesenchymal Cell Differentiation through a Novel Surface Receptor *Scientific Reports* **6**, 29666.

Wang X, Xiao Y, Song W, и cap. (2023) Clinical application of calcium silicate-based bioceramics in endodontics *Journal of Translational Medicine* **21**, 853.

Wattanapakkavong K и Srisuwan T (2019) Release of Transforming Growth Factor Beta 1 from Human Tooth Dentin after Application of Either ProRoot MTA or Biodentine as a Coronal Barrier *Journal of Endodontics* **45**, 701–705.

Wongwatanasanti N, Jantarat J, Sritanaudomchai H и Hargreaves KM (2018) Effect of Bioceramic Materials on Proliferation and Odontoblast Differentiation of Human Stem Cells from the Apical Papilla *Journal of Endodontics* **44**, 1270–1275.

Wright PP, Cooper C, Kahler B и Walsh LJ (2020a) From an assessment of multiple chelators, clodronate has potential for use in continuous chelation *International Endodontic Journal* **53**, 122–134.

Wright PP, Cooper C, Kahler B и Walsh LJ (2021a) Multiple assessment methodologies in determining the antibiofilm actions of sodium hypochlorite mixed with clodronate or etidronate in endodontic irrigation *Journal of Microbiological Methods* **180**.

Wright PP, Scott S, Kahler B и Walsh LJ (2020b) Organic Tissue Dissolution in Clodronate and

Etidronate Mixtures with Sodium Hypochlorite *Journal of Endodontics* **46**, 289–294.
Wright PP, Scott S, Shetty S, Kahler B и Walsh LJ (2021b) Resistance to compressive force in continuous chelation *Australian Endodontic Journal* **47**, 150–156.
Xu S, Wei J, Liu Y, и cap. (2024) PDGF-AA guides cell crosstalk between human dental pulp stem cells in vitro via the PDGFR-α/PI3K/Akt axis *International Endodontic Journal* **57**, 549–565.
Yamakoshi Y, Hu JC-C, Fukae M, Zhang H и Simmer JP (2005) Dentin glycoprotein: the protein in the middle of the dentin sialophosphoprotein chimera *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 17472–17479.
Ye L, MacDougall M, Zhang S, и cap. (2004) Deletion of dentin matrix protein-1 leads to a partial failure of maturation of predentin into dentin, hypomineralization, and expanded cavities of pulp and root canal during postnatal tooth development *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 19141–19148.
Yi B, Ding T, Jiang S, и cap. (2021) Conversion of stem cells from apical papilla into endothelial cells by small molecules and growth factors *Stem Cell Research & Therapy* **12**, 266.
Zeng Q, Nguyen S, Zhang H, и cap. (2016) Release of Growth Factors into Root Canal by Irrigations in Regenerative Endodontics *Journal of Endodontics* **42**, 1760–1766.
Zhang M, Jiang F, Zhang X, и cap. (2017) The Effects of Platelet-Derived Growth Factor-BB on Human Dental Pulp Stem Cells Mediated Dentin-Pulp Complex Regeneration *Stem Cells Transl Med* **6**, 2126–2134.
Zhang R, Cooper PR, Smith G, Nör JE и Smith AJ (2011) Angiogenic activity of dentin matrix components *Journal of Endodontics* **37**, 26–30.
Zollinger A, Mohn D, Zeltner M и Zehnder M (2018) Short-term storage stability of NaOCl solutions when combined with Dual Rinse HEDP *International Endodontic Journal* **51**, 691–696.
Zou X, Zheng X, Liang Y, и cap. (2024) Expert consensus on irrigation and intracanal medication in root canal therapy *International Journal of Oral Science* **16**, 23.

„Ефекат континуиране хелације и калцијум силикатних материјала на ослобађање биоактивних молекула из хуманог дентина и одонтогену диференцијацију матичних ћелија апикалне папиле“

Универзитет у Београду
Стоматолошки факултет

ЕВИДЕНЦИОНИ КАРТОН ИСПИТАНИКА

Евиденциони број испитаника:	

Датум попуњавања упитника:_____

Лекар: _____

Информације о пацијенту

Пол: ☐ мушки	☐ женски
Старост (годиште):	
Висина (m):	
Телесна маса (kg):	
BMI:	

Анамнеза

Да ли пацијент болује од неке системске болести?	☐ да ☐ не	
Алергије ☐ да ☐ не	Уколико да, које	
Обољења или интервенције на кардиоваскуларним органима ☐ да ☐ не	Уколико да, које	Означити
	повишен/снижен крвни притисак	
	инфаркт миокарда	
	уграђене вештачке валвуле	
	уграђен пејсмејкер	
	реуматска грозница	
	урођене срчане мане	
	Остало (навести)	

Неуролошки поремећаји ☐ да ☐ не	Уколико да, које	Означити
	конвулзије/епилепсија	
Обољења крви ☐ да ☐ не	Уколико да, које	Означити
	поремећаји хемостазе	
Дијабетес мелитус тип 2 ☐ да ☐ не		
Онколошка обољења ☐ да ☐ не	Уколико да, које	
Обољења респираторног система ☐ да☐ не	Уколико да, које	
Цереброваскуларна обољења☐ да☐ не	Уколико да, које	
Обољења ендокриног система☐ да☐ не	Уколико да, које	
Обољења дигестивног система☐ да☐ не	Уколико да, које	
Обољења јетре☐ да☐ не	Уколико да, које	
Обољења бубрега☐ да☐ не	Уколико да, које	
Аутоимуна обољења☐ да☐ не	Уколико да, које	
Инфективна обољења☐ да☐ не	Уколико да, које	
Лоше навике ☐ да☐ не	Уколико да, које	Означити
	пушење (колико)	
	конзумирање алкохола	
	конзумирање наркотика	

Фармакотерапија

Фармакотерапија			
Ред.бр.	**ЛЕК**	**ДОЗА**	**Дужина трајања *th***
1			
2			
3			

„Ефекат континуиране хелације и калцијум силикатних материјала на ослобађање биоактивних молекула из хуманог дентина и одонтогену диференцијацију матичних ћелија апикалне папиле“

Подаци о зубу индикованом за екстракцију

_____

_____

_____

_____

Остали подаци од значаја:

_____

_____

_____

_____

„Ефекат континуиране хелације и калцијум силикатних материјала на ослобађање биоактивних молекула из хуманог дентина и одонтогену диференцијацију матичних ћелија апикалне папиле“

Универзитет у Београду
Стоматолошки факултет

ЕВИДЕНЦИОНИ ЛАБОРАТОРИЈСКИ КАРТОН - 1

Евиденција пријема узорака/зуба **1. Модел парова дентинских дискова**

Р.бр.	Евиденциони број испитаника:	ЗУБ	Датум	Истраживач
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				
6.				
7.				
8.				
9.				
10.				
11.				
12.				
13.				
14.				
15.				
16.				
17.				
18.				
19.				
20.				
21.				
22.				
23.				
24.				
25.				
26.				
27.				
28.				
29.				
30.				
31.				
32.				

„Ефекат континуиране хелације и калцијум силикатних материјала на ослобађање биоактивних молекула из хуманог дентина и одонтогену диференцијацију матичних ћелија апикалне папиле“

Универзитет у Београду
Стоматолошки факултет

ЕВИДЕНЦИОНИ ЛАБОРАТОРИЈСКИ КАРТОН - 2

Евиденција пријема узорака/зуба **2. Модел парова коренских сегмената**

Р.бр.	Евиденциони број испитаника:	ПАР ЗУБА	Датум	Истраживач
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				
6.				
7.				
8.				
9.				
10.				
11.				
12.				
13.				
14.				
15.				
16.				
17.				
18.				
19.				
20.				
21.				
22.				
23.				
24.				
25.				
26.				
27.				
28.				
29.				
30.				
31.				
32.				
33.				
34.				
35.				
36.				
37.				
38.				
39.				
40.				
41.				
42.				
43.				
44.				

„Ефекат континуиране хелације и калцијум силикатних материјала на ослобађање биоактивних молекула из хуманог дентина и одонтогену диференцијацију матичних ћелија апикалне папиле“

Универзитет у Београду
Стоматолошки факултет

ЕВИДЕНЦИОНИ ЛАБОРАТОРИЈСКИ КАРТОН - 3

Евиденција пријема узорака/зуба **3. SCAP**

Р. бр.	**Евиденциони број испитаника:**	**ЗУБ**	**Датум**	**Истраживач**
1				
2				
3				

„Ефекат континуиране хелације и калцијум силикатних материјала на ослобађање биоактивних молекула из хуманог дентина и одонтогену диференцијацију матичних ћелија апикалне папиле“

Универзитет у Београду
Стоматолошки факултет

ЕВИДЕНЦИОНИ ЛАБОРАТОРИЈСКИ КАРТОН - 4

1. **Модел парова дентинских дискова 2. Модел парова коренских сегмената 3. SCAP**

(заокружити)

Квантификација протеина ЕЛИСА методом

Анализирани протеин: _____

Датум спровођења теста _____

Потпис одговорног члана истраживачког тима _____

Резултати

Резултати – оптичке густине

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Резултати – концентрације _____(обавезно уписати јединице)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

„Ефекат континуиране хелације и калцијум силикатних материјала на ослобађање биоактивних молекула из хуманог дентина и одонтогену диференцијацију матичних ћелија апикалне папиле“

ЕВИДЕНЦИОНИ ЛАБОРАТОРИЈСКИ КАРТОН - 5

МТТ

време: имедијантно 24 сата 48 сати 72 сата

Датум спровођења теста _____

Потпис одговорног члана истраживачког тима _____

Резултати

„Ефекат континуиране хелације и калцијум силикатних материјала на ослобађање биоактивних молекула из хуманог дентина и одонтогену диференцијацију матичних ћелија апикалне папиле“

Универзитет у Београду
Стоматолошки факултет

ЕВИДЕНЦИОНИ ЛАБОРАТОРИЈСКИ КАРТОН - 6

Ализарин ред С бојење

Датум спровођења теста _____

Потпис одговорног члана истраживачког тима _____

Резултати

„Ефекат континуиране хелације и калцијум силикатних материјала на ослобађање биоактивних молекула из хуманог дентина и одонтогену диференцијацију матичних ћелија апикалне папиле“

Универзитет у Београду
Стоматолошки факултет

ЕВИДЕНЦИОНИ ЛАБОРАТОРИЈСКИ КАРТОН - 7

Активност алкалне фосфатазе (ALP)

Датум спровођења теста _____

Потпис одговорног члана истраживачког тима _____

Резултати

„Ефекат континуиране хелације и калцијум силикатних материјала на ослобађање биоактивних молекула из хуманог дентина и одонтогену диференцијацију матичних ћелија апикалне папиле“

Универзитет у Београду
Стоматолошки факултет

ЕВИДЕНЦИОНИ ЛАБОРАТОРИЈСКИ КАРТОН - 8

Анализа генске експресије

Анализирани ген: _____

Датум спровођења теста _____

Потпис одговорног члана истраживачког тима _____

Резултати

Универзитет у Београду
Стоматолошки факултет

ОБАВЕШТЕЊЕ ЗА ИСПИТАНИКЕ

Поштовани,

Позвани сте да учествујете у истраживању у оквиру израде докторске дисертације под називом *„***Ефекат континуиране хелације и калцијум силикатних материјала на ослобађање биоактивних молекула из хуманог дентина и одонтогену диференцијацију матичних ћелија апикалне папиле***“* које се спроводи на Стоматолошком факултету Универзитета у Београду. Учествовање у овом истраживању је добровољно и искључиво је на Вама да одлучите желите ли да учествујете или не. Пре него што одлучите, потребно је да разумете чему ово истраживање служи, каква је сврха Вашег учествовања и шта то значи за Вас. Овај информисани пристанак описује студију и Ваше потенцијално учешће, те Вас молимо да га прочитате пажљиво.

Иригација канала корена зуба представља кључни део успешног ендодонтског третмана (лечења зуба) и значајно доприноси повољном терапијском исходу у клиничким условима. Званичан протокол иригације за већину ендодонтских терапијских захвата до данас није формиран и у клиничкој пракси су у употреби различити протоколи. Концепт континуиране хелације се заснива на коришћењу једног раствора како би се убрзало и поједноставило чишћење коренског канала током читавог трајања ендодонтске терапије, а датира од пре више од 20 година, тачније 2005. године. Раствор за континуирану хелацију са етидронатом представља једини, до сада регистровани раствор на бази бисфосфоната, за употребу у континуираној хелацији под фабричким називом *Dual Rinse.* Релативно скоро, 2020. године као алтернатива етидронату предложен је клодронат за коришћење у протоколу континуиране хелације. Имајући у виду да је ово потенцијално нов ириганс, подаци о његовим биолошким ефектима недостају, посебно на нивоу ћелија од значаја за процесе зарастања и обнављања зубних ткива као што су матичне ћелије апикалне папиле.

Ова студија има за циљ да испита и упореди, како цитотоксични ефекат, тако и утицај на потенцијал одонтогене диференцијације матичних ћелија апикалне папиле два раствора за континуирану хелацију: раствора који већ постоји у клиничкој примени (етидронат са натријум хипохлоритом), и новог раствора, клодроната са натријум хипохлоритом.

Како би се испитали потенцијални жељени или нежељени биолошки ефекти раствора за континуирану хелацију, посебно новог раствора са клодронатом, који настају на нивоу ћелија од значаја за успешност лечења зуба, потребно је изоловати те ћелије из апикалне папиле. Имајући у виду да испуњавате услове прописане планом истраживања, односно да је код Вас предвиђено ортодонтским терапијским планом да се уради вађење (екстракција) умњака са незавршеним растом корена на чијем се врху налази апикална папила, молимо Вас да узмете учешће у овом истраживању.

У оквиру овог истраживања, на самом пацијенту нису предвиђене додатне процедуре сем оних које је неопходно спровести у оквиру већ индикованог терапијског плана лечења сачињеног од стране изабраног лекара специјалисте ортодонције. Комплетно истраживање је неинвазивно и спроводи се у лабораторији на ћелијама изолованим из зубне пулпе.

Уколико одлучите да учествујете у студији, током Вашег доласка на Клинику за оралну хирургију Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, на коју сте упућени ради екстракције зуба, биће прикупљени основни анамнестички подаци и екстраховани зуб који ће бити транспортован на даље лабораторијске анализе. Резултате лабораторијских анализа можете добити по завршетку студије, на лични захтев путем емејла и/или телефонским путем у складу са договором.

Потенцијални ризици

Потенцијални ризици повезани са планом истраживања су минимални, готово да не постоје, имајући у виду да се ова студија не спроводи на пацијентима, већ у лабораторији.
У случају појаве неких нежељених ефеката везаних за екстракцију зуба (нпр. оток, бол, хематом) сви пацијенти ће бити збринути у складу са принципима лекарске доктрине.

Добити повезане са истраживањем

Резултати добијени овим истраживањем допринеће бољем разумевању ефеката раствора за континуирану хелацију, посебно новог раствора са клодронатом, који настају на нивоу ћелија од значаја за успешност лечења зуба и следствено развоју потенцијалних терапијских средстава у стоматологији.

Заштита података

Заштита Ваше приватности представља важан део овог истраживања. За Вашу информацију, подаци везани за Ваше лечење ће бити регистровани у компјутерској бази података искључиво путем система шифрирања. Лекар истраживач ће регистровати податке испитивања, кодирати идентитет испитаника и обавестити ординирајућег лекара. Идентитет сваког испитаника ће бити непознат свакоме осим лекару који спроводи лечење и лекару истраживачу. Такође, због заштите Ваше приватности, на Вашим узорцима неће се налазити Ваше име, нити било која информација која би могла да Вас повеже са узорком или било којим резултатом тестирања. Ваши узорци ће бити обележени само шифром. Резултати лабораторијског истраживања биће, такође, регистровани у компјутерској бази у оквиру евиденционих лабораторијских картона али искључиво према систему шифара. Сваки испитаник има право да буде упућен у регистроване сачуване информације. Ове информације ће Вам пружити лекар истраживач. Медицинска документација о испитанику и евиденциони лабораторијски картони су поверљиви документи те Вас обавештавамо да осим ординирајућег лекара приступ овим информацијама могу имати само чланови истраживачког тима ради свеобухватне анализе података. Истраживање је одобрено од стране Етичког одбора Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, што представља потврду о заштити и поштовању права испитаника.

Финансијске обавезе испитаника везане за истраживање
Испитаници који потпишу информисани пристанак и буду укључени у истраживање немају финансијске обавезе везане за истраживање односно не сносе трошкове лабораторијских анализа предвиђених планом истраживања.

Добровољно учествовање/повлачење пристанка и учешћа у истраживању
Учешће у истраживању је у потпуности добровољно. Можете повући Вашу сагласност за учешће у овом истраживању у сваком тренутку и из било ког разлога. Повлачање из истраживања неће угрозити Ваше будуће лечење.

Захвални смо на Вашем издвојеном времену да се упознате са потребама нашег истраживања. Копија Ваше потписане сагласности, уз примерак овог обавештења, биће Вам обезбеђена. Ако имате било какво питање везано за истраживање молимо да се обратите докторанду др Јовану Бадњару на телефон 065 2433752 или ментору проф. др Љиљани Ђукић лично у ОЈ Институтски предмети Стоматолошког факултета Универзитета у Београду или на телефон 065 4460079.

Универзитет у Београду
Стоматолошки факултет

ИНФОРМИСАНИ ПРИСТАНАК ИСПИТАНИКА

за учествовање у истраживању „ **Ефекат континуиране хелације и калцијум силикатних материјала на ослобађање биоактивних молекула из хуманог дентина и одонтогену диференцијацију матичних ћелија апикалне папиле** “

- Прочитао/ла сам горе наведене информације или су ми прочитане. Прочитао/ла и разумео/ла сам ову изјаву о пристанку. Имао/ла сам прилике да постављам питања и на сва постављена питања добио/ла сам задовољавајући одговор.
- Мој потпис на овом обрасцу пристанка значи да добровољно пристајем да будем испитаник/учесник у овом истраживању и на издавања моје медицинске документације на начин како је објашњено у овом информисаном пристанку. Разумем да имам право да у сваком тренутку одустанем од учешћа, без икаквог објашњења.
- Ја, доле потписани/а, дајем своју сагласност за прикупљање података и узорака који ће бити обрађени у овом истраживању, као и њихове даље анализе предвиђене овим истраживањем.
- Потврђујем да сам лекара, у складу са својим сазнањем, детаљно упознао/ла са својим здравственим стањем.
- Не одричем се својих законских права потписивањем овог документа. Добио/ла сам примерак овог информисаног пристанка (образац Обавештења за испитанике и копију потписаног обрасца Информисаног пристанка испитаника).

Испитаник

Име и презиме Потпис Датум

Законом овлашћени пуномоћник/родитељ (према потреби)

Име и презиме Потпис Датум

Особа која је добила пристанак (лекар истраживач)

Име и презиме Потпис Датум

---

*Сведок (по потреби)

Име и презиме Потпис Датум

**Сведок није потребан, осим у случају да испитаник није у могућности да чита (нпр. слепило или неписменост) или у случају да је наведено у плану испитивања. Ако је сведок присутан, сведок мора надгледати целокупан поступак потписивања информисаног пристанка.*

На основу члана 53. Статута Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, Наставно научно веће Стоматолошког факултета, на седници одржаној 23.06.2026. године, донело је следећу

О Д Л У К У

Именује се комисија за оцену предлога теме докторске дисертације **др Јована Бадњара,** под називом **„Ефекат континуиране хелације и калцијум силикатних материјала на ослобађање биоактивних молекула из хуманог дентина и одонтогену диференцијацију матичних ћелија апикалне папиле“**, у саставу:

- проф. др Јелена Рогановић, редовни професор, Стоматолошки факултет у Београду
- проф. др Сања Милутиновић-Смиљанић, редовни професор, Стоматолошки факултет у Београду
- доц. др Ивана Милановић, доцент, Стоматолошки факултет у Београду
- доц. др Александар Јаковљевић, доцент, Стоматолошки факултет у Београду
- проф. др Марко Стојановић, ванредни професор, Медицински факултет у Београду

Овом Одлуком се ставља ван снаге Одлука бр. 3/54 од 25.06.2026. године.

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 (5), Одсеку за наставу, Већу и Писарници.

Шеф
Административно-кадровског одсека
Николија Мартић

Декан
Стоматолошког факултета
проф. др Војкан Лазић

НАСТАВНО НАУЧНОМ ВЕЋУ
СТОМАТОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

ИЗВЕШТАЈ КОМИСИЈЕ ЗА ОЦЕНУ ПРЕДЛОГА ТЕМЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Одлуком Наставно научног већа Стоматолошког факултета, Универзитета у Београду, донетој на петој редовној седници школске 2025/26. године, одржаној 23.06.2026. године, а на основу члана 53. Статута Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, именована је Комисија за оцену предлога теме докторске дисертације **др Јована Бадњара,** под називом „**Ефекат континуиране хелације и калцијум силикатних материјала на ослобађање биоактивних молекула из хуманог дентина и одонтогену диференцијацију матичних ћелија апикалне папиле**“ у следећем саставу:

1. **Проф. др Јелена Рогановић**, редовни професор, ОЈ Институтски предмети - Фармакологија у стоматологији, Стоматолошки факултет Универзитет у Београду, Председник комисије;
2. **Проф. др Сања Милутиновић-Смиљанић**, редовни професор, ОЈ Институтски предмети - Општа и орална хистологија и ембриологија, Стоматолошки факултет Универзитет у Београду, Члан комисије;
3. **Доц. др Ивана Миланović**, доцент, Клиника за болести зуба, Стоматолошки факултет Универзитет у Београду, Члан комисије;
4. **Доц. др Александар Јаковљевић**, доцент, ОЈ Институтски предмети - Патолошка физиологија, Стоматолошки факултет Универзитет у Београду, Члан комисије;
5. **Проф. др Марко Стојановић**, ванредни професор, Институт за фармакологију, клиничку фармакологију и токсикологију, Медицински факултет Универзитета у Београду, Члан комисије.

На основу прегледане приложене документације о предложеној теми докторске дисертације, Комисија подноси Наставно научном већу следећи:

ИЗВЕШТАЈ

1. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

Јован Бадњар рођен је у Крушевцу, 07.06.1996. године, где је завршио основну и средњу школу (Гимназија) као носилац Вукове дипломе. На Стоматолошки факултет Универзитета у Београду уписао се школске 2015/2016. године. Дипломирао је 2021.

године са просечном оценом 9,43. Докторске академске студије на Стоматолошком факултету Универзитета у Београду уписао је 2022. године. Од 2023. године стипендиста је Министарства науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије. У школској 2025/2026. години био је ангажован као демонстратор на предмету Општа и орална биохемија на Стоматолошком факултету Универзитета у Београду. Говори енглески језик.

До сада, др Бадњар је објавио следеће радове:

1. Dzeletovic Bojan, Bosnjak Ivana, Antonijevic Djordje, **Badnjar Jovan**, Petrov Zoran, Galic-Opacic Vanja. Radiopacity of premixed and two-component calcium silicate-based root canal sealers. Balkan Journal of Dental Medicine. 2022;26(3):161–166. doi: 10.5937/bjdm2203161D (категорија М51)
2. Dzeletovic Bojan, Bosnjak Ivana, Antonijevic Djordje, **Badnjar Jovan**, Petrov Zoran, Galic-Opacic Vanja. Radiopacity of calcium silicate-based endodontic sealers using digital imaging. Serbian Dental Journal. 2021;68(4):189–196. doi: 10.2298/SGS2104189D (категорија М51)
3. Dzeletovic Bojan, Milanovic Ivana, Antonijevic Djordje, **Badnjar Jovan**, Petrov Zoran, Petrovic Violeta, Teodorovic Nevenka. Radiopacity of premixed calcium silicate-based endodontic sealers. Acta stomatologica Naissi. 2021;37(84):2256–2256. doi: 10.5937/asn2184256D (категорија М52)

На међународним конгресима др Бадњар је имао пет саопштења:

1. Dželetović B, **Badnjar J**, Đukić Lj. Repair of root perforation caused by cast post and core. 22th ESE Biennial Congress, Paris, France, 3–6. September, 2025. Abstract GE048. (M34)
2. **Jovan Badnjar**, Minja Černjanski, Marija Milić, Aleksandra Popovac, Aleksandra Milić-Lemić, Ivan Dožić, Ljiljana Đukić. Salivary opiorphin and vascular health markers in hypertensive patients with/without type 2 diabetes. 29th BaSS Congress, Belgrade, Serbia, April 24–26, 2025. Abstract book, pp. 355 (PP 134). (M34)
3. **Jovan Badnjar**, Ljiljana Đukić, Ivan Dožić, Gavrilo Brajović, Bojan Dželetović, Marija Milić. Soluble alpha-Klotho, vascular and inflammatory markers in saliva of elderly dental patients with and without type 2 diabetes mellitus. 34th Annual Congress of European College of Gerodontology (ECG), Belgrade, Serbia, June 6–7, 2024. Abstract book, pp. 31–32 (OR-7). (M34)
4. **Jovan Badnjar**, Minja Černjanski, Nađa Nikolić, Ljiljana Đukić, Aleksandar Jakovljević, Marija Milić. Type 2 diabetes mellitus-induced changes of vascular and inflammatory markers in stimulated whole saliva of elderly dental patients — protein and gene expression levels. 34th Annual Congress of European College of Gerodontology (ECG), Belgrade, Serbia, June 6–7, 2024. Abstract book, pp. 57–58 (OR-38). (M34)
5. Ljiljana Đukić, Bojan Dželetović, Jelena Krunić, **Jovan Badnjar**, Maja Ležaja Zebić. Platelet-derived growth factor release from coronal dentine by pulp-capping dental materials. 27th Congress of the Balkan Stomatological Society — BaSS, Istanbul, Turkey, November 9–11, 2023. Abstract book, pp. 124 (P-05). (M34)

2. ОБРАЗЛОЖЕЊЕ ТЕМЕ

2.1. НАУЧНА ОБЛАСТ

За тему докторске дисертације др Јован Бадњар предложио је тему под називом „Ефекат континуиране хелације и калцијум силикатних материјала на ослобађање биоактивних молекула из хуманог дентина и одонтогену диференцијацију матичних ћелија апикалне папиле“ из области базичних и клиничких стоматолошких наука. Докторска дисертација би се изводила у оквиру Клинике за оралну хирургију и лабораторија Имплантолошко-истраживачког центра Стоматолошког факултета Универзитета у Београду.

2.2. ПРЕДМЕТ НАУЧНОГ ИСТРАЖИВАЊА

Дентин представља минерализовано ткиво које садржи 70% неорганског, 20% органског дела и 10% воде. Неорганski део чине соли калцијума и фосфата организоване у виду кристала хидроксиапатита. Органски део дентина, односно дентински матрикс, већински се састоји од колагена тип I (90%) док остатак чине неколагени протеини (NCP, енг. *non-collagenous proteins*) (Nanci, 2018). Неколагени протеини обухватају различите структуралне протеине, факторе раста, хемокине, цитокине и ензиме који се једним именом називају биоактивни (сигнални) молекули (Smith и сар., 2012). Дентин је препознат као резервоар (депо) биоактивних молекула који остварују кључну улогу у процесима репарације и регенерације пулпо-дентинског комплекса (Smith и сар., 2012). Наиме, током дентиногенезе, биоактивни молекули секретовани од стране одонтобласта уграђују се у структуру дентина и формирају депо (Smith и сар., 1998; Baker и сар., 2009). Услед оштећења дентина, било каријесним процесом или јатрогено, посредством различитих средстава (нпр. ириганаси) или стоматолошких материјала, долази до њиховог ослобађања и последичне стимулације ћелијске миграције, пролиферације и диференцијације што резултује ткивном репарацијом или регенерацијом (Dung и сар., 1995; Chae и сар., 2018; Wattanapakkavong и Srisuwan, 2019).

Фактори раста су кључни биоактивни молекули који учествују у регулацији пролиферације, диференцијације и миграције ћелија, чиме доприносе репараторним процесима и очувању функционалног интегритета пулпо-дентинског комплекса (Schmalz и сар., 2017). У дентинском матриксу до сада је забележено присуство великог броја фактора раста попут трансформишућег фактора раста β1 (енгл. *Transforming growth factor β1* – TGF-β1), васкуларног ендотелног фактора раста (енгл. *Vascular endothelial growth factor* – VEGF), тромбоцитног фактора раста (енгл. *Platelet-derived growth factor* – PDGF) и других (Smith и сар., 2012). TGF-β1 је један од најважнијих дентиногених фактора раста који усмерава диференцијацију мезенхималних ћелија у одонтобластима сличне ћелије (Bai и сар., 2023). Ипак, овај ефекат је ограничен на фазу ране диференцијације јер продужено излагање мезенхималних ћелија овом фактору раста инхибира експресију *dspp* гена и смањује депоновање минерализованог ткива (Bai и сар., 2022). С друге стране, иако се VEGF и PDGF најчешће повезују са процесима ангиогенезе (Zhang и сар., 2011; Jiang и сар., 2025), студије су показале да ови фактори раста могу усмерити диференцијацију мезенхималних матичних ћелија у правцу одонтобластима сличних ћелија, чиме се истиче њихов дентиногени потенцијал (Aksel

и Huang, 2017; Zhang и сар., 2017; Okada и сар., 2025). Такође, показано је да VEGF и PDGF испољавају изражене митогене и хемотактичке ефекте на мезенхималним матичним ћелијама (Pan и сар., 2024; Xu и сар., 2024).

Осим фактора раста, кључну улогу у репараторним процесима зубних ткива имају и SIBILING молекули (енг. *small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein;* мали интегрин- везујући лиганд, Н-везани гликопротеин) (Butler и Ritchie, 1995). Ова породица структуралних неколагених протеина обухвата више молекула укључујући дентин сијалофосфопротеин (енгл. *Dentin Sialophosphoprotein* - DSPP) и дентински матриксни протеин 1 (енгл. *Dentin matrix acidic phosphoprotein 1* - DMP-1) (Fisher и сар., 2001). Синтетисани од стране одонтобласта током дентиногенезе, ови молекули имају кључну улогу у процесима минерализације дентина (Ye и сар., 2004; Liu и сар., 2021). DSPP представља инактивни прекурсорски протеин који се активира деобом, чиме настају функционални фрагменти попут дентин сијалопротеина (енгл. *Dentine sialoprotein* – DSP) (Yamakoshi и сар., 2005). DSP учествује у иницијацији минерализације дентинског матрикса (Suzuki и сар., 2009). Такође, показано је да DSP доводи до пролиферације, миграције и одонтобластне диференцијације мезенхималних матичних ћелија (Wan и сар., 2016; Li и сар., 2017). Експресија гена за DMP-1 је у одонтобластима најизраженија током секреције примарног дентина, а касније опада (Hao и сар., 2004). Показано је да се у присуству DMP-1 промовише одонтобластна диференцијација матичних ћелија зубне пулпе (Chaussain и сар., 2009). Индукцијом експресије гена за DMP-1 у мезенхималним матичним ћелијама иницира се њихова одонтобластна диференцијација (Narayanan и сар., 2001) праћена стимулацијом експресије гена за DSPP (Narayanan и сар., 2006). Стога, DMP-1 представља регулатор нивоа DSPP (Ye и сар., 2004).

Основни принцип успешне репарације односно регенерације ткива подразумева сигналну каскаду која функционише као сложен секвенцијални механизам укључујући компоненте као што су биоактивне сигналне молекуле и циљне ћелије. Циљне ћелије од посебног значаја за регенерацију и репарацију ткива су матичне ћелије (Kim и Kim, 2025). Зубна ткива представљају богат извор мезенхималних матичних ћелија (Egusa и сар., 2012). У ткиву апикалне папиле, идентификоване су мезенхималне матичне ћелије познатије као матичне ћелије апикалне папиле (SCAP; енг. *stem cells from the apical papilla*) (Sonoyama и сар., 2008). Захваљујући израженом пролиферативном потенцијалу, способности миграције и мултипотентности, SCAP представља значајан ћелијски извор у процесима репарације пулпо-дентинског комплекса (Huang и сар., 2025). Поред могућности диференцијације у одонтобластима сличне ћелије и учешћа у формирању репараторног дентина (Sonoyama и сар., 2006), њихов потенцијал за диференцијацију у ендотелу сличне (Yi и сар., 2021) и неуронима сличне ћелије (Liu и сар., 2022) указује на могућу улогу у регенерацији васкуларних и нервних компоненти пулпног ткива. Ово је од посебног значаја у регенеративној ендодонцији (Huang и сар., 2025).

Ендодонтски третман зуба представља једну од најчешћих стоматолошких интервенција. Светска преваленција особа са најмање једним ендодонтски леченим зубом износи чак 55,7%, док посматрано на нивоу свих зуба у општој популацији, преваленција ендодонтски лечених зуба износи 8,2% (León-López и сар., 2022). Преваленција ендодонтски лечених зуба значајно варира у зависности од географског

подручја. Европа бележи високу преваленцију где 59,6% популације има најмање један ендодонтски лечен зуб (León-López и сар., 2022). У појединим деловима Скандинавије и Источне Европе, ови проценти у старијим популацијама достижу и преко 80% (León-López и сар., 2022). Познато је да савремени ендодонтски третман укључује примену средстава за иригацију канала корена зуба (ириганаси) и биоактивних стоматолошких материјала као што су калцијум силикатни материјали (Wang и сар., 2023; Zou и сар., 2024). Ова средства, односно материјали, имају различите, али комплементарне улоге у дезинфекцији и запшивању система коренских канала што је од великог значаја за успех ендодонтске терапије. Међутим, потребно је истаћи да позитивном клиничком терапијском исходу ендодонтске терапије у значајној мери доприноси ефекат ириганаса и биоактивних материјала на мобилизацију биоактивних молекула из локалних ткива што заправо одражава природни механизам зарастања рана (Schmalz и сар., 2017). Стога, са физиолошког аспекта, а у контексту репарације и регенерације ткива, предност ослобађања биоактивних молекула из дентина је локална доступност, на месту одвијања процеса репарације/регенерације, и погодност за брзо индуковање сигналних процеса на ћелијском нивоу у зубној пулпи и другим околним ткивима (Schmalz и сар., 2017).

Званичан протокол иригације за већину ендодонтских терапијских захвата до данас није формиран, и у клиничкој пракси су у употреби различити протоколи (Boutsioukis и Arias-Moliz, 2022). Препоручени протокол иригације подразумева коришћење натријум хипохлорита (NaOCl), снажног органолитика и антимикробног средства, током читавог трајања механичке инструментације канала, чиме се константно обезбеђује нова количина свежег раствора, неопходна због убрзаног трошења слободног хлора у контакту са органским ткивом и дентинским дебријем (Boutsioukis и Arias-Moliz, 2022). Након завршене механичке препарације канала, приступа се финалној иригацији која подразумева коришћење хелатора ради уклањања размазног слоја, као и следствену иригацију са NaOCl ради уклањања заосталих микроорганизама из дентинских тубула (Zou и сар., 2024). Овакав концепт иригације где се раствор NaOCl и хелатора користе један за другим без мешања назива се секвенцијална хелација (Ballal и сар., 2024). У сврхе секвенцијалне хелације у ендодонтској терапији се користе различити раствори попут етилендиаминотетраацетата (EDTA), лимунске киселине, и др. (Fortea и сар., 2024).

Насупрот томе, концепт континуиране хелације заснива се на коришћењу једног раствора током читавог трајања ендодонтске терапије. Идеја да се хелатор, отпоран на оксидацију, комбинује директно са раствором натријум хипохлорита, како би се убрзало и поједноставило чишћење коренског канала током ендодонтских процедура, датира пре више од 20 година (Girard и сар., 2005). Континуираном хелацијом постижу се органолитички, антимикробни и минералолитички ефекти у једном раствору, чиме се поједностављује и убрзава процедура иригације (La Rosa и сар., 2024). Раствори за континуирану хелацију остварују компарабилне или чак боље антимикробне и органолитичке и минералолитичке ефекте у односу на NaOCl и секвенцијалну хелацију (Giardino и сар., 2019; Kfir и сар., 2020; Wright и сар., 2020b; Campello и сар., 2022; La Rosa и сар., 2024; Razumova и сар., 2025).

Бисфосфонати представљају класу лекова намењених третману ресорптивних коштаних обољења попут Пагетове болести, остеопорозе, мултиплог мијелома, као и

метастатских тумора на костима. Први пут синтетисани средином 19. века, бисфосфонати су се примарно користили као индустријски хелатни агенси, а тек од 60-их година 20. века користе се за лечење клиничких поремећаја метаболизма калцијума (Russell, 2011). У зависности од присуства азота у оквиру бочних ланаца, бисфосфонати су подељени у две велике групе – без- азотне бисфосфонате (NN-BP; нпр, етидронат, клодронат) и азотне бисфосфонате (N-BP; памидронат, алендронат, золедронат). Ове две групе се разликују, како по афинитету за везивање хидроксилапатита у корист N-BP, тако и по другачијим ћелијским механизмима инхибиције ресорпције коштаног ткива (Russell и сар., 2008). Појавом N-BP који представљају новије и потентније инхибиторе ресорпције коштаног ткива, клинички значај NN-BP у терапији примарних индикација је смањен (Ganesan и сар., 2025). Међутим, данас, етидронат се и даље користи као хелатор у индустрији, тачније козметичкој индустрији (Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, 2017), а дањом пренаменом, индикација за његову примену укључује и континуирану хелацију у стоматологији.

Етидронат (HEDP; енг. *hydroxyethylidene diphosphonic acid*) је слаб хелатор, алкалног pH, и представља једини, до сада регистровани раствор (на територији ЕУ) на бази бисфосфоната, за употребу у континуираној хелацији, под фабричким називом *Dual Rinse HEDP* (Zollinger и сар., 2018). *In vitro* студије су показале да 2,5% NaOCl + 9% HEDP мешавина има боља антимикробна својства у односу на хипохлорит (Campello и сар., 2022), што је нарочито изражено у присуству дентинског дебрија и размазног слоја (Arias-Moliz и сар., 2016; Morago и сар., 2016). Ово се објашњава константним уклањањем размазног слоја и дебрија од стране HEDP, што омогућава раствору NaOCl да континуирано буде у контакту са микроорганизмима унутар дентинских тубула (Paqué и сар., 2012; Arias-Moliz и сар., 2016). Органолитички ефекти раствора за континуирану хелацију са HEDP су благо редуковани у односу на хипохлорит што је последица реакције NaOCl и HEDP и смањења концентрације OCl^- јона, главних јона одговорних за органолитички ефекат NaOCl (Tartari и сар., 2015; Wright и сар., 2020b). Минералолитички ефекти у мешавини 2,5% NaOCl + 9% HEDP су очувани (Ballal и сар., 2019). Ипак, како се зарад компатибилности са NaOCl користе тетранатријумове соли HEDP са високим pH, хелација је спорија у поређењу са секвенцијалном хелацијом, али резултати показују да је једнако ефективна (Deari и сар., 2019; Kfir и сар., 2020). С обзиром на чињеницу да је HEDP слабији хелатор од EDTA, показано је да континуирана хелација етидронатом мање оштећује механичка својства дентина у односу на секвенцијалну хелацију (Ballal и сар., 2024).

Клодронат представља други бисфосфонат предложен 2020. године као потенцијални хелатор за коришћење у протоколу континуиране хелације као алтернатива HEDP-у (Wright и сар., 2020a). Највећа предност клодроната у односу на HEDP је чињеница да у мешавини са 5% NaOCl, задржава непромењене концентрације слободног хлора преко 18 сати (Wright и сар., 2020a). Установљено је да мешавина 5% NaOCl + 7,6% клодроната има унапређена органолитичка својства у односу на 5% NaOCl + 7,7% HEDP (Wright и сар., 2020b). Оваква органолитичка својства мешавине клодроната су компарабилна са 5% NaOCl (Wright и сар., 2020b). Антимикробна својства мешавине клодроната и хипохлорита су очувана и компарабилна са NaOCl (Wright и сар., 2021a). Иако мешавина NaOCl и клодроната уклања размазни слој са зидова канала,

примећено је да заостаје део размазног слоја који оклудира улазе у дентинске тубуле (Wright и сар., 2020a). Проценат оклудираних тубула је већи у односу на NaOCl и HEDP мешавину (Wright и сар., 2020a). Претпоставља се да је разлог томе нижи афинитет клодроната ка калцијуму од HEDP, што се огледа у нижој константи стабилности са калцијумом (Martell и Smith, 1989). Механичка својства дентина након иригације раствором NaOCl и клодроната, укупног трајања од 1 сата, компарабилна су са протоколом секвенцијалне хелације, где је EDTA била у контакту са дентином 2 минута, што потврђује да је клодронат слабији хелатор од EDTA, као и чињеницу да у алкалној средини, попут оној у растворима за континуирану хелацију, мање Ca^{2+} јона бива доступно хелацији, јер базна средина погодује преципитацији, а не дисолуцији хидроксиапатита (Dawes, 2003; Wright и сар., 2021b).

Раствори за иригацију, као што су NaOCl, EDTA и друга хелатна средства, могу изменити састав и структуру дентина, чиме утичу на ослобађање биоактивних молекула пореклом из дентина (Tavares и сар., 2021). Као што је већ поменуто, ово иригацији даје важну биолошку димензију, нарочито у регенеративној ендодонцији, где ослобођени молекули могу утицати на понашање матичних ћелија, ангиогенезу и регенерацију/репарацију ткива (Smith и сар., 2016; De Oliveira и сар., 2025). С обзиром на органолитичко својство, раствор NaOCl денатурише факторе раста из дентина (Galler и сар., 2015). У секвенцијалној хелацији показано је да раствор 17% EDTA значајно ублажује негативне ефекте нижих концентрација NaOCl (0,5%, 1,5%, 3%) те га је неопходно применити у случајевима када је репарација пулпо-дентинског комплекса од значаја у терапији (Martin и сар., 2014; Kim и сар., 2018). EDTA може да ослободи биоактивне молекуле из дентинског матрикса као последица хелатних и деминерализујућих ефеката овог раствора на дентин (Dos Reis-Prado и сар., 2022). Најчешће испитивано је ослобађање TGF-β1 са највећим бројем студија које показују успешно ослобађање овог фактора раста посредством EDTA (Galler и сар., 2015; Chae и сар., 2018; Ivica и сар., 2019; Sungur и сар., 2019; Atesci и сар., 2020). EDTA није била у стању да ослободи VEGF (Sadaghiani и сар., 2016; Atesci и сар., 2020) или су ослобођене концентрације ниске (Galler и сар., 2015). PDGF је детектован у дентинском матриксу након излагања дентинског праха дејству EDTA (Roberts-Clark i Smith, 2000; Duncan и сар., 2017).

Малобројне студије о утицају етидроната примењеног у оквиру секвенцијалне хелације на ослобађање биоактивних молекула из дентина су показале да 9% раствор етидроната ослобађа компарабилне или веће концентрације фактора раста (TGF-β1, VEGF) у поређењу са 17% EDTA (Sungur и сар., 2019; Khan и сар., 2021; Mumcu и сар., 2024). Једина студија која се бавила утицајем континуиране хелације (етидронатом и клодронатом) на ослобађање биоактивних молекула из дентина је испитивала ослобађање TGF-β1, након апликације интраканалних медикамената и следствене иригације (Sridhar и сар., 2025). Резултати ове студије су показали да раствор 9% етидроната са 1,5% NaOCl ослобађа компарабилне концентрације TGF-β1 у поређењу са протоколом секвенцијалне хелације (1,5% NaOCl/17% EDTA) док 1,5% NaOCl + 7,6% клодронат, у зависности од примењеног медикамента, ослобађа компарабилне или веће концентрације TGF-β1 у односу на исти протокол секвенцијалне хелације (Sridhar и сар., 2025). Такође, 1,5% NaOCl + 7,6% клодронат ослобађа веће концентрације TGF-β1 у

односу на 1,5% NaOCl + 9% етидронат, независно од примењеног медикамента (Sridhar и сар., 2025).

Што се тиче цитотоксичности раствора за континуирану хелацију на матичне ћелије, литературни подаци су такође малобројни. Етидронат испољава индиректни цитотоксични ефекат на мезенхималним матичним ћелијама пулпе, највероватније као последица хелације јона калцијума и магнезијума неопходних за адхезију ћелија за подлогу (Ballal и сар., 2019; Sungur и сар., 2019). Ипак, у раствору за континуирану хелацију са 2,5% NaOCl, 9% етидронат нема већу цитотоксичност од 2,5% хипохлорита, што показује да је цитотоксичност раствора за континуирану хелацију последица присуства слободних јона хлора порекла од NaOCl (Ballal и сар., 2019). Међутим, до сада нема литературних података о цитотоксичном ефекту бисфосфонатних раствора (етидроната и клодроната), како самих тако и у раствору за континуирану хелацију, на SCAP, као ни о утицају раствора за континуирану хелацију на њихову диференцијацију.

Литературни подаци показују потенцијалну примену раствора за континуирану хелацију у току регенеративних ендодонтских процедура (Akyüz и сар., 2025), стога испитивање биолошких ефеката ових раствора, односно утицаја на ослобађање биоактивних молекула из дентина и вијабилност и одонтогену диференцијацију SCAP је од посебног значаја јер, иако присутни само кратак, ограничени временски период у каналу корена зуба, потенцијално могу утицати на регенеративне/репараторне процесе зубних ткива реметећи сигналне процесе.

Калцијум силикатни материјали (engl. *Calcium silicate based materials* – CSBM) представљају биокомпатибилне и биоактивне материјале који налазе примену у великом броју индикација где долазе у директан контакт са дентинским, пулпним и периапикалним ткивима (Küçükkaya Eren, 2023). Материјали попут минерал триоксид агрегата (engl. *mineral trioxide aggregate* – MTA) и Биодентина (*Biodentine, Septodont, France*) представљају неке од најзначајнијих представника CSBM. Биоактивност CSBM се огледа у њиховој способности покретања и модулације молекуларних и ћелијских механизама који воде ка репарацији пулпо-дентинског комплекса (Schmalz и сар., 2023). Између осталог, показано је да MTA и Биодентин могу да ослободе различите биоактивне молекуле попут TGFβ1 из дентина (Tomson и сар., 2017; Wattanapakkavong и Srisuwan, 2019). Ово се дешава током процеса везивања CSBM где долази до стварања калцијум хидроксида (CaOH2) и последичне протеолизе дентинског матрикса под утицајем хидроксилних јона (Huang и сар., 2018).

Познато је да је Биодентин биокомпатибилан CSBM са временски зависним ефектом на вијабилност SCAP. У *in vitro* студијама је показано да Биодентин може да индукује одонтогену диференцијацију SCAP, што се огледа у појачаној експресији гена карактеристичних за одонтогену диференцијацију (DSPP, DMP-1, остеокалцин, транскрипциони фактор 2 (енг. *Runt-related transcription factor 2* – Runx2), алкална фосфатаза) (Wongwatanasanti и сар., 2018; Saberi и сар., 2019). Ефекти Биодентина на одонтогену диференцијацију SCAP се могу запазити и кроз минерализациони потенцијал као и активност алкалне фосфатазе (енг. *Alkaline phosphatase* – ALP). Наиме, у присуству Биодентина долази до депоновања калцијума и минерализације (Wongwatanasanti и сар., 2018). Активност ALP је испитивана у само једној студији где је примећен дозно зависан ефекат овог материјала на ензимску активност (Saberi и сар.,

2019).

Примена раствора за иригацију и биоактивних стоматолошких материјала, као што су калцијум силикатни материјали, током ендодонтске терапије је неопходна за постизање задовољавајућег терапијског исхода. Како терапијски исход зависи од одговора ткива на примену терапијских средстава и материјала, разумевање њихових ефекта са биолошког аспекта је од великог значаја и захтева пажљив приступ у истраживањима. Њихово адекватно комбиновање и редослед примене је круцијалан како би се избегли нежељени биолошки ефекти. Значај разумевања ефекта симултане примене средстава за иригацију и материјала на сигналне путеве одговорне за репарацију и регенерацију ткива је препознат у литератури (Schmalz и сар., 2017). Међутим, у литератури нема података о утицају континуиране хелације, посебно новог раствора, клодроната са натријум хипохлоритом, на нивоу ослобађања биоактивних молекула из дентина, као ни на одонтогени диференцијациони потенцијал матичних ћелија апикалне папиле, како самостално, тако ни у присуству калцијум силикатних материјала, а што је основа истраживања у оквиру израде ове докторске дисертације.

На основу анализе предмета истраживања коју је кандидат приложио, установљено је да је описана научна проблематика актуелна. Како су биолошки ефекти континуиране хелације, посебно новог раствора, клодроната са натријум хипохлоритом, на нивоу ослобађања биоактивних молекула из дентина, као и на нивоу одонтогеног диференцијационог потенцијала матичних ћелија апикалне папиле, како самостално, тако и у присуству калцијум силикатних материјала, недовољно истражени, а доступни научни подаци указују на њихов значај у процесима репарације и регенерације зубних ткива, испитивање наведених параметара је научно оправдано. Сматрамо да је све наведено послужило као адекватна основа за постављање радних хипотеза и циљева истраживања.

2.3. РАДНЕ ХИПОТЕЗЕ

Имајући у виду досадашња сазнања постављене су следеће хипотезе:

1. Раствори за континуирану хелацију (мешавина етидроната са натријум хипохлоритом и мешавина клодроната са натријум хипохлоритом) ослобађају веће концентрације биоактивних молекула из дентина у поређењу са секвенцијалном хелацијом (применом натријум хипохлорита и EDTA) и позитивно утичу на исти ефекат Биодентина, при чему мешавина клодроната са натријум хипохлоритом ослобађа веће концентрације биоактивних молекула из дентина у односу на мешавину етидроната са натријум хипохлоритом;
2. Раствори за континуирану хелацију (мешавина етидроната са натријум хипохлоритом и мешавина клодроната са натријум хипохлоритом) испољавају цитотоксичне ефекте на матичне ћелије апикалне папиле и инхибирају диференцијацију SCAP, док присуство Биодентина умањује ову инхибицију.

2.4. НАУЧНИ ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу свега наведеног постављени су следећи циљеви истраживања:
А. Испитивање ослобађања биоактивних молекула:

1. испитати ефекат Биодентина, MTA и калцијум хидроксида на ослобађање биоактивних молекула (TGFβ1, VEGF, PDGF и DSP) на моделу парова дентинских дискова, одредити њихове концентрације и извршити компаративну анализу;
2. испитати ефекат раствора за континуирану хелацију, како раствора који већ постоји у клиничкој примени (етидронат са натријум хипохлоритом), тако и новог раствора, клодроната са натријум хипохлоритом, на ослобађање биоактивних молекула (TGFβ1, VEGF, PDGF и DSP) на моделу парова коренских сегмената, одредити њихове концентрације и извршити компаративну анализу;
3. испитати ефекат раствора за континуирану хелацију, како раствора који већ постоји у клиничкој примени (етидронат са натријум хипохлоритом), тако и новог раствора, клодроната са натријум хипохлоритом, на ослобађање биоактивних молекула (TGFβ1, VEGF, PDGF и DSP) у присуству Биодентина на моделу парова коренских сегмената, одредити њихове концентрације и извршити компаративну анализу.

Б. Испитивање цитотоксичног ефекта и диференцијације матичних ћелија апикалне папиле (SCAP):

1. испитати цитотоксични ефекат раствора за континуирану хелацију, како раствора који већ постоји у клиничкој примени (етидронат са натријум хипохлоритом), тако и новог раствора, клодроната са натријум хипохлоритом, на матичним ћелијама апикалне папиле (SCAP) и извршити компаративну анализу;
2. испитати утицај раствора за континуирану хелацију, како раствора који већ постоји у клиничкој примени (етидронат са натријум хипохлоритом), тако и новог раствора, клодроната са натријум хипохлоритом, на одонтогени диференцијациони потенцијал матичних ћелија апикалне папиле (SCAP) у присуству Биодентина и извршити компаративну анализу

2.5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА

Предложено истраживање представља академско некомерцијално *in vitro* научно истраживање неинвазивног карактера на екстрахованим зубима и на матичним ћелијама изолованим из апикалне папиле (SCAP; енг. *stem cells of apical papilla*) које ће бити спроведено у складу са принципима Хелсиншке декларације, Добре клиничке праксе (енгл. *Good Clinical Practice - GCP*) и Добре лабораторијске праксе (енгл. *Good Laboratory Practice - GLP*) уз одобрење Етичког одбора Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. Истраживање ће бити спроведено у организационим јединицама Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, и то у лабораторијама Имплантолошко истраживачког центра и на Клиници за оралну хирургију, уз сагласност

управника организационих јединица по добијању одобрења Етичког одбора.

Сви материјали и препарати који ће бити коришћени у студији користиће се искључиво у истраживачке сврхе у *in vitro* условима у складу са стандардним процедурама и упутствима произвођача.

Испитивање ефекта калцијум силикатних материјала Биодентина и МТА (контролни калцијум силикатни материјал), као и калцијум хидроксида (контрола) на ослобађање биоактивних молекула на моделу парова дентинских дискова

Истраживање ће бити спроведено на екстрахованим трећим доњим моларима који су прикупљени од пацијената Клинике за оралну хирургију Стоматолошког факултета у Београду код којих је индикована екстракција трећих доњих молара из ортодонтских разлога. За потребе истраживања биће потребно укупно 32 интактна зуба без присутних каријесних лезија, фрактура, претходних терапијских процедура и без значајних анатомских аномалија. Имајући у виду да ће се истраживање спроводити на моделу парова дентинских дискова, од укупно 32 зуба биће изрезана 64 диска.

Величина узорка и снага студије за прву целину – Према литературним подацима у студијама о испитивању ослобађања фактора раста из дентина (независно од тога да ли је коришћен дентински диск или корен), величина узорка од 3 до 4 узорка по групи представља најчешћи број узорака адекватан за постизање релевантних резултата студије (Zeng и сар., 2016; Chae и сар., 2018). Међутим, како ће у овом истраживању бити коришћен модел парова дентинских дискова (литературни подаци на сличном моделу нису доступни), да би се обезбедило да потенцијално добијене разлике у ефектима буду последица примењених материјала, а не интериндивидуалних разлика у базалним нивоима биоактивних молекула дентина између независних узорака ткива, величина узорка и снага студије су одређене на основу података добијених анализом резултата спроведеног прелиминарног истраживања на истом моделу парова дентинских дискова на основу вредности концентрација TGFβ1, као модела биоактивног молекула (истраживање одобрено од стране Етичког одбора Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, број одобрења: 36/20). Како би се обезбедио довољно велики узорак да би се са поузданошћу забележила разлика између ефеката испитиваних материјала, са величином ефекта од 2,68, снагом студије од 80%, нивоом значајности (α) од 0,05 потребно је укључити 4 пара дентинских дискова по групи, односно 4 узорка по подгрупи. Величина узорка је израчуната помоћу софтверског пакета *G*Power 3.1 software for Windows* (*Heinrich Heine-Universität, Düsseldorf, Germany*) применом t-test family procedure (*Means: Difference between two dependent means (matched pairs*)). Дискови ће бити распоређени у 8 група (укупно 32 пара дискова), односно 16 подгрупа (укупно 64 диска).

Лабораторијски протокол *in vitro* студије на моделу парова дентинских дискова

Након екстракције доњи трећи молари биће испрани физиолошким раствором, а периодонцијум уклоњен са површине коренова пародонтолошком киретом. Зуби ће бити чувани у стерилним посудама са физиолошким раствором на 4°C до започињања лабораторијских процедура, не дуже од месец дана од дана екстракције.

Дискови дебљине 1,5mm биће изрезани из круничног дела зуба управно на њихову

уздужну осовину дијамантским диском при брзини окретања од 600 обртаја/минуту, при константном воденом хлађењу. Помоћу трепан сврдала унутрашњег пречника 3,5mm, уз хлађење водом, из сваког тако добијеног диска биће изрезана по 2 истоветна дентинска диска пречника 3,5mm и висине 1,5mm. Због анатомске величине зуба, могуће је изрезати максимално два идентична дентинска диска наведених димензија (пречника 3,5mm и висине 1,5mm) и извршити међусобно поређење два везана узорка. Стога, формиране су следеће групе и подгрупе у оквиру којих ће парови дентинских дискова бити случајним избором распоређени:

Група 1 (негативна контрола модела):
- подгрупа 1 – без третмана
- подгрупа 2 – без третмана

Група 2 (позитивна контрола модела):
- подгрупа 1 – калцијум хидроксид
- подгрупа 2 – калцијум хидроксид

Група 3:
- подгрупа 1 – калцијум хидроксид
- подгрупа 2 – без третмана

Група 4:
- подгрупа 1 – МТА
- подгрупа 2 – без третмана

Група 5:
- подгрупа 1 – калцијум хидроксид
- подгрупа 2 – МТА

Група 6:
- подгрупа 1 – Биодентин
- подгрупа 2 – без третмана

Група 7:
- подгрупа 1 – калцијум хидроксид
- подгрупа 2 – Биодентин

Група 8:
- подгрупа 1 – Биодентин
- подгрупа 2 – МТА

У свакој групи ће бити распоређено по 4 пара дискова, тако да је сваком материјалу изложено по 4 узорка. Након апликације материјала, дискови ће бити постављени у инкубатор на 37°C са контролисаном влажношћу од 100% током 14 дана. Након 14 дана, дискови ће пажљиво бити очишћени од материјала, урођени у 1ml пуферисаног физиолошког раствора (PBS) и инкубирани на 37°C у току 24 часа. Раствори са PBS-ом ће потом бити замрзнути на -70°C све до квантификације биоактивних молекула ЕЛИСА (енгл. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA) методом.

Квантификација фактора раста и дентин сијалопротеина ЕЛИСА методом

За квантификацију фактора раста од интереса за ово истраживање (TGF-β1, VEGF, PDGF, DSP) биће коришћени доступни комерцијални ЕЛИСА китови. Процедура квантификације ЕЛИСА методом биће спроведена у складу са протоколом произвођача за сваки молекул. Добијене вредности оптичких густина биће очитане на ЕЛИСА читачу *Rayto RT 2100C Microplate Reader* (China). Резултати ће бити изражени у pg/ml.

Испитивање ефекта раствора за континуирану хелацију на ослобађање биоактивних молекула без и са присуством Биодентина на моделу парова коренских сегмената

Истраживање ће бити спроведено на екстрахованим доњим секутићима који су прикупљени од пацијената Клинике за оралну хирургију Стоматолошког факултета у Београду код којих је индикована обострана екстракција доњих секутића из протетских или пародонтолошких разлога. За потребе истраживања биће потребно укупно 44 интактних парова зуба, односно 88 доњих секутића, без присутних каријесних лезија, фрактура, претходних терапијских процедура и без значајних анатомских аномалија.

Величина узорка и снага студије за другу целину – Одређивање величине узорка је спроведено према истим принципима као за испитивање ефекта калцијум силикатних материјала на ослобађање дентинских биоактивних молекула на моделу парова дентинских дискова. Како ће у овом делу истраживања бити коришћен модел парова коренских сегмената (литературни подаци на сличном моделу, такође, нису доступни) како би се обезбедило да потенцијално добијене разлике у ефектима буду последица примењених ириганаса односно материјала, а не интериндивидуалних разлика у базалним нивоима биоактивних молекула дентина из независних узорака ткива, величина узорка и снага студије су одређене на основу података добијених анализом резултата спроведеног прелиминарног истраживања на истом моделу парова коренских сегмената на основу вредности концентрација TGFβ1, као модела биоактивног молекула (истраживање одобрено од стране Етичког одбора Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, број одобрења: 36/13). Како би се обезбедио довољно велики узорак да би се са поузданошћу забележила разлика између ефеката испитиваних ириганаса, са величином ефекта од 2,61, снагом студије од 80%, нивоом значајности (α) од 0,05 потребно је укључити 4 пара коренских сегмената по групи, односно 4 узорка по подгрупи. Величина узорка је израчуната помоћу софтверског пакета *G*Power 3.1 software for Windows (Heinrich Heine-Universität, Düsseldorf, Germany)* применом t-test family procedure (*Means: Difference between two dependent means (matched pairs)*). Сегменти коренова ће бити распоређени у 11 група (укупно 44 пара сегмената корена), односно 22 подгрупе (укупно 88 сегмената корена).

Припрема раствора ириганаса

Сви раствори који ће бити коришћени у студији користиће се искључиво у истраживачке сврхе у *in vitro* условима у складу са стандардним процедурама и упутствима произвођача. У експериментима ће бити коришћен концентрован раствор 4% натријум-хипохлорита (*АДХИ Паноније, Панчево, Србија*), прах етидроната (*Dual Rinse HEDP, Medcem, Switzerland*) и прах клодроната (*Disodium Clodronate Tetrahydrate, TCI,*

Tokyo, Japan). Од концентрованог раствора 4% хипохлорита биће направљена разблажења у испитиваним експерименталним концентрацијама применом редестиловане воде намењене за аналитичку и лабораторијску употребу (*Реахем, Нови Сад, Србија*) и то 1,5% и 3% раствор натријум-хипохлорита. Раствор 18% клодроната биће направљен мешањем праха клодроната и редестиловане воде. pH вредност овог раствора ће бити подешена на 10,7 применом натријум хидроксида (*NaOH, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA*). Мешањем 3% хипохлорита и 18% раствора клодроната у односу 1:1, биће добијена коначна концентрација раствора која ће бити коришћена у експериментима: 9% клодронат/1,5% хипохлорит. Раствор 9% етидроната/1,5% хипохлорита биће направљен према упутству произвођача, мешањем 10 mL 1,5% хипохлорита са саджајем капсуле у којој се прах етидроната испоручује. Поред њих, биће коришћени раствори 9% клодроната и 9% етидроната добијени додатним разблаживањем са редестилованом водом. Сви раствори ће бити прављени непосредно пре експеримената.

Лабораторијски протокол *in vitro* студије на моделу парова коренских сегмената

Након екстракције, доњи секутићи биће испрани физиолошким раствором, а периодонцијум уклоњен са површине коренова пародонтолошком киретом. Зуби ће бити чувани на -70°C до започињања лабораторијских процедура.

Сегменти коренова зуба биће формирани као што је описано у раду (Zeng и сар., 2016). Укратко, дужине сегмената корена биће стандардизоване на 12 mm, а канали корена биће припремљени до величине 100 ручним ендодонтским инструментима за препарацију канала корена зуба. Спољашња површина коренских сегмената ће бити прекривена лаком, тако да само унутрашња површина канала корена зуба остаје непокривена, односно изложена дејству ириганаса. Коренски сегменти ће са доње стране бити затворени кондензационим силиконом (*Oranwash L, Zhermack, Badia Polesine, Italy*) чиме се симулира затворени апекс у *in vitro* условима. Парови коренских сегмената ће случајним избором бити распоређени у следеће групе и подгрупе и третирани растворима ириганаса према протоколу дефинисаном за сваку групу, односно подгрупу:

Група 1 (контрола модела):
- подгрупа 1- 1,5% NaOCl (20ml/5min) / 17% EDTA (20ml/5min)
- подгрупа 2- 1,5% NaOCl (20ml/5min) / 17% EDTA (20ml/5min)

Група 2:
- подгрупа 1- 1,5% NaOCl + 9% етидронат (20ml/5min)
- подгрупа 2- 1,5% NaOCl (20ml/5min) / 17% EDTA (20ml/5min)

Група 3:
- подгрупа 1- 1,5% NaOCl + 9% етидронат (20ml/5min)
- подгрупа 2- дестилата (20ml/5min)

Група 4:
- подгрупа 1- 1,5% NaOCl + 9% етидронат (20ml/5min)
- подгрупа 2- 1,5% NaOCl (20ml/5min)

Група 5:
подгрупа 1- 1,5% NaOCl + 9% клодронат (20ml/5min)
подгрупа 2- 1,5% NaOCl (20ml/5min) / 17% EDTA (20ml/5min)
Група 6:
подгрупа 1 – 1,5% NaOCl + 9% клодронат (20ml/5min)
подгрупа 2 – дестилата (20ml/5min)
Група 7:
подгрупа 1 – 1,5% NaOCl + 9% клодронат (20ml/5min)
подгрупа 2 – 1,5% NaOCl (20ml/5min)
Група 8:
подгрупа 1 – 1,5% NaOCl + 9% клодронат (20ml/5min)
подгрупа 2 – 1,5% NaOCl + 9% етидронат (20ml/5min)
Група 9:
подгрупа 1 – 1,5% NaOCl + 9% етидронат
подгрупа 2 – 1,5% NaOCl + 9% етидронат → Биодентин
Група 10:
подгрупа 1 – 1,5% NaOCl + 9% клодронат
подгрупа 2 – 1,5% NaOCl + 9% етидронат → Биодентин
Група 11:
подгрупа 1 – 1,5% NaOCl / 17% EDTA
подгрупа 2 – 1,5% NaOCl / 17% EDTA → Биодентин

Након иригације, коренски сегменти ће бити урођени у 1ml PBS-а и инкубирани на 37°C у току 14 дана. Раствор PBS-а ће бити чуван на -70 °C све до квантификације биоактивних молекула ЕЛИСА методом.

Унутрашња површина канала коренских сегмената у групама 9, 10 и 11 ће након иригације бити испуњена Биодентином. По завршетку иницијалног везивања од 12 минута, Биодентин ће са горње и доње стране бити прекривен кондензационим силиконом ради спречавања контакта материјала са CO2. Коренски сегменти ће бити постављени у инкубатор на 37°C са контролисаном влажности од 100% током 14 дана. Након 14 дана, коренски сегменти ће бити пресечени на два дела, Биодентин пажљиво уклоњен, а подељени сегменти урођени у по 1ml PBS-а и инкубирани на 37°C током 14 дана. Сви раствори ће потом бити замрзнути на -70°C све до квантификације биоактивних молекула ЕЛИСА методом.

Квантификација биоактивних молекула ЕЛИСА методом

Као и у делу истраживања везаном за одређивање концентрација биоактивних молекула ослобођених из дентина под дејством калцијум силикатних материјала, за квантификацију биоактивних молекула од интереса за овај део истраживања (TGF-β1, VEGF, PDGF, DSP) биће коришћени доступни комерцијални ЕЛИСА китови. Процедура квантификације ЕЛИСА методом биће спроведена у складу са протоколом произвођача за сваки молекул. Добијене вредности оптичких густина биће очитане на ЕЛИСА читачу *Rayto RT 2100C Microplate Reader (China*). Резултати ће бити изражени у pg/ml.

Испитивање цитотоксичности раствора за континуирану хелацију на матичним ћелијама апикалне папиле (SCAP) и њихов ефекат на одонтогени диференцијациони потенцијал матичних ћелија апикалне папиле (SCAP) у присуству Биодентина

У истраживање ће бити укључено 3 системски здрава пацијента Клинике за оралну хирургију Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, оба пола, старости 18 и више година код којих је индикована екстракција импактираних или непотпуно изниклих доњих трећих молара због потреба ортодонтског лечења. У студији ће бити коришћени екстраховани доњи трећи молари код којих се на ортопантомограму јасно уочава зуб са незавршеним растом корена. Пре укључивања у студију, поступак студије ће бити детаљно објашњен пацијентима, а узорци ће бити прикупљени искључиво од оних пацијената који су потписали информисани пристанак и дали сагласност за коришћење биолошког материјала.

Лабораторијски протокол *in vitro* студије на матичним ћелијама апикалне папиле

Након екстракције, зуби ће бити пребачени у пластичну посуду са транспортним медијумом (енгл. Dulbecco's Modified Eagle's Medium -DMEM, 20% Fetal Bovine Serum – FBS, Gibco, USA) и пренети до Имлантолошко истраживачко центра Стоматолошког факултета Унивезитета у Београду. Након дезинфекције 70% етанолом, посуда ће бити унета у биолошки безбедни кабинет. Зуби ће бити пребачени у петри шољу и три пута испрани раствором фосфатног пуфера (енгл. Dulbecco's Phospate Buffer Saline - DPBS, Gibco, USA). Апикална папила ће пажљиво бити одвојена од корена стерилним скалпелом, испрана DPBS раствором и пребачена у нову стерилну петри шољу. Ткиво апикалне папиле ће бити пажљиво уситњено на фрагменте, водећи рачуна да се ткиво не гњечи. У петри шољу ће бити додато 2 ml комплетног медијума (DMEM, 10 % FBS, 1 x Antibiotic antimycotic, Gibco, USA), а затим ће делићи ткива заједно са медијумом бити аспирирани и пребачени у фласк T-25 намењеним за култивацију ћелија. T-25 фласк ће бити пребачен у CO_2 инкубатор (Galaxy 170s, New Brunswick, Canada) на 37°C у атмосфери са 5% CO_2. На свака 2-3 дана, комплетни медијум ће бити замењен свежим, претходно загрејаним (37°C) комплетним медијумом. Након 5 до 7 дана, на инвертном микроскопу се очекује пролиферација ћелија из делића ткива. Ове ћелије ће бити означене као ћелије нулте пасаже (P0). Ћелије ће бити култивисане до постизања субконфлуентности, тј. до прекривања 70-80% површине фласка, а онда би се сукцесивним експанзијама (пасажама) умножавале.

Експресија мезенхималних и хематопоетских маркера SCAP ћелија четврте пасаже ће бити проверена проточном цитометријом. Биће коришћена мишја моноклонална антитела за мезенхималне маркере: CD90, CD73, CD105 и за хематопоезне маркере: CD 45 i CD 34. Ова антитела су обележена флуоресцин-изоцијанатом (FITC) и фикоеритрином (PE). За идентификацију мезенхималних матичних ћелија вршила би се имунофенотипизација преко доказивања позитивне експресије (≥ 95% позитивних ћелија) мезенхималних трансмембранских маркера (CD73, CD105, CD90 антиген), односно одсуства других хетерогених популација ћелија помоћу тестирања негативне експресије хематопоетских маркера (≤5% позитивних ћелија), као што су CD34 (молекул присутан на популацији примитивних хематопоетских ћелија) и CD45

(трансмембрански протеин тирозин фосфатаза). Након потврде матичности, ћелије ће бити коришћене за даље анализе.

Припрема елуата калцијум-силикатног цемента (Биодентина)

У експериментима ће бити коришћен калцијум-силикатни цемент Биодентин (*Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, France*). Овај материјал ће бити замешан по упутству произвођача у биолошки безбедном кабинету и унет у стерилне силиконске калупе пречника 5 mm и висине 2 mm. Након везивања од 48 сати, дискови ће бити урођени у DMEM са антибиотиком/антимикотиком и остављени у CO_2 инкубатору у периоду од 24 сата ради екстракције елуата материјала. Елуат ће бити формиран у складу са захтевима ISO стандарда 10993-12 из 2021. године (*International Organization for Standardization*, 2021). Након 24 сата, елуат ће бити центрифугиран на 1000xg ради уклањања крупнијих честица из елуата.

MTT тест ћелијске вијабилности

Цитотоксичност експерименталних раствора биће испитивана MTT тестом вијабилности. Ћелијска вијабилност биће одређивана након третмана експерименталним растворима, како имедијантно након њихове примене, тако и након 24, 48 и 72h. SCAP ћелије биће засејане у густини од 5000 ћелија по бунарићу и инкубиране у CO_2 инкубатору на 37°C у атмосфери са 5% CO_2 ради везивања за подлогу. Након 24-часовне инкубације, ћелије ће бити третиране са по 100µl експерименталних раствора, додатно разблажених у DMEM-u, (1:10, 1:100, 1:1000) у периоду од 15 минута. Као негативна контрола биће коришћен комплетни медијум. Апсорбанце ће бити очитане помоћу спектрофотометра (RT-2100C *Multiplate Reader, Rayto, China*) на таласној дужини од 570nm. Вијабилност ћелија ће бити израчуната по следећој формули: % вијабилних ћелија = (апсорбанца узорка – бланк апсорбанца) / (апсорбанца контроле – бланк апсорбанца) × 100 (Ballal и сар., 2019).

Испитивање ефекта раствора за континуирану хелацију на одонтогени потенцијал SCAP

Одонтогена диференцијација SCAP након третмана растворима за континуирану хелацију, биће испитана уз помоћ анализе генске експресије. Минерализациони потенцијал ћелија након третмана ће бити испитан *Alizarin Red S* бојењем и активношћу алкалне фосфатазе (ALP). Поред тога, медијум у којем ће ћелије бити култивисане ће бити сачуван, а из њега ће бити квантификовани протеини карактеристични за одонтогену диференцијацију уз помоћ ЕЛИСА (енгл. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) методе.

За доказивање потенцијала за диференцијацију биће коришћене ћелије пете пасаже. SCAP ћелије ће за потребе извођења анализе генске експресије бити засејане на плочама од 12 бунарића, у густини од 25×10^3 ћелија по бунарићу. За извођење експеримената активности ALP и ализарин ред бојења, SCAP ће бити засејане на плочама од 96 бунарића у густини од 10×10^3 ћелија по бунарићу. Ћелије ће бити инкубиране у CO_2 инкубатору на 37°C у атмосфери са 5% CO_2 ради везивања за подлогу. Након 24-часовне инкубације, ћелије ће бити третиране експерименталним растворима у периоду од 15

минута, у разблажењу у којем ћелије покажу вијабилност од преко 50% на MTT тесту, у складу са следећим групама:

I. без третмана – позитивна контрола
II. без третмана – негативна контрола
III. 9% етидронат + 1,5% NaOCl
IV. 9% клодронат + 1,5% NaOCl
V. 9% етидронат + 1,5% NaOCl у присуству Биодентина
VI. 9% клодронат + 1,5% NaOCl у присуству Биодентина
VII. 9% етидронат
VIII. 9% клодронат
IX. 9% етидронат у присуству Биодентина
X. 9% клодронат у присуству Биодентина
XI. Биодентин

Након третмана, ћелије ће бити испране PBS-ом, а затим инкубиране у присуству остеодиференцијационог медијума и елуата Биодентина (*StemMACS OsteoDiff Medium, Miltenyi Biotec, Germany*) у четири временска интервала (7, 10, 14 и 21 дан). Освежавање медијума ће се вршити на свака 3-4 дана.

Бојење бојом *Alizarin Red S* - *Alizarin Red S* је органско једињење које се везује за Ca^{2+}, стога се користи као хистолошка боја за бојење поља минерализације и калцијумских нодула у ткивима и доказивање позитивне остеодиференцијације. По истеку испитиваног временског периода, медијум за остеодиференцијацију ће бити аспириран и одбачен, ћелије ће бити фиксиране и обојене. Након бојења, бунарићи ће бити фотографисани на инвертној микроскопији, након чега ће везана боја бити растворена хлороводоничном киселином, а интензитет минерализације ће бити квантификован помоћу спектрофотометра (RT-2100C *Multiplate Reader, Rayto, China*) на таласној дужини од 450nm.

Активност алкалне фосфатазе - Алкална фосфатаза је ензим кога секретују остеобласти и одонтобласти и има кључну улогу у формирању чврстих зубних, као и коштаних ткива, јер повећава концентрацију фосфатних јона неопходних за минерализацију ткива. Тест активности алкалне фосфатазе заснива се на употреби синтетичког супстрата, најчешће рнитрофенил фосфата (pNPP). Након истека испитиваног временског периода, медијум за остеодиференцијацију ће бити аспириран и одбачен, а ћелије испране три пута DPBS-ом. Додавањем 55µl 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) реагенса биће извршена пермеабилизација ћелијске мембране, а плоча са ћелијама остављена преко ноћи на 4°C. Раствор pNPP ће бити направљен према упутству произвођача (*Genaxxon bioscience, Ulm, Germany*) након додавања. 100µl pNPP раствора по бунарићу и тридесетоминутне инкубације на собној температури, апсорбанце ће бити очитане на спектрофотометру (RT 2100C *Multiplate Reader, Rayto, China*) на таласној дужини од 405nm.

Испитивање генске експресије циљних гена од значаја за одонтогену диференцијацију SCAP - Након изолације РНК и реверзне транскрипције, добијена цДНК би се користила у испитивању генске експресије *Realtime PCR* анализом, где би се посматрали нивои експресије маркера од значаја за одонтогену диференцијацију SCAP (DSPP, DMP1, ALP, COL1A, OCN, RUNX2).

Квантификација протеина специфичних за одонтогену диференцијацију – Одонтогена диференцијација биће испитана квантификацијом протеина карактеристичних за одонтобласте. Квантификација протеина ће се вршити из медијума у којем ће ћелије бити култивисане током процеса диференцијације. Медијум ће бити мењан на 3 – 4 дана, при чему ће прикупљени стари медијум бити складиштен и замрзнут на −70 °C до даље анализе. За квантификацију протеина од интереса (DSPP, DMP-1) биће коришћени доступни комерцијални ЕЛИСА китови. Процедура квантификације ЕЛИСА методом биће спроведена у складу са протоколом произвођача за сваки молекул, а резултати ће бити изражени у pg/ml.

Статистичка обрада података

Статистичка анализа прикупљених података биће извршена у статистичком софтверском пакету GraphPad Prism (*version* 10.4; *GraphPad Software, Boston, MA, USA*). Као методе дескриптивне статистике користиће се мере централне тенденције и мере дисперзије. Избор теста за анализу нумеричких обележја посматрања зависиће од природе расподеле података. У циљу одређивања нормалности расподеле користиће се Колмогоров Смирнов (*Kolmogorov–Smirnov*) и Шапиро Вилк (*Shapiro-Wilk*) тестови. За потребе статистичке обраде резултата добијених испитивањем ослобађања биоактивних молекула из дентина, у случају нормалне расподеле користиће се т-тест за везане узорке (*Paired samples* t-test), док ће се код расподела различитих од нормалне користити Вилкоксонов тест (*Wilcoxon Signed-Rank* Test). За потребе статистичке обраде резултата добијених испитивањем цитотоксичности и одонтогене диференцијације матичних ћелија апикалне папиле, користиће се АНОВА са Бонферонијевом корекцијом за анализу разлика између група у случају нормалне расподеле, односно Краскал Волисов тест (*Kruskal- Wallis Test*) уз Ман Витнијев У тест (*Mann Whitney U Test*) за међугрупну анализу, код расподела различитих од нормалне.

На основу анализе предложеног Материјала и Метода истраживања, Комисија сматра да је предочена методологија релевантна за анализу дефинисаног научног проблема савременим приступом, те самим тим у потпуности одговара предмету истраживања.

2.6. ОЧЕКИВАНИ РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

С обзиром на то да су студије на предложену тему малобројне и у неким областима потпуности недостају, очекујемо да резултати нашег истраживања по први пут покажу *in vitro* биолошке ефекте новог раствора за континуирану хелацију, клодроната са

натријум хипохлоритом, на нивоу компоненти сигналних путева од значаја за процесе репарације и регенерације зубних ткива (ослобађање биоактивних молекула из дентина, и то TGF-β1, VEGF, PDGF, DSP, и одонтогена диференцијација матичних ћелија апикалне папиле). Имајући у виду да клодронат у раствору за континуирану хелацију показује боље физичко-хемијске карактеристике од постојећег регистрованог раствора са етидронатом на основу чега је препоручен као потенцијална алтернатива етидронату, очекујемо да клодронат показује компарабилне, ако не и боље, биолошке ефекте од раствора са етидронатом као што су већа способност ослобађања биоактивних молекула из дентина, мања цитотоксичност и већа стимулација одонтогене диференцијације матичних ћелија апикалне папиле. Такође, с обзиром да се ириганси примењују у комбинацији са биоактивним материјалима у току ендодонтског лечења, очекујемо да примена ириганаса у склопу континуиране хелације не умањује биолошке ефекте Биодентина.

2.7. НАУЧНИ ДОПРИНОС

До данас није пронађен идеалан ириганс погодан за већину ендодонтских терапијских захвата, било да су они рутински, или у оквиру регенеративних процедура, због чега се испитују нови потенцијални раствори за иригацију. Нови ириганс, клодронат са натријум хипохлоритом, са потенцијалном применом у оквиру континуиране хелације, испољава супериорније физичко-хемијске карактеристике у односу на једини ириганс који је тренутно у клиничкој употреби, етидронат са натријум хипохлоритом, али истраживања која испитују његов биолошки ефекат су спорадична или недостају. Такође, недостају истраживања ефеката овог ириганса на биолошке ефекте биоактивних стоматолошких материјала као што је Биодентин. Стога, научни допринос ове студије је испитивање биолошких ефеката потенцијалног новог ириганса у *in vitro* условима што ће значајно допринети одређивању индикација за његову примену. Додатни допринос ове студије је прво испитивање потенцијалне примене раствора за континуирану хелацију у регенеративној ендодонцији.

2.8. ЛИТЕРАТУРА ОД ЗНАЧАЈА ЗА ИСТРАЖИВАЊЕ

На основу наведених референци Комисија сматра да је избор литературе одговарајући. Наведени научни радови се у потпуности односе на предмет истраживања, а више од 70% литературе је новијег датума (радови објављени у последњих 10 година) што указује на актуелност теме и потребу за даљим истраживањима у тој области. Адекватан избор литературе омогућио је кандидату добру основу за постављање радних хипотеза које је кандидат навео и на основу којих је дефинисао циљеве истраживања. Сходно наведеном сматрамо да је приложена литература актуелна, свеобухватна и сврсисходна.

Литература:

Aksel H и Huang GT-J (2017) Combined Effects of Vascular Endothelial Growth Factor and Bone Morphogenetic Protein 2 on Odonto/Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells *In Vitro Journal of Endodontics* **43**, 930–935.

Akyüz İE, Eminsoy Avcı AT, Üstün Y, Kolçakoğlu KS и Kızılcı E (2025) Evaluation of the effect of different irrigation solutions used in regenerative endodontic treatment of necrotic molar teeth with open apex on postoperative pain- randomized clinical trial *Clinical Oral Investigations* **29**, 66.

Arias-Moliz MT, Morago A, Ordinola-Zapata R, Ferrer-Luque CM, Ruiz-Linares M и Baca P (2016) Effects of Dentin Debris on the Antimicrobial Properties of Sodium Hypochlorite and Etidronic Acid *Journal of Endodontics* **42**, 771–775.

Atesci AA, Avci CB, Tuglu MI, Ozates Ay NP и Eronat AC (2020) Effect of Different Dentin Conditioning Agents on Growth Factor Release, Mesenchymal Stem Cell Attachment and Morphology *Journal of Endodontics* **46**, 200–208.

Bai Y, Cheng X, Liu X, и cap. (2023) Transforming growth factor-β1 promotes early odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells via activating AKT, Erk1/2 and p38 MAPK pathways *Journal of Dental Sciences* **18**, 87–94.

Bai Y, Liu X, Li J, и cap. (2022) Stage-Dependent Regulation of Dental Pulp Stem Cell Odontogenic Differentiation by Transforming Growth Factor-β1 *Stem Cells International* **2022**, 1–13.

Baker SM, Sugars RV, Wendel M, и cap. (2009) TGF-beta/extracellular matrix interactions in dentin matrix: a role in regulating sequestration and protection of bioactivity *Calcif Tissue Int* **85**, 66–74.

Ballal NV, Das S, Rao BSS, Zehnder M и Mohn D (2019) Chemical, cytotoxic and genotoxic analysis of etidronate in sodium hypochlorite solution *International Endodontic Journal* **52**, 1228–1234.

Ballal NV, Ray AB, Narkedamalli R, и cap. (2024) Effect of continuous vs sequential chelation on the mechanical properties of root dentin: An ex vivo study *J Dent* **148**, 105214.

Boutsioukis C и Arias-Moliz MT (2022) Present status and future directions - irrigants and irrigation methods *International Endodontic Journal* **55 Suppl 3**, 588–612.

Butler WT и Ritchie H (1995) The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins *The International Journal of Developmental Biology* **39**, 169–179.

Campello AF, Rodrigues RCV, Alves FRF, и cap. (2022) Enhancing the Intracanal Antibacterial Effects of Sodium Hypochlorite with Etidronic Acid or Citric Acid *Journal of Endodontics* **48**, 1161–1168.

Chae Y, Yang M и Kim J (2018) Release of TGF-β1 into root canals with various final irrigants in regenerative endodontics: an in vitro analysis *International Endodontic Journal* **51**, 1389– 1397.

Chaussain C, Eapen AS, Huet E, и cap. (2009) MMP2-cleavage of DMP1 generates a bioactive peptide promoting differentiation of dental pulp stem/progenitor cell *European Cells & Materials* **18**, 84–95.

Cosmetic Ingredient Review Expert Panel (2017) Safety Assessment of Etidronic Acid and Salts of Etidronic Acid as Used in Cosmetics.

Dawes C (2003) What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *Journal*

(Canadian Dental Association) **69**, 722–724.

De Oliveira CLL, Ferreira FM, Puppin-Rontani J, Puppin-Rontani RM и Pascon FM (2025) Potential of irrigants and medicaments in regenerative endodontics: insights from a systematic review on dentin growth factor release *Odontology*.

Deari S, Mohn D и Zehnder M (2019) Dentine decalcification and smear layer removal by different ethylenediaminetetraacetic acid and 1-hydroxyethane-1,1-diphosphonic acid species *International Endodontic Journal* **52**, 237–243.

Dos Reis-Prado AH, Abreu LG, Fagundes RR, и cap. (2022) Influence of ethylenediaminetetraacetic acid on regenerative endodontics: A systematic review *International Endodontic Journal* **55**, 579–612.

Duncan HF, Smith AJ, Fleming GJP, Reid C, Smith G и Cooper PR (2017) Release of bio-active dentine extracellular matrix components by histone deacetylase inhibitors (HDACi) *International Endodontic Journal* **50**, 24–38.

Dung SZ, Gregory RL, Li Y и Stookey GK (1995) Effect of lactic acid and proteolytic enzymes on the release of organic matrix components from human root dentin. *Caries research* **29**, 483– 489.

Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I и Akiyama K (2012) Stem cells in dentistry – Part I: Stem cell sources *Journal of Prosthodontic Research* **56**, 151–165.

Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF и Fedarko NS (2001) Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin *Biochemical and Biophysical Research Communications* **280**, 460–465.

Fortea L, Sanz-Serrano D, Luz L-B, Bardini G и Mercade M (2024) Update on chelating agents in endodontic treatment: A systematic review *Journal of Clinical and Experimental Dentistry* **16**, e516–e538.

Galler KM, Buchalla W, Hiller KA, и cap. (2015) Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin *Journal of Endodontics* **41**, 363–8.

Ganesan K, Goyal A и Roane D (2025) Bisphosphonate In: *StatPearls*, pp. p. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing.

Giardino L, Del Fabbro M, Morra M, и cap. (2019) Dual Rinse(®) HEDP increases the surface tension of NaOCl but may increase its dentin disinfection efficacy *Odontology* **107**, 521–529.

Girard S, Paqué F, Badertscher M, Sener B и Zehnder M (2005) Assessment of a gel-type chelating preparation containing 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate *International Endodontic Journal* **38**, 810–816.

Hao J, Zou B, Narayanan K и George A (2004) Differential expression patterns of the dentin matrix proteins during mineralized tissue formation *Bone* **34**, 921–932.

Huang M, Dissanayaka WL и Yiu CK (2025) Exploring the potential of stem cells from the apical papilla (SCAPs) in regenerative medicine: advantages, applications, challenges and opportunities *Stem Cell Research & Therapy* **16**, 626.

Huang X, Camba J, Gu L, и cap. (2018) Mechanism of bioactive molecular extraction from mineralized dentin by calcium hydroxide and tricalcium silicate cement *Dental Materials* **34**, 317–330.

International Organization for Standardization (2021) ISO 10993-12 Part 12: Sample preparation and reference materials.

Ivica A, Zehnder M, Mateos JM, Ghayor C и Weber FE (2019) Biomimetic Conditioning of Human Dentin Using Citric Acid *Journal of Endodontics* **45**, 45–50.

Jiang W, Duan S, Li W, и cap. (2025) PDGF-BB overexpressing dental pulp stem cells improve angiogenesis in dental pulp regeneration *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **13**.

Kfir A, Goldenberg C, Metzger Z, Hülsmann M и Baxter S (2020) Cleanliness and erosion of root canal walls after irrigation with a new HEDP-based solution vs. traditional sodium hypochlorite followed by EDTA. A scanning electron microscope study *Clinical Oral Investigations* **24**, 3699–3706.

Khan JA, Hasan A, Dossa S и Ali B (2021) Effect of Natural and Artificial Dentin Conditioners on the Release of Vascular Endothelial Growth Factor *Journal of Endodontics* **47**, 800–805.

Kim D i Kim SG (2025) Cell Homing Strategies in Regenerative Endodontic Therapy *Cells* **14**, 201.

Kim SG, Malek M, Sigurdsson A, Lin LM и Kahler B (2018) Regenerative endodontics: a comprehensive review. *International Endodontic Journal* **51**, 1367–1388.

Küçükkaya Eren S (2023) Clinical applications of calcium silicate-based materials: a narrative review *Australian Dental Journal* **68**.

La Rosa GRM, Plotino G, Nagendrababu V и Pedullà E (2024) Effectiveness of continuous chelation irrigation protocol in endodontics: a scoping review of laboratory studies *Odontology* **112**, 1–18.

León-López M, Cabanillas-Balsera D, Martín-González J, Montero-Miralles P, Saúco-Márquez JJ и Segura-Egea JJ (2022) Prevalence of root canal treatment worldwide: A systematic review and meta-analysis *International Endodontic Journal* **55**, 1105–1127.

Li W, Chen L, Chen Z, и cap. (2017) Dentin sialoprotein facilitates dental mesenchymal cell differentiation and dentin formation *Scientific Reports* **7**, 300.

Liu J, Zou T, Zhang Y, и cap. (2022) Three-dimensional electroconductive carbon nanotube-based hydrogel scaffolds enhance neural differentiation of stem cells from apical papilla *Biomaterials Advances* **138**, 212868.

Liu MM, Li WT, Xia XM, Wang F, MacDougall M и Chen S (2021) Dentine sialophosphoprotein signal in dentineogenesis and dentine regeneration *European Cells & Materials* **42**, 43–62.

Martell AE и Smith RM (1989) *Critical Stability Constants: Second Supplement* Springer US.

Martin DE, De Almeida JF, Henry MA, и cap. (2014) Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation *Journal of Endodontics* **40**, 51–5.

Morago A, Ordinola-Zapata R, Ferrer-Luque C, Baca P, Ruiz-Linares M и Arias Moliz T (2016) Influence of Smear Layer on the Antimicrobial Activity of a Sodium Hypochlorite/Etidronic Acid Irrigating Solution in Infected Dentin *Journal of Endodontics* **42**.

Mumcu AK, Kurnaz S, Kiraz G и Gündüz MK (2024) Comparative effects of 17% ethylenediaminetetraacetic acid and 9% etidronic acid applied with different irrigant activation techniques on the release of growth factors from dentin: in vitro study *BMC Oral Health* **24**, 612.

Nanci A (2018) Dentin-Pulp Complex In: *Ten Cate's oral histology : development, structure, and function*, 9th edition; pp. p. Elsevier.

Narayanan K, Gajjeraman S, Ramachandran A, Hao J и George A (2006) Dentin matrix protein 1 regulates dentin sialophosphoprotein gene transcription during early odontoblast differentiation *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 19064–19071.

Narayanan K, Srinivas R, Ramachandran A, Hao J, Quinn B и George A (2001) Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 4516–4521.

Okada Y, Kawashima N, Noda S, и сар. (2025) VEGFA promotes odonto/osteoblastic differentiation in dental pulp stem cells via ERK/p38 signaling *Journal of Dental Sciences* **20**, 1590–1597.

Pan G, Zhou Q, Pan C и Zhang Y (2024) The Impact of the VEGF/VEGFR2/PI3K/AKT Signaling Axis on the Proliferation and Migration Abilities of Human Dental Pulp Stem Cells *Cell Biochemistry and Biophysics* **82**, 2787–2795.

Paqué F, Rechenberg D-K и Zehnder M (2012) Reduction of hard-tissue debris accumulation during rotary root canal instrumentation by etidronic acid in a sodium hypochlorite irrigant *Journal of Endodontics* **38**, 692–695.

Razumova S, Brago A, Kryuchkova A, Troitskiy V, Bragunova R и Barakat H (2025) Evaluation of the efficiency of smear layer removal during endodontic treatment using scanning electron microscopy: an in vitro study *BMC Oral Health* **25**, 151.

Roberts-Clark DJ и Smith AJ (2000) Angiogenic growth factors in human dentine matrix *Archives of Oral Biology* **45**, 1013–1016.

Russell RGG (2011) Bisphosphonates: the first 40 years *Bone* **49**, 2–19.

Russell RGG, Watts NB, Ebetino FH и Rogers MJ (2008) Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy *Osteoporosis International* **19**, 733–759.

Saberi EA, Farhad-Mollashahi N, Sargolzaei Aval F и Saberi M (2019) Proliferation, odontogenic/osteogenic differentiation, and cytokine production by human stem cells of the apical papilla induced by biomaterials: a comparative study *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry* **Volume 11**, 181–193.

Sadaghiani L, Gleeson HB, Youde S, Waddington RJ, Lynch CD и Sloan AJ (2016) Growth factor liberation and DPSC response following dentine conditioning *J Dent Res* **95**, 1298–1307.

Schmalz G, Hickel R, Price RB и Platt JA (2023) Bioactivity of Dental Restorative Materials: FDI Policy Statement *International dental journal* **73**, 21–27.

Schmalz G, Widbiller M и Galler KM (2017) Signaling Molecules and Pulp Regeneration *Journal of Endodontics* **43**, S7–S11.

Smith AJ, Duncan HF, Diogenes A, Simon S и Cooper PR (2016) Exploiting the Bioactive Properties of the Dentin-Pulp Complex in Regenerative Endodontics *Journal of Endodontics* **42**, 47–56.

Smith AJ, Matthews JB и Hall RC (1998) Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression *Eur J Oral Sci* **106 Suppl 1**.

Smith AJ, Scheven BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM и Cooper PR (2012) Dentine

as a bioactive extracellular matrix *Archives of Oral Biology* **57**, 109–121.
Sonoyama W, Liu Y, Fang D, и cap. (2006) Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine *PLoS ONE* **1**, e79.
Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, и cap. (2008) Characterization of the Apical Papilla and Its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth: A Pilot Study *Journal of Endodontics* **34**, 166–171.
Sridhar SV, Kumaravadivel K, Vishwanath S, Mathew S, Thangavel B и Thangaraj DN (2025) Effect of continuous chelation irrigation on transforming growth factor-β1 release: An in vitro assay *Journal of Conservative Dentistry and Endodontics* **28**, 481–485.
Sungur D, Aksel H, Ozturk S, Yılmaz Z и Ulubayram K (2019) Effect of dentine conditioning with phytic acid or etidronic acid on growth factor release, dental pulp stem cell migration and viability *International Endodontic Journal* **52**, 838–846.
Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, и cap. (2009) Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization *Matrix Biology* **28**, 221–229.
Tartari T, Guimarães BM, Amoras LS, Duarte MA, Silva e Souza PA и Bramante CM (2015) Etidronate causes minimal changes in the ability of sodium hypochlorite to dissolve organic matter *International Endodontic Journal* **48**, 399–404.
Tavares S, Pintor A, de Almeida Barros Mourão CF, и cap. (2021) Effect of different root canal irrigant solutions on the release of dentin-growth factors: A systematic review and meta-analysis *Materials* **14**.
Tomson PL, Lumley PJ, Smith AJ и Cooper PR (2017) Growth factor release from dentine matrix by pulp-capping agents promotes pulp tissue repair-associated events *International Endodontic Journal* **50**, 281–292.
Wan C, Yuan G, Luo D, и cap. (2016) The Dentin Sialoprotein (DSP) Domain Regulates Dental Mesenchymal Cell Differentiation through a Novel Surface Receptor *Scientific Reports* **6**, 29666.
Wang X, Xiao Y, Song W, и cap. (2023) Clinical application of calcium silicate-based bioceramics in endodontics *Journal of Translational Medicine* **21**, 853.
Wattanapakkavong K и Srisuwan T (2019) Release of Transforming Growth Factor Beta 1 from Human Tooth Dentin after Application of Either ProRoot MTA or Biodentine as a Coronal Barrier *Journal of Endodontics* **45**, 701–705.
Wongwatanasanti N, Jantarat J, Sritanaudomchai H и Hargreaves KM (2018) Effect of Bioceramic Materials on Proliferation and Odontoblast Differentiation of Human Stem Cells from the Apical Papilla *Journal of Endodontics* **44**, 1270–1275.
Wright PP, Cooper C, Kahler B и Walsh LJ (2020a) From an assessment of multiple chelators, clodronate has potential for use in continuous chelation *International Endodontic Journal* **53**, 122–134.
Wright PP, Cooper C, Kahler B и Walsh LJ (2021a) Multiple assessment methodologies in determining the antibiofilm actions of sodium hypochlorite mixed with clodronate or etidronate in endodontic irrigation *Journal of Microbiological Methods* **180**.
Wright PP, Scott S, Kahler B и Walsh LJ (2020b) Organic Tissue Dissolution in Clodronate and Etidronate Mixtures with Sodium Hypochlorite *Journal of Endodontics* **46**, 289–294.
Wright PP, Scott S, Shetty S, Kahler B и Walsh LJ (2021b) Resistance to compressive force in continuous chelation *Australian Endodontic Journal* **47**, 150–156.

Xu S, Wei J, Liu Y, и сар. (2024) PDGF-AA guides cell crosstalk between human dental pulp stem cells in vitro via the PDGFR-α/PI3K/Akt axis *International Endodontic Journal* **57**, 549– 565.

Yamakoshi Y, Hu JC-C, Fukae M, Zhang H и Simmer JP (2005) Dentin glycoprotein: the protein in the middle of the dentin sialophosphoprotein chimera *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 17472–17479.

Ye L, MacDougall M, Zhang S, и сар. (2004) Deletion of dentin matrix protein-1 leads to a partial failure of maturation of predentin into dentin, hypomineralization, and expanded cavities of pulp and root canal during postnatal tooth development *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 19141–19148.

Yi B, Ding T, Jiang S, и сар. (2021) Conversion of stem cells from apical papilla into endothelial cells by small molecules and growth factors *Stem Cell Research & Therapy* **12**, 266.

Zeng Q, Nguyen S, Zhang H, и сар. (2016) Release of Growth Factors into Root Canal by Irrigations in Regenerative Endodontics *Journal of Endodontics* **42**, 1760–1766.

Zhang M, Jiang F, Zhang X, и сар. (2017) The Effects of Platelet-Derived Growth Factor-BB on Human Dental Pulp Stem Cells Mediated Dentin-Pulp Complex Regeneration *Stem Cells Transl Med* **6**, 2126–2134.

Zhang R, Cooper PR, Smith G, Nör JE и Smith AJ (2011) Angiogenic activity of dentin matrix components *Journal of Endodontics* **37**, 26–30.

Zollinger A, Mohn D, Zeltner M и Zehnder M (2018) Short-term storage stability of NaOCl solutions when combined with Dual Rinse HEDP *International Endodontic Journal* **51**, 691–696.

Zou X, Zheng X, Liang Y, и сар. (2024) Expert consensus on irrigation and intracanal medication in root canal therapy *International Journal of Oral Science* **16**, 23.

3. ЗАКЉУЧАК

На основу анализе достављене документације, у оквиру које је описан научни проблем, дата методологија научног рада и релевантна литература, Комисија сматра да је предложена тема „**ЕФЕКАТ КОНТИНУИРАНЕ ХЕЛАЦИЈЕ И КАЛЦИЈУМ СИЛИКАТНИХ МАТЕРИЈАЛА НА ОСЛОБАЂАЊЕ БИОАКТИВНИХ МОЛЕКУЛА ИЗ ХУМАНОГ ДЕНТИНА И ОДОНТОГЕНУ ДИФЕРЕНЦИЈАЦИЈУ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА АПИКАЛНЕ ПАПИЛЕ**” интересантна, актуелна и подобна за израду докторске дисертације. Комисија сматра да ће сазнања добијена током израде предложене докторске дисертације допринети бољем разумевању биолошких ефеката раствора за континуирану хелацију, затим утицаја ових ириганаса на биолошке ефекте калцијум силикатних материјала, биоактивних стоматолошких материјала од значаја за ендодонтску терапију, и омогућити дефинисање и проширење индикација за примену испитиваних раствора за континуирану хелацију у области регенеративне ендодонције. Радне хипотезе и циљеви истраживања су усклађени са предложеном темом и јасно дефинисани. Материјал и методе су адекватно одабрани, у складу са иновативним

приступима у испитивању биолошких ефеката медицинских средстава у стоматологији и поткрепљени одговарајућом литературом.

На основу важећих прописа Закона о Универзитету и Статута Универзитета у Београду, Комисија сматра да кандидат **др Јован Бадњар** испуњава све неопходне услове за одобрење теме у оквиру израде докторске дисертације. На основу наведеног, Комисија предлаже Наставно научном већу Стоматолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати и одобри тему др Јована Бадњара под називом „**ЕФЕКАТ КОНТИНУИРАНЕ ХЕЛАЦИЈЕ И КАЛЦИЈУМ СИЛИКАТНИХ МАТЕРИЈАЛА НА ОСЛОБАЂАЊЕ БИОАКТИВНИХ МОЛЕКУЛА ИЗ ХУМАНОГ ДЕНТИНА И ОДОНТОГЕНУ ДИФЕРЕНЦИЈАЦИЈУ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА АПИКАЛНЕ ПАПИЛЕ**” за израду докторске дисертације.

За менторе докторске дисертације предлажу се **проф. др Љиљана Ђукић**, ОЈ Институтски предмети – Фармакологија у стоматологији, Стоматолошки факултет Универзитет у Београду, и **доц. др Бојан Џелетовић**, Клиника за болести зуба, Стоматолошки факултет Универзитет у Београду.

У Београду, _____

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

_____

Проф. др Јелена Рогановић
Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду

_____

проф. др Сања Милутиновић-Смиљанић
Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду

_____

доц. др Ивана Милановић
Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду

_____

доц. др Александар Јаковљевић
Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду

_____

проф. др Марко Стојановић
Медицински факултет, Универзитет у Београду

На основу члана 53. Статута Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, Наставно научно веће Стоматолошког факултета, на седници одржаној 22.09.2026. године, донело је следећу

О Д Л У К У

Усваја се позитиван извештај стручне комисије за оцену предлога теме докторске дисертације **др Јована Бадњара,** под називом: **„Ефекат континуиране хелације и калцијум силикатних материјала на ослобађање биоактивних молекула из хуманог дентина и одонтогену диференцијацију матичних ћелија апикалне папиле“.**

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 ментора кандидату, именују се проф. др Љиљана Ђукић и доц. др Бојан Целетовић.

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

Шеф
Административно-кадровског
одсека
Николија Мартић

_____

Декан
Стоматолошког
факултета
проф. др Војкан Лазић

_____

Образац 3.

Факултет Стоматолошки

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

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

З А Х Т Е В

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:

„Ефекат континуиране хелације и калцијум силикатних материјала на ослобађање биоактивних молекула из хуманог дентина и одонтогену диференцијацију матичних ћелија апикалне папиле“

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ Стоматолошке науке

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног од родитеља и презиме кандидата:
   Јован (Иван) Бадњар
2. Претходно образовање (назив и седиште факултета, студијски програм):
   Стоматолошки факултет Универзитета у Београду, Интегрисане основне и мастер студије
3. Година завршетка претходног нивоа студија: **2021.**
4. Година уписа на докторске студије: **2022.**
5. Назив студијског програма докторских студија: **Базична и клиничка истраживања у стоматологији**
6. Датум подношења пријаве теме докторске дисертације **16.06.2026..**

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ:

Име и презиме ментора: **Љиљана Ђукић**

Звање: **Ванредни професор, Стоматолошки факултет Универзитета у Београду**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Živković N, Vulović S, Lazarević M**, Đukić L**, Jakovljević A, Dinić I, Perić M, Lemić AM. Evaluation of biological properties of the light-cured, CAD/CAM milled, and 3D printed dental composites after artificial aging - an in vitro study. Dent Mater. 2026 May;42(5):767-779. doi: 10.1016/j.dental.2026.01.001.
2. Milić MS, Dželetović B, Radičević BA, Milosavljević N, Jovanović ND, Dožić I, Krunić J, **Đukić L.** Transforming growth factor-β1 and its soluble receptor type 2 in saliva of young adults: Sex-related differences and predictive modeling of salivary concentrations. Arch Oral Biol. 2025 Jul;175:106279. doi: 10.1016/j.archoralbio.2025.106279.
3. Jovanović M, Stevanović B, Pajović V, Tasić T, Lozić M, **Đukić L**, Kosić M, Murphy D, Japundžić-Žigon N. Vasopressin and cardiovascular autonomic adjustment in chronic hypertensive pregnancy. Hypertens Res. 2024 Jul 22. doi: 10.1038/s41440-024-01769-6.
4. **Đukić L**, Soulis G, Janssens B, Müller F, Petrovic M, Kossioni A. Appropriate use of antibiotics for oral/dental conditions in older adults: a narrative review. Acta Clin Belg. 2024 Jun;79(3):193-204. doi: 10.1080/17843286.2024.2359182.
5. **Đukić L,** Trajković L, Knežević T, Dimitrijević J, Krstić D, Stojanović M. The Effect of α-lipoic Acid on C-Reactive Protein Level: A Meta-analysis of Randomized, Double-Blind, and Placebo-Controlled Studies. Dose Response. 2022 Oct 13;20(4):15593258221126827. doi: 10.1177/15593258221126827.

Име и презиме ментора: **Бојан Џелетовић**

Звање: **Доцент, Стоматолошки факултет Универзитета у Београду**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Milić MS, **Dželetović B**, Radičević BA, Milosavljević N, Jovanović ND, Dožić I, Krunić J, Đukić L. Transforming growth factor-β1 and its soluble receptor type 2 in saliva of young adults: Sex-related differences and predictive modeling of salivary concentrations. Arch Oral Biol. 2025 Jul;175:106279. doi: 10.1016/j.archoralbio.2025.106279.
2. Milanovic I, Miletic V, **Dzeletovic B**, Antonijevic D, Savic Stankovic T, Pavlovic D, Despotovic A, Petrovic V. Physico-Chemical Properties and Push-Out Bond Strength to Root Dentine of Calcium Silicate-Based Sealers. J Funct Biomater. 2025 Apr 3;16(4):131. doi: 10.3390/jfb16040131.
3. Zebic ML, Muric B, Savic-Sevic S, **Dzeletovic B**, Stratimirovic D, Pantelic D. Real-time multispectral transmission of hard tooth tissues and dental composites with their heating. Dent Mater. 2023 Oct;39(10):903-912. doi: 10.1016/j.dental.2023.08.174.
4. Antic S, Markovic-Vasiljkovic B, **Dzeletovic B**, Jelovac DB, Kuzmanovic-Pficer J. Assesment of radiotherapy effects on the blood flow in gingiva and dental pulp - a laser Doppler flowmetry study. J Appl Oral Sci. 2022 Dec 2;30:e20220329. doi: 10.1590/1678-7757-2022-0329.
5. **Dzeletovic B**, Stratimirovic DJ, Stojic D, Djukic LJ. Linear and nonlinear analysis of dental pulp blood flow oscillations in ageing. Int Endod J. 2020 Aug;53(8):1033-1039. doi: 10.1111/iej.13306.

Обавештавамо вас да је НАСТАВНО НАУЧНО ВЕЋЕ
(назив надлежног тела факултета)

на седници одржаној 22.09.2026. 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

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

<u>Напомена:</u> Факултет доставља Универзитету захтев са прилозима у електронској форми и у једном писаном примерку за архиву Универзитета