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

ISO 9001 BUREAU VERITAS Certification

ЕТИЧКИ ОДБОР

БР. 36/49

14 -05- 2026

На молбу др Страхиње Недића, Етички одбор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, на редовној седници одржаној дана 13.05.2026. године, даје

С А Г Л А С Н О С Т

Др Страхињи Недићу за спровођење истраживања у оквиру докторске дисертације под називом:

„Испитивање биоактивних и антимикробних ефеката фотодинамске терапије и диодног ласера на *in vitro* и *ex vivo* моделу инфекције ендодонцијума“

и у друге сврхе се не може користити.

Београд,
13.05.2026.

ПРЕДСЕДНИК ЕТИЧКОГ ОДБОРА

/Проф. др Наташа Николић Јакоба/

A. PREDMET ISTRAŽIVANJA

Zapaljenska reakcija u periapeksnim tkivima može biti posledica dejstva različitih etioloških faktora. Međutim, savremena istraživanja pokazuju da je najčešći uzrok nastanka periapeksnih lezija polimikrobna infekcija poreklom iz endodoncijuma zuba zahvaćenim dobokim karijesnim lezijama. Dodatno, poznato je da na razvoj zapaljenja u periapeksnom tkivu utiču vrsta, količina i fakori virulencije mikroorganizama u sistemu kanala korena, kao i imunski odgovori domaćina **[1].** Takođe je pokazano da se endodontske infekcije karakterišu povećanim nivoom raznovrsnih medijatora zapaljenja koji doprinose širenju zapaljenskog procesa i razgradnji periapeksnog tkiva zahvaćenih zuba **[2].**

Iako je otkriveno više od 500 bakterijskih i gljivičnih vrsta u endodontskim infekcijama, grupa od 20 do 30 vrsta najčešće se izoluje i može se smatrati jezgrom mikrobioma. Postoji visoka interindividualna varijabilnost u endodontskom mikrobiomu u pogledu sastava, vrste i procentualne zastupljenosti. Pokazano je da anaerobni organizmi su zastupljeniji u primarnim endodontskim infekcijama, dok anaerobni i fakultativno anaerobni mikroorganizmi preovladavaju u stanju definisanom kao posttretmanski apeksni periodontitis. Tokom proteklih decenija, *Enterococcus faecalis* i *Candida albicans* su mikroorganizmi koji se dovode u vezu sa infekcijama koje su otporne na primenjivane terapijske modalitete **[3,4].**

Enterokoke su gram-pozitivni, fakultativno anaerobni organizmi koji se pod mikroskopom mogu uočiti kao pojedinačne koke, diplokoke ili koke povezane u kratke lance. Iako su članovi gastrointestinalne mikroflore, enterokoke su oportunistički patogeni mikroorganizmi, pri čemu nekoliko sojeva može izazvati infekcije koje se prenose u zajednici i u zdravstvenim ustanovama, posebno kod imunokompromitovanih pacijenata. Infekcije izazvane enterokokama pored nozokomijalnih infekcija uključuju infekcije endokardijuma, urinarnog i bilijarnog trakta, bakterijemiju kao i infekcije kanala korena zuba **[5].** Do 90% enterokoknih infekcija kod ljudi izaziva *Enterococcus faecalis*. Većinu preostalih izaziva *Enterococcus faecium*, a infekcije drugim vrstama su prilično retke **[6,7]**. Enterokoke, posebno *Enterococcus faecalis*, često su pronađene u kanalima korena koji pokazuju znake hroničnog apeksnog periodontitisa, izolovane u 23-70% slučajeva **[8].** Bakterija *Enterococcus faecalis* bila je među grupom bakterija iz kulture periapeksnih lezija koje su bile otporne na endodontsku terapiju i delovanje kalcijum hidroksida **[9,10].** Ova bakterija može opstati tokom dužeg vremenskog perioda i postati otporna na UV zračenje, toplotu, natrijum hipohlorit, vodonik-peroksid i etanol **[11,12].**

Najčešći faktori virulencije bakterije *Enterococcus faecalis* mogu se odnositi na kolonizaciju domaćina, otpornost protiv odbrambenih mehanizama domaćina i nastanak patoloških promena direktno putem produkcije toksina ili indirektno putem indukcije inflamacije **[12-16]**

Gljivice su često izolovane iz inficiranih kanala korena (3–18%), pri čemu preovlađuju vrste *Candida*. *Candida albicans* je gljivica koja se najčešće izoluje iz inficiranih kanala korena, a zatim slede *Candida tropicalis, Candida kefyr, Candida parapsilosis, Candida glabrata, Candida krusei, Candida dubliniensis, Candida guilliermondii* i *Candida etchellsii* **[17].** Pored ove velike raznovrsnosti formi, *Candida albicans* može rasti u kulturama pojedinačnih ćelija, biofilmovima i mikrokolonijama **[18].** *Candida albicans* je član fiziološke mikroflore, koja asimptomatski kolonizuje nekoliko različitih sistema organa, uključujući, ali ne ograničavajući se, na gastrointestinalni trakt, ženski reproduktivni trakt, usnu duplju i kožu. Kod većine pojedinaca sa zdravim imunološkim sistemom, *Candida albicans* je bezopasan član mikroflore koji je u harmoniji sa drugim članovima mikroflore. Međutim, poremećaji ove delikatne ravnoteže, kao što su varijacija u lokalnom okruženju (promene pH vrednosti ili nutritivne promene), upotrebe antibiotika, ili promena u imunološkom sistemu (izazvane infekcijom ili terapijom imunosupresivima), mogu omogućiti gljivici *Candida albicans* da se ubrzano razmnoži i uzrokuje infekciju **[19].** Ona se vezuje kako za abiotičke tako i za biotičke površine, poput zubnih proteza i dentina. Ona je dentinofilna i kolonizuje dentinske zidove kanala korena, prodirući u dentinske tubule i formirajući biofilm. Okrugle *Candida albicans* ćelije se pričvršćuju za dentinske površine u roku od 60–90 minuta, a zatim se razmnožavaju kako bi formirale bazalni sloj biofilma koji sazreva u roku od 24 sata **[20].** *Candida albicans* unutar biofilmova je 10–100 puta otpornija na imunske odgovore domaćina i antifungalno lečenje, jer su rast ćelija i metabolizam usporeni i zaštićeni ekstracelularnim polimernim supstancama i zaštitnim faktorima **[21].** Takođe, poseduje nekoliko faktora virulencije (adhezija, formiranje biofilma i dr.) koji doprinose patogenezi periapeksnih lezija. **[22-25].**

Evolucija lasera omogućila je njegovu upotrebu u različitim naučnim disciplinama, uključujući medicinu, fiziku, biologiju, biotehnologiju, biohemiju i stomatologiju. Zbog sposobnosti ablacije, penetracije i dezinfekcije, laseri zauzimaju važno mesto u terapijskim modalitetima restaurativne stomatologije i endodoncije, uključujući terapiju kanala korena zuba, terapiju vitalne pulpe (direktno prekrivanje pulpe i pulpotomija), tretman dentinske hiperosetljivosti i terapiju bola kod zuba sa oboljenjima pulpe i apeksnog parodoncijuma **[26].** Diodni laser je vrsta lasera niske snage. Kada se koristi u terapijske svrhe, obično se primenjuje na talasnoj dužini od 810–980 *nm*, gde može postići veću apsorpciju vode unutar dentalnih tvrdih tkiva od Nd:YAG lasera, što znači da može delovati na mikroorganizme unutar dentinskih tubula zbog veće penetracije **[26].** Zbog niskih troškova, prenosivosti, efikasnog baktericidnog dejstva putem svojih termalnih efekata i temperaturnog porasta koji se nalazi unutar bezbednog opsega za stalne zube, diodni laser se sve češće koristi u svim granama stomatologije za različite indikacije. Osim toga, diodno lasersko zračenje može prodreti u dentinske tubule do 1000 *μm* od površine, dok hemijski dezinficijensi imaju penetrirajuću dubinu samo do 100 *μm*, što ga čini znatno potentnijim za dezinfekciju istih **[27].**

Upotreba svetlosnih uređaja, poput LED ili LASER-a, predstavlja jedan od načina za redukciju broja mikroorganizama. Njihovi mehanizmi delovanja se zasnivaju uglavnom na fotofizičkim i/ili fotohemijskim reakcijama.

Pokazano je da do fotoaktivacije može doći različitim mehanizmima: direktnim, u kojima fotoni visoke energije, poput UV zračenja direktno oštećuju DNK mikroorganizama ili druge vitalne delove ćelije i indirektnim u kojima dolazi do fotoaktivacije endogenih ili egzogenih fotosenzibilizatora koji formiraju reaktivne vrste koje posledično izazivaju ćelijsku smrt.

Fotodinamska terapija koristi jedinjenje osetljivo na svetlost, fotosenzibilizator, koji se selektivno akumulira unutar ćelija. Fotohemijska reakcija se dešava kada fotosenzibilizator biva pobuđen

vidljivom svetlošću specifične talasne dužine i reaguje sa molekularnim kiseonikom. Ova fotodinamska reakcija dovodi do stvaranja slobodnih radikala i kiseonika što oštećuje ciljne ćelije.

U fotodinamskoj terapiji značajno mesto zauzima 5-aminolevulinska kiselina (5-ALA) koja predstavlja prekursor endogenog fotosenzibilizatora protoporfirina IX (PpIX) i odlikuje se izraženom hidrofilnošću što ograničava njenu sposobnost da penetrira kroz ćelijsku membranu.

Ovaj nedostatak predupređen je sintetisanjem ALADENT gela koji sadrži 5% 5-ALA.

Na taj način se poboljšava intracelularna akumulacija fotosenzibilizatora protoporfirina IX (PpIX) u ciljne ćelije zbog izraženije lipofilične prirode u odnosu na 5-ALA.

Fotodinamska terapija (ALADENT gel) u sinergističkom dejstvu sa crvenim svetlom talasne dužine od 630 *nm* (ALAD-PDT) je prvobitno stvoren u cilju kontrole infekcije parodoncijuma, ali je u brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama pokazao učinkovitost protiv oralnih mikroorganizama kao i antibakterijski efekat na mikroorganizme dentalnog biofilma **[28-29].**

Pluripotentne matične ćelije pulpe i periodontalnog/periapeksnog tkiva imaju važnu ulogu u procesima inflamacije, ali i regeneracije. Receptori u njihovoj membrani prepoznaju bakterijske molekule i izazivaju antigen nespecifičan odgovor. Aktivacijom receptora pokreću se ćelijski odgovori koji mogu dovesti do oslobađanja različitih medijatora zapaljenja koji utiču na tok inflamacije i uspostavljanja homeostaze tkiva **[30]**. Kokulture između ćelija i bakterija se uspešno koriste u drugim poljima medicine za proučavanje patogeneze i tretmana različitih oboljenja **[31].** Stoga, kokultura između matičnih ćelija i *Enterococcus faecalis*-a i *Candide albicans* može predstavljati veliki potencijal za istraživanje i razumevanje patoloških procesa u endodontskim infekcijama.

B. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je ispitati efekat fotodinamske terapije i diodnog lasera na *in vitro* i *ex vivo* modelu infekcije endodoncijuma.

U skladu sa ciljem istraživanja definisani su sledeći zadaci istraživanja:

1. Određivanje vijabilnosti mikroorganizama (*Enterococcus faecalis* i *Candida albicans)* i matičnih ćelija zubne pulpe u kokulturi.

2. Određivanje efekta primene diodnog lasera talasne dužine od 970 *nm* i ALADENT-a na bakteriju *Enterococcus faecalis* u kokulturi sa DPSC.

3. Određivanje efekta primene diodnog lasera talasne dužine od 970 *nm* i ALADENT-a na gljivicu *Candida albicans* u kokulturi sa DPSC.

4. Ispitivanje vijabilnosti DPSC i markera osteogene, hondrogene i adipogene diferencijacije nakon primene diodnog lasera talasne dužine od 970 *nm* i ALADENT-a.

5. Određivanje nivoa relativne ekspresije gena za proinflamatorne citokine, faktor nekroze tumora alfa (TNF-α), interleukin 1-beta (IL-1β) i interleukin 6 (IL-6), kao i za matriksnu metaloproteinazu 2 (MMP-2) i matriksnu metaloproteinazu 9 (MMP-9), nakon primene diodnog lasera talasne dužine od 970 nm i ALADENT-a.

6. Određivanje efekta primene diodnog lasera talasne dužine od 970 nm i ALADENT-a na bakteriju *Enterococcus faecalis* i gljivicu *Candida albicans* u *in vitro* uslovima

7. Određivanje efekta primene diodnog lasera talasne dužine od 970 nm i ALADENT-a na bakteriju *Enterococcus faecalis* i gljivicu *Candida albicans* na *ex vivo* modelu infekcije endodoncijuma na ekstrahovanim zubima.

C. MATERIJAL I METOD

1. Bakterijska i gljivična kultura

U studiji će biti korišćeni referentni sojevi *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 i *Candida albicans* ATCC 10231. Nakon aktivacije referentnih sojeva, nekoliko kolonija oba mikroorganizma će biti prebačeno u pojedinačni specifični medijum naveden u Tabeli 1. Dobijene suspenzije će biti centrifugirane (10 *min*, 3000 *rpm*), supernatant nastao nakon centrifugiranja će biti uklonjen, a talog resuspendovan u fosfatnom puferskom rastvoru (zamućenost od 0.5 McFarland standarda, $\approx 10^8$ ćelija/*ml* za *E.faecalis* odnosno $\approx 10^6$ ćelija/*ml* za *C. albicans*). Suspenzije će se razblaživati desetostruko odgovarajućim medijumima navedenim u Tabeli 1. do postizanja odgovarajućeg broja *Colony forming units* (CFUs) po mililitru. Dobijena suspenzija će zatim ponovo biti centrifugirana, supernatant uklonjen, a u istom volumenu otklonjenog supernatanta, talogu će biti dodat osnovni medijum za kultivaciju ćelija bez antibiotika i antimikotika.

Tabela 1. Uslovi rasta referentnih sojeva: *Enterococcus faecalis, Candida Albicans.*

Referentni soj	Medijum (bujon)	Čvrsta podloga	Temperatura	Vreme inkubacije	Uslovi
Enterococcus faecalis	Dekstrozni bujon	Kolumbija agar sa 5% ovčije krvi	37° *C*	24*h*	aerobni
Candida albicans	Dekstrozni bujon	Saburo agar	37° *C*	48*h*	aerobni

2. Izolacija i karakterizacija matičnih ćelija iz zubne pulpe

Izolacija, kultivacija i karakterizacija ćelija iz pulpe ekstahovanih zuba kao i ispitivanje citotoksičnosti i stepena diferencijacije bilo bi obavljeno u Laboratoriji za ćelijske kulture Implantološko-istraživačkog centra Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

U studiju bi bili uključeni tri pacijenta sa potvrđenom dijagnozom impaktiranog umnjaka kojima je indikovana hirurška ekstrakcija.

Hirurška ekstrakcija bi se obavila na Klinici za oralnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu. Učesnicima u studiji će biti objašnjeno da je njihovo učestvovanje na dobrovoljnoj bazi i da neće uticati na ishod i tok njihove terapije. Nakon dobijanja informacija o prirodi i ciljevima ove studije putem informatora za pacijenate (u prilogu), ispitanici će popunjavati formular koji se odnosi na Saglasnost za pristanak u studiji (u prilogu).

Uključujući kriterijumi za učešće pacijenata u studiji:

- punoletan pacijent

- impaktirani ili poluimpaktirani umnjak

- intaktan zub bez znakova karijesne lezije

Isključujući kriterijumi za učešće pacijenata u studiji:

- prisustvo karijesne lezije na impaktiranom/poluimpaktiranom umnjaku

- separiran umnjak (oštećen prilikom intervencije)

- postojanje autoimunih bolesti

- diabetes mellitus tip 1 ili 2

1. Ubrzo nakon hirurške intervencije, tkiva pulpe će se odvojiti od čvrstih zubnih tkiva i mehanički usitniti hiruškim skalpelom bez enzimske digestije. Usitnjeno tkivo će se inkubirati u osnovnom medijumu za kultivaciju u plastičnim bocama (površina 25 *cm2*) za kulturu tkiva, na temperaturi od 37°C u atmosferi sa 5% CO2 i 100% vlažnosti vazduha. U cilju postizanja uslova kultivisanja koji bi omogućili dobijanje dovoljnog broja ćelija, dobijene ćelije će se kultivisati do subkonfluentnog stepena (70% konfluentnosti), a onda će se sukcesivnim ekspanzijama (pasažama) umnožavati, pri čemu bi se za eksperimente koristile ćelije dobijene nakon treće pasaže.

2. U cilju karakterizacije mezenhimalnih matičnih ćelija vršiće se testiranje kako pozitivne, tako i negativne ekspresije površinskih markera metodom protočne citometrije, a za ova testiranja koristiće se ćelije dobijene nakon druge pasaže. Za identifikaciju mezenhimalnih matičnih ćelija vršiće se imunofenotipizacija preko dokazivanja pozitivne ekspresije (≥ 95% pozitivnih ćelija) mezenhimalnih transmembranskih markera, kao što su CD73, CD105, CD90 antigen. Takođe, u cilju dokazivanja odsustva drugih heterogenih populacija ćelija vršiće se i testiranje negativne ekspresije hematopoetskih markera (5% pozitivnih ćelija), kao što su CD34 (molekul prisutan na populaciji primitivnih hematopoetskih ćelija) i CD45 (transmembranski protein tirozin fosfataza).

3. Kokultura i kontrolna grupa

In vitro modeli kokultura mezenhimalnih matičnih ćelija i pojedinačnih mikroorganizama *(E. faecalis, C. albicans)* će biti postavljeni u mikrotitracionim pločama sa 12 bunarića. U svaki bunarčić će biti zasejano 100 000 ćelija. Ćelije će biti inkubirane na temperaturi od 37°*C* u atmosferi sa 5% CO2 i 100% vlažnosti vazduhu, u osnovnom medijumu za uzgajanje ćelija. Nakon 24 *h* ćelije će biti tretirane pojedinačnim već pripremljenim kulturama mikroorganizama. Pre tretmana ćelija sa kulturom mikroorganizama, ćelije će biti isprane fosfatnim puferskim rastvorom, kako bi se uklonile eventualni ostaci antibiotika i antimikotika, a zatim će ćelije biti izložene kulturi pojedinačnog mikroorganizma. Kontrolnu grupu će činiti samo kultura ćelija. Serijska razblaženja mikroorganizama će biti dodavana u bunare sa ćelijama kako bi se našao optimalan odnos broja mikroorganizama i ćelija. Nakon inkubacije kokultura u trajanju od 2h za *Candidu Albicans*, odnosno 24h za *Enterococcus Faecalis* na temperaturi od 37 stepeni u atmosferi od 5% CO2 i 100% vlažnosti vazduha, kokulture će biti tretirane diodnim laserom talasne dužine od 970 nm i ALADENT-om. Nakon 24h uradiće se izolacija RNK iz ćelija Trizolom i čuvati na -80 stepeni do daljih analiza. Eksperiment će biti rađen u triplikatu.

4. Ispitivanje vijabilnosti DPSC i markera osteogene, hondrogene i adipogene diferencijacije pre i nakon primene diodnog lasera talasne dužine od 970 *nm* i ALADENT-a.

Postojanje eventualne citotoksičnosti određivaće se procenom stepena vijabilnosti ćelija nakon dejstva ispitivanih lasera indirektnom metodom - MTT testom (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-dipeniltetrazolium bromid) i direktnom metodom - testom Neutralno crveno. Nakon tretiranja ćelija u

periodima od 24*h*, 72*h* i 7 dana posmatrala bi se mitohondrijska aktivnost i broj živih ćelija.

Uticaj ispitivanog lasera i ALADENT-a na osteogenu diferencijaciju DPSC će biti ispitivan adekvatnim bojenjem Alizarinom Red S koji boji akumulacije kalcijuma vanćelijskog matriksa. Nakon fotografisanja oglednih grupa boja će biti ekstrahovana, a intenzitet boje kvantifikovan na spektrofotometru. Nivoi ekspresije markera osteogene diferencijacije (*ALP, BMP2, RUNX2, OCN*) biće analizirani Real-time PCR metodom, nakom izolacije mRNK i reverzne transkripcije. Rezultat će se koristiti za statističku analizu.

Uticaj ispitivanog lasera i ALADENT-a na hondrogenu diferencijaciju DPSC će biti ispitivan adekvatnim bojenjem Alcian Blue. Nakon fotografisanja oglednih grupa boja će biti ekstrahovana, a intenzitet boje kvantifikovan na spektrofotometru. Nivoi ekspresije markera hodrogene diferencijacije (*ITM2A FOXC1, SOX9*) biće analizirani Real-time PCR metodom, nakom izolacije mRNK i reverzne transkripcije. Rezultat će se koristiti za statističku analizu.

Uticaj ispitivanog lasera i ALADENT-a na adipogenu diferencijaciju DPSC će biti ispitivan adekvatnim bojenjem Oil Red O bojom. Nakon fotografisanja oglednih grupa boja će biti ekstrahovana, a intenzitet boje kvantifikovan na spektrofotometru. Nivoi ekspresije markera adipogene diferencijacije (*LIPIN, FAP, PARPG*) biće analizirani Real-time PCR metodom, nakon izolacije mRNK i reverzne transkripcije. Rezultat će se koristiti za statističku analizu.

5. Određivanje nivoa proinflamatornih citokina iz ćelija u kokulturi

Nivo relativne ekspresija gena za proinflamatorne citokine TNF-α, IL-1β, IL-6, MMP-2, MMP-9 bice sprovedena upotrebom metode lančane ~~reakcije~~ reakcije polimeraze u realnom vremenu, ((RT-qPCR) nakon izolacije RNK pomoću rastvora TRIzol-a (*Invitrogen™ TRIzol™, Thermo Fischer Scientific, SAD*). Reverzna transkripcija ukupne RNK za sve gene biće sprovedena korišćenjem komercijalno dostupnog seta za reverznu transkripciju (*RevertAid RT Reverse Transcription Kit, Thermo Scientific, SAD*), u skladu sa uputstvom proizvođača. Kao referentni gen za normalizaciju ekspresije biće odabran gen za glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH), čija je konstitutivna ekspresija prethodno potvrđena kao stabilna u ispitivanim uzorcima. Svaki od datih uzoraka za ispitivani gen biće analiziran u triplikatu. Sve analize će biti sprovedene na Real-Time PCR sistemu Bio-Rad CFX96 (*Bio-Rad Laboratories, SAD*) uz korišćenje odgovarajućeg softvera Bio-Rad CFX Manager za prikupljanje i analizu podataka.

6. Proliferacija i vijabilnost suspenzije bakterija i gljivica

Kako bi se izvršila procena antimikrobnog dejstva ispitivanih terapija (diodni laser talasne dužine od 970 *nm* i ALADENT), pre i nakon tretiranja, vršiće se kvantifikacija vijabilnih mikroroganizama zasejevanjem na odgovarajuće čvrste hranljive podloge. Biće napravljena suspenzija mikroorganizama do optičke gustine koja odgovara 0.5 McFarland standardu, a zatim će se izvršiti serijska desetostruka razblaženja u dekstroznom bujonu do konačne koncentracije od 10^5 CFU/ml. Nakon tretiranja napravljenih suspenzija diodnim laserom i ALADENT-om zasejavaće se po 20 μl medijuma i po dvanaest desetostrukih razblaženja. Nakon inkubacije (48*h*, 37°*C*), vršiće se kvantifikacija mikroorganizama. Broj mikroorganizama će biti izražena kao broj *Colony forming units* po mililitru. Eksperiment će biti izvršen u triplikatu.

7. *Ex vivo* model infekcije endodoncijuma na ekstrahovanim zubima

Studija će biti izvedena na 120 sveže ekstrahovanih, intaktnih, jednokorenih zuba odraslih osoba sa završenim rastom korena, koji su ekstrahovani iz ortodontskih ili parodontoloških razloga na Klinici za oralnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Pre započinjanja eksperimenta zubi će biti očišćeni od ostataka parodoncijuma i naslaga ultrazvučnim aparatom. Kruna zuba će potom biti odsečena dijamantskom šajbnom tako da koren svakog zuba bude dugačak 13 mm.

Radna dužina će biti ustanovljena unošenjem endodontskog instrumenta K-file#10 sve do vizuelizacije vrha instrumenta na foramenu.

Preparacija kanala korena će biti izvedena do 0.5 mm od ustanovljene dužine crown-down tehnikom primenom mašinskih rotirajućih instrumenta Mtwo uz irigaciju 2,25% rastvorom NaOCl.

Radi eliminacije razmaznog sloja koji kompromituje naknadnu kontaminaciju dentinskih tubula, uzorci će biti potapani u rastvor 17% EDTA u ultrazvučnoj kadi u trajanju od 4 minuta. Nakon toga uzorci će biti ispirani sa 0.9% fiziološkim rastvorom, zatim tretirani u ultrazvučnoj kadi u rastvoru 2,25% NaOCl još 4 minuta i finalno ispirani sa 0.9% fiziološkim rastvorom. Na ovaj način razmazni sloj biće u potpunosti eliminisan.

Apikalni otvor zuba biće zatvoren glas jonomer cementom (GC Corp,. Tokyo Japan).

Zubu će biti pojedinačno upakovani u omotač za autoklaviranje, a zatim će se podvrgnuti sterilizaciji na temperaturi od 121 °C u trajanju od 15 minuta.

U studiji će biti korišćeni referentni sojevi *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 i *Candida albicans* ATCC 10231. Bakterija soja *Enterococcus Faecalis* u zamrznutom stanju biće zasejana na Kolumbija agar sa 5% ovčije krvi, a gljivica roda *Candida Albicans* na Sabouraud agar u trajanju od 24 h na 37 °C. Kolonije pojedinačno će nakon toga biti presejavane u 10 ml dekstroznog bujona i inkubirane na 37 °C u trajanju od 24h za *Enterococcus Faecalis* i 48h za *Candidu Albicans*.

Nakon toga biće napravljena suspenzija mikroorganizama do optičke gustine koja odgovara 0.5 McFarland standardu, a zatim će se izvršiti serijska desetostruka razblaženja u dekstroznom bujonu do konačne koncentracije od 10^5 CFU/ml.

Po 1 ml ove suspenzije će mikropipetorom biti ubacivano u svaki kanal pojedinačno. Uzorci sa inokulisanim mikroorganizmima će biti ubacivani u sterilne Ependorf tube. Svakih 48 h će biti izvađeno 500 µl desktroznog bujona, a potom će se dodati ista zapremina sterilnog dekstroznog bujona da bi se obezbedio eskponencijalni rast mikroorganizama, nakon čega će uzorci biti vraćeni u termostat na inkubaciju. Nakon 14 dana inkubacija će biti prekinuta, nakon čega će se primeniti odgovarajući antimikrobni protokoli korišćenjem diodnog lasera talasne dužine od 970 *nm* i ALADENT-a i rastvora NaOCl u koncentracijama od 0.5% i 2.25%.

Pre svakog antimikrobnog protokola, kanali će biti ispirani sa 2.5 ml 0.9% fiziološkog rastvora koji će dodatno biti aktiviran unošenjem instrumenta K-file 25#. Nakon toga, papirni poeni će biti unošeni u kanal, serijski dva papirna poena do radne dužine i zadržavani u kanalu 10 sekundi, nakon čega će biti prebačeni u sterilne Ependorf tube sa 1 ml 0.9% fiziološkog rastvora. Zubi će biti podvrgnuti odgovarajućim tretmanima (Laser/ALADENT), nakon čega će uzorci iz kanala biti uzeti na isti način papirnim poenima.

Kvantifikacija broja mikroorganizama biće obavljena metodom utvrđivanja broja formiranih kolonija na hranljivoj podlozi (CFU).

D. STATISTIČKA ANALIZA

Podaci će biti analizirani korišćenjem softvera GraphPad Prism 9.0.0. Podaci sa normalnom distribucijom će biti analizirani pomoću ANOVA (One-way ANOVA) testa, nakon čega će biti primenjen Tukijev (Tukey's multiple comparisons test) test za međugrupno poređenje; dok će podaci koji ne prate normalnu distribuciju biti analizirani pomoću Kruskal-Valisovog (Kruskal-Wallis) testa. Nivo značajnosti će biti definisan kao alfa = 0,05.

E. OČEKIVANI REZULTATI I NAUČNI DOPRINOS ISTRAŽIVANJA

Očekivani rezultati ovog istraživanja uključuju:

1. **Definisanje uticaja fotodinamske terapije i diodnog lasera:** Očekuje se da će se utvrditi efekti LED i diodnog lasera na vijabilnost ***Enterococcus faecalis*** i ***Candida albicans.*** Ovi podaci će pružiti uvide u potencijalne metode dezinfekcije u endodonciji.
2. **Analiza vijabilnosti matičnih ćelija:** Istraživanje će omogućiti procenu uticaja primene fotodinamske terapije i diodnog lasera na vijabilnost DPSCs, kao i na markere osteogene, hondrogene i adipogene diferencijacije, što može imati značaj za regenerativnu medicinu.
3. **Analiza vrednosti proinflamatornih citokina:** Očekuje se da će se utvrditi promene u nivou relativne ekspresije gena za ispitivane proinflamatorne citokine nakon primene fotodinamske terapije i diodnog lasera, što može pomoći u razumevanju mehanizama inflamatornog odgovora u kontekstu endodontskih infekcija.

Naučni doprinos ovog istraživanja leži u:

- **Razvoj novih terapijskih pristupa:** Rezultati istraživanja mogu doprineti razvoju inovativnih strategija za lečenje endodontskih infekcija, naročito u slučajevima perzistentnih infekcija otpornih na standardne terapijske metode.
- **Povećanje razumevanja mikrobioma:** Istraživanje će doprineti boljem razumevanju interakcija između matičnih ćelija i patogenih mikroorganizama, kao i njihovom uticaju na inflamaciju i regeneraciju tkiva.
- **Osnova za buduća istraživanja:** Ova studija može poslužiti kao osnova za dalja istraživanja u oblasti terapije laserom i potencijalne šire primene u stomatološkoj praksi, otvarajući mogućnosti za ispitivanje tretmana drugih patogenih mikroorganizama i različitih terapijskih protokola.

ISTRAŽIVAČKI TIM

1. Dr Strahinja Nedić, asistent, Klinika za bolesti zuba, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

2. Dr Vanja Opačić Galić, vanredni profesor, Klinika za bolesti zuba, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

3. Dr Dijana Mitić, viši naučni saradnik, Laboratorija za ćelijske kulture, Implantološko-istraživački centar, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

4. Dr Milena Radunović, docent, OJ Institutski predmeti, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

5. Dr Aleksandar Jakovljević, docent, OJ Institutski predmeti – Patološka fiziologija, Istraživačke laboratorije Implantološko-istraživačkog centra, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

6. Dr Sanja Petrović, asistent sa doktoratom, OJ Institutski predmeti, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

7. Dr Milica Jakšik Karišik, istraživač saradnik, Laboratorija za ćelijske kulture, Implantološko-istraživački centar, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

F. LITERATURA

1.Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. Int Endod J. 2006 Apr;39(4):249-81. doi: 10.1111/j.1365-2591.2006.01099.x. PMID: 16584489.

2. Jakovljevic A, Knezevic A, Karalic D, Soldatovic I, Popovic B, Milasin J, Andric M. Pro-inflammatory cytokine levels in human apical periodontitis: Correlation with clinical and histological findings. Aust Endod J. 2015 Aug;41(2):72-7. doi: 10.1111/aej.12072. Epub 2014 Aug 27. PMID: 25163634.

3.Siqueira JF Jr, Rôças IN. Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. Int Endod J. 2022 May;55 Suppl 3:512-530. doi: 10.1111/iej.13677. Epub 2022 Jan 13. PMID: 34958494.1.

4.Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, Dos Santos DG, Andreote FD, Gomes BPFA. Microbiological analysis of endodontically treated teeth with apical periodontitis before and after endodontic retreatment. Clin Oral Investig. 2021 Apr;25(4):2017-2027. doi: 10.1007/s00784- 020-03510-2. Epub 2020 Aug 28. PMID: 32860137)

5.Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence Factors ofEnterococcus faecalis: Relationship to Endodontic Disease. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 2004;15(5):308-320. doi:10.1177/154411130401500506.

6.Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. Clin Microbiol Rev. 1994 Oct;7(4):462-78. doi: 10.1128/CMR.7.4.462. PMID: 7834601; PMCID: PMC358337.

7.Hashem YA, Abdelrahman KA, Aziz RK. Phenotype-Genotype Correlations and Distribution of Key Virulence Factors in Enterococcus faecalis Isolated from Patients with Urinary Tract Infections. Infect Drug Resist. 2021 May 10; 14:1713-1723. doi: 10.2147/IDR.S305167. PMID: 34007190; PMCID: PMC8123086.

8.Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence Factors ofEnterococcus faecalis: Relationship to Endodontic Disease. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 2004;15(5):308-320. doi:10.1177/154411130401500506).

9.Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. J Endod. 2002 Apr;28(4):304-10. doi: 10.1097/00004770-200204000-00011. PMID: 12043869.

10. Sherman JM. THE STREPTOCOCCI. Bacteriol Rev. 1937 Dec;1(1):3-97. doi: 10.1128/br.1.1.3-97.1937. PMID: 16350049; PMCID: PMC440821.

11.Hartke A, Giard JC, Laplace JM, Auffray Y. Survival of Enterococcus faecalis in an oligotrophic microcosm: changes in morphology, development of general stress resistance, and analysis of protein synthesis. Appl Environ Microbiol. 1998 Nov;64(11):4238-45. doi: 1128/AEM.64.11.4238-4245.1998. PMID: 9797271; PMCID: PMC106633.

12.Giard JC, Hartke A, Flahaut S, Benachour A, Boutibonnes P, Auffray Y. Starvation-induced multiresistance in Enterococcus faecalis JH2-2. Curr Microbiol. 1996 May;32(5):264-71. doi: 10.1007/s002849900048. PMID: 8857273

13.Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence Factors ofEnterococcus faecalis: Relationship to Endodontic Disease. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 2004;15(5):308-320. doi:10.1177/154411130401500506

14. Hashem YA, Abdelrahman KA, Aziz RK. Phenotype-Genotype Correlations and Distribution of Key Virulence Factors in *Enterococcus faecalis* Isolated from Patients with Urinary Tract Infections. Infect Drug Resist. 2021 May 10;14:1713-1723. doi: 10.2147/IDR.S305167. PMID: 34007190; PMCID: PMC8123086.

15Arshadi M, Mahmoudi M, Motahar MS, Soltani S, Pourmand MR. Virulence Determinants and Antimicrobial Resistance Patterns of Vancomycin-resistant Enterococcus faecium Isolated from Different Sources in Southwest Iran. Iran J Public Health. 2018 Feb;47(2):264-272. PMID: 29445637; PMCID: PMC5810390.

16.Zheng JX, Wu Y, Lin ZW, Pu ZY, Yao WM, Chen Z, Li DY, Deng QW, Qu D, Yu ZJ. Characteristics of and Virulence Factors Associated with Biofilm Formation in Clinical Enterococcus faecalis Isolates in China. Front Microbiol. 2017 Nov 24; 8:2338. doi: 10.3389/fmicb.2017.02338. PMID: 29225595; PMCID: PMC5705541.

17.Mergoni G, Percudani D, Lodi G, Bertani P, Manfredi M. Prevalence of Candida Species in Endodontic Infections: Systematic Review and Meta-analysis. J Endod. 2018 Nov;44(11):1616-1625.e9. doi: 10.1016/j.joen.2018.07.016. Epub 2018 Sep 18. PMID: 30241680.

18.Macias-Paz IU, Pérez-Hernández S, Tavera-Tapia A, Luna-Arias JP, Guerra-Cárdenas JE, Reyna-Beltrán E. Candida albicans the main opportunistic pathogenic fungus in humans. Rev Argent Microbiol. 2023 Apr-Jun;55(2):189-198. doi: 10.1016/j.ram.2022.08.003. Epub 2022 Nov PMID: 36411138.

19.Gulati M, Nobile CJ. Candida albicans biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. Microbes Infect. 2016 May;18(5):310-21. doi: 10.1016/j.micinf.2016.01.002. Epub 2016 Jan 22. PMID: 26806384; PMCID: PMC4860025.

20.Douglas LJ. Candida biofilms and their role in infection. Trends Microbiol. 2003 Jan;11(1):30-6. doi: 10.1016/s0966-842x (02)00002-1. PMID: 12526852.

21.Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen Candida albicans: development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol. 2001 Sep;183(18):5385-94. doi: 10.1128/JB.183.18.5385-5394.2001. PMID: 11514524; PMCID: PMC95423.

22.Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of Candida albicans. Trends Microbiol. 2001 Jul;9(7):327-35. doi: 10.1016/s0966-842x(01)02094-7. PMID: 11435107.)

23.Staniszewska M, Bondaryk M, Piłat J, Siennicka K, Magda U, Kurzatkowski W. Czynniki zjadliwości Candida albicans [Virulence factors of Candida albicans]. Przegl Epidemiol. 2012;66(4):629-33. Polish. PMID: 23484392.

24.Macias-Paz IU, Pérez-Hernández S, Tavera-Tapia A, Luna-Arias JP, Guerra-Cárdenas JE, Reyna-Beltrán E. Candida albicans the main opportunistic pathogenic fungus in humans. Rev Argent Microbiol. 2023 Apr-Jun;55(2):189-198. doi: 10.1016/j.ram.2022.08.003. Epub 2022 Nov 18. PMID: 36411138.

25.Gomes CC, Guimarães LS, Pinto LCC, Camargo GADCG, Valente MIB, Sarquis MIM. Investigations of the prevalence and virulence of Candida albicans in periodontal and endodontic lesions in diabetic and normoglycemic patients. J Appl Oral Sci. 2017 May-Jun;25(3):274-281. doi: 10.1590/1678-7757-2016-0432. PMID: 28678946; PMCID: PMC5482250

26.Huang Q, Li Z, Lyu P, Zhou X, Fan Y. Current Applications and Future Directions of Lasers in Endodontics: A Narrative Review. Bioengineering (Basel). 2023 Feb 26;10(3):296. doi: 10.3390/bioengineering10030296. PMID: 36978686; PMCID: PMC10044917.

27.Noha MJ. Hanan JT. Efficacy of 940 nm Diode Laser against Cariogenic Bacteria (Tooth Decay-causing Bacteria). Baghdad Sci.J [Internet]. [cited 2024 Jun. 2021 (8)

28.Radunović M, Petrini M, Vlajic T, Iezzi G, Di Lodovico S, Piattelli A, D'Ercole S. Effects of a novel gel containing 5-aminolevulinic acid and red LED against bacteria involved in peri-implantitis and other oral infections. J Photochem Photobiol B. 2020 Apr;205:111826. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111826. Epub 2020 Feb 19. PMID: 32146270.

29.Pierfelice TV, Lazarevic M, Mitic D, Nikolic N, Radunovic M, Iezzi G, Piattelli A, Milasin J. Red Light and 5% Aminolaevulinic Acid (5%) Inhibit Proliferation and Migration of Dysplastic Oral Keratinocytes via ROS Production: An In Vitro Study. Gels. 2023 Jul 26;9(8):604. doi: 10.3390/gels9080604. PMID: 37623059; PMCID: PMC10453269.

30.Galler, K.M., Weber, M., Korkmaz, Y., Widbiller, M. & Feuerer, M. (2021) Inflammatory response mechanisms of the dentine– pulp complex and the periapical tissues. International Journal of Molecular Sciences, 22, 1480.

31.Akamp T, Rosendahl A, Galler KM, Wölflick M, Buchalla W, Widbiller M. An in vitro coculture approach to study the interplay between dental pulp cells and Streptococcus mutans. Int Endod J. 2024 Feb;57(2):164-177. doi: 10.1111/iej.13995. Epub 2023 Nov 10. PMID: 37947494

Evidencioni karton za pacijente

STOMATOLOŠKI FAKULTET UNIVERZITETA U BEOGRADU

Naziv studije: „Ispitivanje bioaktivnih i antimikrobnih efekata fotodinamske terapije i diodnog lasera na *in vitro* i *ex vivo* modelu infekcije endodoncijuma“

Evidencioni broj ispitanika

Broj istorije bolesti

Datum popunjavanja upitnika

EVIDENCIONI KARTON

Pol: ☐ muški ☐ ženski Godina rođenja: ☐☐☐☐

Lokalizacija zuba: _____

Datum sprovedene hirurške terapije ekstrakcije umnjaka: _____

Indikacija za ekstrakciju: _____

Opšta oboljenja: _____

STOMATOLOŠKI FAKULTET
UNIVERZITET U BEOGRADU

INFORMATOR ZA PACIJENTE

Naslov studije: „Ispitivanje bioaktivnih i antimikrobnih efekata fotodinamske terapije i diodnog lasera na *in vitro* i *ex vivo* modelu infekcije endodoncijuma".

Plan i svrha istraživanja

Pozvani ste da učestvujete u istraživanju uticaja fotodinamske terapije i diodnog lasera na ćelijama poreklom iz Vaše pulpe. Studija se bavi laboratorijskim istraživanjem efekta fotodinamske terapije i diodnog lasera na matične ćelije izolovane iz zubne pulpe kao i ispitivanjem efekta fotodinamske terapije i diodnog lasera na mikroorganizme koji će biti uneti u kanal korena zuba.

Cilj ovog istraživanja biće ispitivanje kako fotodinamska terapija i diodni laser deluju na ćelije Vaše pulpe i da li fotodinamska terapija i diodni laser deluje protiv bakterija i gljivica koje izazivaju infekcije endodoncijuma.

Istraživanje na Vašim ćelijama će biti sprovedeno na Stomatološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

Za učešće u studiji ne postoji novčana naknada.

Ne postoji sukob interesa od strane istraživača uključenih u studiju.

Nakon potpisivanja **Saglasnosti**, uzimanja istorije bolesti i standardne hiruške procedure, izvađeni zub će biti transportovan u odgovarajućem medijumu u laboratoriju Stomatološkog fakulteta radi daljeg istraživanja.

Rizici po pacijenta

Nakon ekstrakcije umnjaka postoji mogućnost nastanka komplikacija poput postoperativnog bola, infekcije, otoka, krvarenja, povrede nerava sa sledstvenom parestezijom.

Značaj istraživanja

Ukoliko se otkrije da fotodinamska terapija i diodni laser imaju delotvoran uticaj na *in vitro* i *ex vivo* modelu infekcije endodoncijuma, onda se kao takva može koristiti u drugim granama medicine i stomatologije.

Tajnost podataka

Dokumentacija o pacijentu je poverljiva. Uvid u medicinsku dokumentaciju, osim ordinirajućeg lekara, imaće samo jedan član istraživačkog tima (godište i pol pacijenta), a za objavljivanje će biti korišćeni isključivo anonimni studijski podaci.

Pacijent će blagovremeno biti obavešten ako nove informacije postanu dostupne.

Pacijent će na vreme biti obavešten ako dođe do bilo kakvih promena u istraživanju ili ako nove informacije u nauci i praksi postanu dostupne. Sve informacije će moći da dobije od članova istraživačkog tima.

Dobrovoljno učestvovanje i uslovi povlačenja iz studije

Učestvovanje u studiji je potpuno dobrovoljno. Povlačenje iz studije je moguće u svakom trenutku iz bilo kog razloga, i neće imati uticaja na način i ishod terapije pacijenta.

Ukoliko je potrebno da se konsultujete sa članom porodice/starateljem možete poneti kući ovo obaveštenje i vratiti ga prilikom sledeće posete Klinici.

Kontakt osoba

Ukoliko u bilo kom trenutku poželite više informacija o ovom istraživanju, molimo Vas da se obratite dr Strahinji Nediću sa Klinike za bolesti zuba, Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (dr Strahinja Nedić: 069/5837781).

Naslov studije:

„Ispitivanje bioaktivnih i antimikrobnih efekata fotodinamske terapije i diodnog lasera na *in vitro* i *ex vivo* modelu infekcije endodoncijuma".

SAGLASNOST

(Ime i prezime)

Nakon što sam pročitao/la ***Informator za pacijente*** gde je detaljno opisan postupak i izvođenje istraživanja, informisan/a sam o prirodi i ciljevima ove studije kao i o potencijalnim rizicima i koristima. Imao/la sam priliku da postavim pitanja u vezi sa studijom i dobio/la zadovoljavajuće odgovore.

Razumem da je moje učešće potpuno dobrovoljno i da sam slobodan/na da povučem svoj pristanak u bilo kom trenutku bez bilo kakvih obrazloženja, što neće uticati na način i ishod terapije.

Svaka informacija u vezi sa mnom biće poverljiva, a samo će anonimni studijski podaci biti korišćeni za objavljivanje.

Slažem se da informacije u vezi sa mnom mogu biti poslate u druge zemlje, unutar i izvan Evropske unije.

Dobrovoljno dajem pristanak za učešće i korišćenju ćelija koje se izoluju iz zuba u gore navedenom istraživanju.

Ime i prezime ispitanika _____

(štampanim slovima)

Potpis ispitanika_____ Potpis nadležnog lekara _____

Datum _____

SAGLASNOST

Saglasna sam da se deo studije pod nazivom "Ispitivanje bioaktivnih i antimikrobnih efekata fotodinamske terapije i diodnog lasera na *in vitro* i *ex vivo* modelu infekcije endodoncijuma (Evaluation of the bioactive and antimicrobial effects of photodynamic therapy and diode laser in *in vitro* and *ex vivo* model of endodontic infection)" obavi na Klinici za oralnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Na ovoj Klinici neophodno je da se uradi ekstrakcija tri umnjaka radi izolacije matičnih ćelija zubne pulpe.

U Beogradu, 27.04.2026.

Upravnik Klinike

Prof. Dr Snježana Čolić

На основу члана 53. Статута Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, Наставно научно веће Стоматолошког факултета, на електронској седници одржаној 26.05.2026. године, донело је следећу

О Д Л У К У

Именује се комисија за оцену предлога теме докторске дисертације **др Страхиње Недић,** под називом **„Испитивање биоактивних и антимикробних ефеката фотодинамске терапије и диодног ласера на in vitro и ex vivo моделу инфекције ендодонцијума“**, у саставу:

- проф. др Катарина Бељић Ивановић, ванредни професор, Стоматолошки факултет у Београду
- доц. др Александар Јаковљевић, доцент, Стоматолошки факултет у Београду
- проф. др Милица Поповић, редовни професор, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

О б р а з л о ж е њ е

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

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

Шеф
Административно-кадровског
одсека
Николија Мартић

Декан
Стоматолошког
факултета
проф. др Војкан Лазић

НАСТАВНО НАУЧНОМ ВЕЋУ СТОМАТОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На електронској седници Наставно научног већа Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, у школској 2025/26. години, одржаној 26.05.2026. године, на основу члана 53. Статута Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, именована је комисија за оцену предлога теме докторске дисертације **др Страхиње Недића**, под називом **„Испитивање биоактивних и антимикробних ефеката фотодинамске терапије и диодног ласера на *in vitro* и *ex vivo* моделу инфекције ендодонцијума“.** У саставу комисије су следећи чланови:

- проф. др Катарина Бељић - Ивановић, ванредни професор, Стоматолошки факултет у Београду, председник комисије
- доц. др Александар Јаковљевић, доцент, Стоматолошки факултет у Београду
- проф. др Милица Поповић, редовни професор, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

На основу прегледане документације о предложеној теми, Комисија подноси Наставно научном већу следећи извештај.

ИЗВЕШТАЈ

1. Биографски подаци о кандидату

Др Страхиња Недић рођен је 31.12.1995. године у Лозници.
Основну школу „Петар Тасић“и Медицинску школу „Др Андра Јовановић“ завршио је са одличним успехом.
На Стоматолошки факултет Универзитета у Београду уписао се школске 2014/15. године, а дипломирао у јулу 2020. године са просечном оценом 9.0 (90/100).
Обавезан приправнички стаж обављао је на клиникама Стоматолошког факултета Унивезитета у Београду у периоду од октобра 2020. године до априла 2021. године, а у априлу 2021. године положио је стручни испит пред комисијом Министарства здравља Репиблике Србије и стекао звање доктора стоматологије.
Докторске академске студије на Стоматолошком факултету Универзитета у Београду уписао је школске 2021/22. године и положио је све испите предвиђене планом и програмом студија са просечном оценом 10.
Специјалистичке студије из области Болести зуба и ендодонције уписује у јуну 2022. године. Ангажован је за извођење практичне наставе на интегрисаним студијама стоматологије, из наставних предмета на Клиници за болести зуба у школској 2023/24. години.
У октобру 2024. године заснива радни однос на Стоматолошком факултету Универзитета у Београду на Клиници за болести зуба као сарадник у високом образовању.
У јуну 2025. године полаже специјалистички испит из области Болести зуба и ендодонције са оценом одличан.
Др Страхиња Недић је децембру 2025. године изабран у звање асистента Стоматолошког факултета за ужу научну област Клиничке стоматолошке науке, наставни предмети Болести зуба-претклиника, Рестауративна одонтологија,

Претклиничка ендодонција и Ендодонција за период од три године (20.12.2025 - 19.12.2028.године)
У току свог научно-истраживачког рада публиковао је радове у међународним часописима категорије М23, М53 и има 12 сопштења са међународних скупова штампаних у иводу категорије М34.
Говори, чита и пише енглески језик. Поседује знање рада на рачунару MS Windows, MS Office и SPSS.

2. Образложење теме

2.1.Научна област- Базичне и клиничке стоматолошке науке

За тему докторске дисертације др Страхиња Недић је предложио тему под називом „Испитивање биоактивних и антимикробних ефеката фотодинамске терапије и диодног ласера на *in vitro* и *ex vivo* моделу инфекције ендодонцијума“ из области базичних и клиничких стоматолошких наука. Докторска дисертација би се изводила у оквиру Клинике за болести зуба и ендодонције, Клинике за оралну хирургију, Лабораторија за ћелијске културе и микробиологију, Имплантолошко-истраживачког центра, Стоматолошког факултета Универзитета у Београду.

2.2.Предмет рада (истраживања)

Запаљенска реакција у периапексним ткивима може бити последица дејства различитих етиолошких фактора. Међутим, савремена истраживања показују да је најчешћи узрок настанка периапексних лезија полимикробна инфекција пореклом из ендодонцијума зуба захваћеним добоким каријесним лезијама. Додатно, познато је да на развој запаљења у периапексном ткиву утичу врста, количина и факори вируленције микроорганизама у систему канала корена, као и имунски одговори домаћина. Такође је показано да се ендодонтске инфекције карактеришу повећаним нивоом разноврсних медијатора запаљења који доприносе ширењу запаљенског процеса и разградњи периапексног ткива захваћених зуба.

Иако је откривено више од 500 различитих бактеријских и гљивичних врста у ендодонтским инфекцијама, група од 20 до 30 врста најчешће се изолује и може се сматрати језгром микробиома. Постоји висока интериндивидуална варијабилност у ендодонтском микробиому у погледу састава, врсте и процентуалне заступљености. Показано је да су анаеробни организми заступљенији у примарним ендодонтским инфекцијама, док анаеробни и факултативно анаеробни микроорганизми преовладавају у стању дефинисаном као посттретмански апексни периодонтитис. Током протеклих деценија, *Enterococcus faecalis* и *Candida albicans* су микроорганизми који се доводе у везу са инфекцијама које су отпорне на примењиване терапијске модалитете.
Ентерококе су грам-позитивни, факултативно анаеробни организми који се под микроскопом могу уочити као појединачне коке, диплококе или коке повезане у кратке ланце. Иако су чланови гастроинтестиналне микрофлоре, ентерококе су опортунистички патогени микроорганизми, при чему неколико сојева може изазвати инфекције које се преносе у заједници и у здравственим установама, посебно код имунокомпромитованих пацијената. Инфекције изазване ентерококама поред нозокомијалних инфекција укључују инфекције ендокардијума, уринарног и билијарног тракта, бактеријемију као и инфекције канала корена зуба. До 90% ентерококних инфекција код људи изазива *Enterococcus faecalis*. Већину преосталих изазива *Enterococcus faecium*, а инфекције другим врстама су прилично ретке.

Ентерококе, посебно *Enterococcus faecalis*, често су пронађене и изоловане (23-70% случајева) у каналима корена који показују знаке хроничног апексног периодонтитиса. Бактерија *Enterococcus faecalis* била је међу групом бактерија из културе периапексних лезија које су биле отпорне на ендодонтску терапију и деловање калцијум хидроксида. Ова бактерија може опстати током дужег временског периода и постати отпорна на УВ зрачење, топлоту, натријум хипохлорит, водоник-пероксид и етанол.
Најчешћи фактори вируленције бактерије *Enterococcus faecalis* могу се односити на колонизацију домаћина, отпорност против одбрамбених механизама домаћина и настанак патолошких промена директно путем продукције токсина или индиректно путем индукције инфламације.

Гљивице су често изоловане из инфицираних канала корена (3–18%), при чему преовлађују врсте *Candida*. *Candida albicans* је гљивица која се најчешће изолује из инфицираних канала корена, а затим следе *Candida tropicalis,Candida kefyr, Candida parapsilosis, Candida glabrata, Candida krusei, Candida dubliniensis, Candida guilliermondii* i *Candida etchellsii.* Поред ове велике разноврсности форми, *Candida albicans* може расти у културама појединачних ћелија, биофилмовима и микроколонијама. *Candida albicans* је члан физиолошке микрофлоре, која асимптоматски колонизује неколико различитих система органа, укључујући, али не ограничавајући се, на гастроинтестинални тракт, женски репродуктивни тракт, усну дупљу и кожу. Код већине појединаца са здравим имунолошким системом, *Candida albicans* је безопасан члан микрофлоре који је у хармонији са другим члановима микрофлоре. Међутим, поремећаји ове деликатне равнотеже, као што су варијација у локалном окружењу (промене pH вредности или нутритивне промене), употребе антибиотика, или промена у имунолошком систему (изазване инфекцијом или терапијом имуносупресивима), могу омогућити гљивици *Candida albicans* да се убрзано размножи и узрокује инфекцију. Она се везује како за абиотичке тако и за биотичке површине, попут зубних протеза и дентина. Она је дентинофилна и колонизује дентинске зидове канала корена, продирући у дентинске тубуле и формирајући биофилм. Округле *Candida albicans* ћелије се причвршћују за дентинске површине у року од 60–90 минута, а затим се размножавају како би формирале базални слој биофилма који сазрева у року од 24 сата. *Candida albicans* унутар биофилмова је 10–100 пута отпорнија на имунске одговоре домаћина и антифунгално лечење, јер су раст ћелија и метаболизам успорени и заштићени екстрацелуларним полимерним супстанцама и заштитним факторима. Такође, поседује неколико фактора вируленције (адхезија, формирање биофилма и др.) који доприносе патогенези периапексних лезија.

Еволуција ласера омогућила је његову употребу у различитим научним дисциплинама, укључујући медицину, физику, биологију, биотехнологију, биохемију и стоматологију. Због способности аблације, пенетрације и дезинфекције, ласери заузимају важно место у терапијским модалитетима рестауративне стоматологије и ендодонције, укључујући терапију канала корена зуба, терапију виталне пулпе (директно прекривање пулпе и пулпотомија), третман дентинске хиперосетљивости и терапију бола код зуба са обољењима пулпе и апексног пародонцијума. Диодни ласер је врста ласера ниске снаге. Када се користи у терапијске сврхе, обично се примењује на таласној дужини од 810–980 *nm*, где може постићи већу апсорпцију воде унутар денталних тврдих ткива од Nd:YAG ласера, што значи да може деловати на микроорганизме унутар дентинских тубула због веће пенетрације. Због ниских трошкова, преносивости, ефикасног бактерицидног дејства путем својих термалних ефеката и температурног пораста који се налази унутар безбедног опсега за сталне зубе, диодни ласер се све чешће користи у свим гранама стоматологије за различите

индикације. Осим тога, диодно ласерско зрачење може продрети у дентинске тубуле до 1000 μm од површине, док хемијски дезинфицијенси имају пенетрирајућу дубину само до 100 μm, што га чини знатно потентнијим за дезинфекцију истих.
Употреба светлосних уређаја, попут LED или LASER-а, представља један од начина за редукцију броја микроорганизама. Њихови механизми деловања се заснивају углавном на фотофизичким и/или фотохемијским реакцијама.
Показано је да до фотоактивације може доћи различитим механизмима: директним, у којима фотони високе енергије, попут УВ зрачења директно оштећују DNK микроорганизама или друге виталне делове ћелије и индиректним у којима долази до фотоактивације ендогених или егзогених фотосензибилизатора који формирају реактивне врсте које последично изазивају ћелијску смрт.
Фотодинамска терапија користи једињење осетљиво на светлост, фотосензибилизатор, који се селективно акумулира унутар ћелија. Фотохемијска реакција се дешава када фотосензибилизатор бива побуђен видљивом светлошћу специфичне таласне дужине и реагује са молекуларним кисеоником. Ова фотодинамска реакција доводи до стварања слободних радикала и кисеоника што оштећује циљне ћелије.
У фотодинамској терапији значајно место заузима 5-аминолевулинска киселина (5-ALA) која представља прекурсор ендогеног фотосензибилизатора протопорфирина IX (PpIX) и одликује се израженом хидрофилношћу што ограничава њену способност да пенетрира кроз ћелијску мембрану.
Овај недостатак предупређен је синтетисањем ALADENT гела који садржи 5% 5-ALA.
На тај начин се побољшава интрацелуларна акумулација фотосензибилизатора протопорфирина IX (PpIX) у циљне ћелије због израженије липофиличне природе у односу на 5-ALA.

Фотодинамска терапија (ALADENT гел) у синергистичком дејству са црвеним светлом таласне дужине од 630 *nm* (ALAD-PDT) је првобитно створен у циљу контроле инфекције пародонцијума, али је у бројним ин витро и ин виво студијама показао учинковитост против оралних микроорганизама као и антибактеријски ефекат на микроорганизме денталног биофилма.

Плурипотентне матичне ћелије пулпе и периодонталног/периапексног ткива имају важну улогу у процесима инфламације, али и регенерације. Рецептори у њиховој мембрани препознају бактеријске молекуле и изазивају антиген неспецифичан одговор. Активацијом рецептора покрећу се ћелијски одговори који могу довести до ослобађања различитих медијатора запаљења који утичу на ток инфламације и успостављања хомеостазе ткива. Кокултуре између ћелија и бактерија се успешно користе у другим пољима медицине за проучавање патогенезе и третмана различитих обољења. Стога, кокултура између матичних ћелија и *Enterococcus faecalis-a* и *Candide albicans* може представљати велики потенцијал за истраживање и разумевање патолошких процеса у ендодонтским инфекцијама.

2.3.Радна хипотеза

Фотодинамска терапија и диодни ласер испољавају значајан антимикробни и биоактивни ефекат на *in vitro* и *ex vivo* моделу инфекције ендодонцијума.

2.4.Научни циљеви истраживања

Примарни циљ истраживања је испитати ефекат фотодинамске терапије и диодног ласера на *in vitro* и *ex vivo* моделу инфекције ендодонцијума.

У складу са примарним циљем истраживања дефинисани су следећи задаци истраживања:

1. Одређивање вијабилности микроорганизама (*Enterococcus faecalis* и *Candida albicans*) и матичних ћелија зубне пулпе у кокултури.
2. Одређивање ефекта примене диодног ласера таласне дужине од 970 *nm* и ALADENT-а на бактерију *Enterococcus faecalis* у кокултури са матичним ћелијама зубне пулпе.
3. Одређивање ефекта примене диодног ласера таласне дужине од 970 *nm* и ALADENT-а на гљивицу *Candida albicans* у кокултури са матичним ћелијама зубне пулпе.
4. Испитивање вијабилности матичних ћелија зубне пулпе и маркера остеогене, хондрогене и адипогене диференцијације након примене диодног ласера таласне дужине од 970 *nm* и ALADENT-а.
5. Одређивање нивоа релативне експресије гена за проинфламаторне цитокине, фактор некрозе тумора алфа (TNF-α), интерлеукин 1-бета (IL-1β) и интерлеукин 6 (IL-6), као и за матриксну металопротеиназу 2 (MMP-2) и матриксну металопротеиназу 9 (MMP-9), након примене диодног ласера таласне дужине од 970 *nm* и ALADENT-а.
6. Одређивање ефекта примене диодног ласера таласне дужине од 970 *nm* и ALADENT-а на бактерију *Enterococcus faecalis* и гљивицу *Candida albicans* у *in vitro* условима.
7. Одређивање ефекта примене диодног ласера таласне дужине од 970 *nm* и ALADENT-а на бактерију *Enterococcus faecalis* и гљивицу *Candida albicans* на *ex vivo* моделу инфекције ендодонцијума на екстрахованим зубима.

2.5. Методе истраживања

2.5.1 Бактеријска и гљивична култура

У студији ће бити коришћени референтни сојеви *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 i *Candida albicans* ATCC 10231. Након активације референтних сојева, неколико колонија оба микроорганизма ће бити пребачено у појединачни специфични медијум. Добијене суспензије ће бити центрифугиране (10 *min*, 3000 *rpm*), супернатант настао након центрифугирања ће бити уклоњен, а талог ресуспендован у фосфатном пуферском раствору (замућеност од 0.5 McFarland стандарда, $\approx 10^8$ ћелија/*ml* за *E. Faecalis* односно $\approx 10^6$ ћелија/*ml* за *C. Albicans*). Суспензије ће се разблаживати десетоструко одговарајућим медијумима наведеним до постизања одговарајућег броја *Colony forming units* (CFUs) по мililитру. Добијена суспензија ће затим поново бити центрифугирана, супернатант уклоњен, а у истом волумену отклоњеног супернатанта, талогу ће бити додат основни медијум за култивацију ћелија без антибиотика и антимикотика.

2.5.2 Изолација и карактеризација матичних ћелија из зубне пулпе

Изолација, култивација и карактеризација ћелија из пулпе екстахованих зуба као и испитивање цитотоксичности и степена диференцијације било би обављено у

Лабораторији за ћелијске културе Имплантолошко-истраживачког центра Стоматолошког факултета Универзитета у Београду.
У студију би били укључена три пацијента са потврђеном дијагнозом импактираног умњака којима је индикована хируршка екстракција.
Хируршка екстракција би се обавила на Клиници за оралну хирургију Стоматолошког факултета у Београду. Учесницима у студији ће бити објашњено да је њихово учествовање на добровољној бази и да неће утицати на исход и ток њихове терапије. Након добијања информација о природи и циљевима ове студије путем информатора за пацијенате , испитаници ће попуњавати формулар који се односи на Сагласност за пристанак у студији.

Укључујући критеријуми за учешће пацијената у студији:
- пунолетан пацијент
- импактирани или полуимпактирани умњак
- интактан зуб без знакова каријесне лезије

Искључујући критеријуми за учешће пацијената у студији:
- присуство каријесне лезије на импактираном/полуимпактираном умњаку
- сепариран умњак (оштећен приликом интервенције)
- постојање системских обољења

1. Убрзо након хируршке интервенције, ткива пулпе ће се одвојити од чврстих зубних ткива и механички уситнити стерилним хируршким скалпелом без ензимске дигестије. Уситњено ткиво ће се инкубирати у основном медијуму за култивацију у пластичним боцама (површина 25 cm^2) за културу ткива, на температури од 37˚C у атмосфери са 5% CO_2 и 100% влажности ваздуха. У циљу постизања услова култивисања који би омогућили добијање довољног броја ћелија, добијене ћелије ће се култивисати до субконфлуентног степена (70% конфлуентности), а онда ће се сукцесивним експанзијама (пасажама) умножавати, при чему би се за експерименте користиле ћелије добијене након треће пасаже.

2. У циљу карактеризације мезенхималних матичних ћелија вршиће се тестирање како позитивне, тако и негативне експресије површинских маркера методом проточне цитометрије, а за ова тестирања користиће се ћелије добијене након друге пасаже. За идентификацију мезенхималних матичних ћелија вршиће се имунофенотипизација преко доказивања позитивне експресије (≥ 95% позитивних ћелија) мезенхималних трансмембранских маркера, као што су CD73, CD105, CD90 антиген. Такође, у циљу доказивања одсуства других хетерогених популација ћелија вршиће се и тестирање негативне експресије хематопоетских маркера (5% позитивних ћелија), као што су CD34 (молекул присутан на популацији примитивних хематопоетских ћелија) и CD45 (трансмембрански протеин тирозин фосфатаза).

2.5.3 Кокултура и експериментална група

In vitro модели кокултура мезенхималних матичних ћелија и појединачних микроорганизама (*E. Faecalis, C. Albicans*) ће бити постављени у микротитрационим плочама са 12 бунарића. У сваки бунарчић ће бити
засејано 100 000 ћелија. Ћелије ће бити инкубиране на температури од 37˚C у атмосфери са 5% CO_2 и 100% влажности ваздуху, у основном медијуму за узгајање ћелија. Након 24 h ћелије ће бити третиране појединачним већ припремљеним

културама микроорганизама. Пре третмана ћелија са културом микроорганизама, ћелије ће бити испране фосфатним пуферским раствором, како би се уклониле евентуални остаци антибиотика и антимикотика, а затим ће ћелије бити изложене култури појединачног микроорганизма.
Контролну групу ће чинити само култура ћелија. Серијска разблажења микроорганизама ће бити додавана у бунаре са ћелијама како би се нашао оптималан однос броја микроорганизама и ћелија. Након инкубације кокултура у трајању од 2 h за *Candida Albicans*, односно 24 h за *Enterococcus Faecalis* на температури од 37 ˚C у атмосфери од 5% CO_2 и 100% влажности ваздуха, кокултуре ће бити третиране диодним ласером таласне дужине од 970 *nm* и ALADENT-ом. Након 24 h урадиће се изолација РНК из ћелија Тризолом и чувати на -80 ˚C до даљих анализа. Експеримент ће бити рађен у трипликату.

2.5.4 Испитивање вијабилности матичних ћелија зубне пулпе (DPSC) и маркера остеогене, хондрогене и адипогене диференцијације пре и након примене диодног ласера таласне дужине од 970 *nm* и ALADENT-а

Постојање евентуалне цитотоксичности одређиваће се проценом степена вијабилности ћелија након дејства испитиваних ласера индиректном методом - MTT тестом (3-(4,5-Диметилтиазол-2-ул)-2,5- дипенилтетразолиум бромид) и директном методом - тестом Неутрално црвено. Након третирања ћелија у
периодима од 24 h, 72 h и 7 дана посматрала би се митохондријска активност и број живих ћелија.
Утицај испитиваног ласера и ALADENT-а на остеогену диференцијацију DPSC ће бити испитиван адекватним бојењем Ализарином Red S који боји акумулације калцијума ванћелијског матрикса. Након фотографисања огледних група боја ће бити екстрахована, а интензитет боје квантификован на спектрофотометру. Нивои експресије маркера остеогене диференцијације (ALP, BMP2, RUNX2, OCN) биће анализирани Real-time PCR методом, наком изолације mRNK и реверзне транскрипције. Добијени резултат ће се користити за статистичку анализу.
Утицај испитиваног ласера и ALADENT-а на хондрогену диференцијацију DPSC ће бити испитиван адекватним бојењем Alcian Blue. Након фотографисања огледних група боја ће бити екстрахована, а интензитет боје квантификован на спектрофотометру. Нивои експресије маркера ходрогене диференцијације (ITM2A FOXC1, SOX9) биће анализирани Real-time PCR методом, наком изолације mRNK и реверзне транскрипције. И у овом случају добијени резултат ће се користити за статистичку анализу.
Утицај испитиваног ласера и ALADENT-а на адипогену диференцијацију DPSC ће бити испитиван адекватним бојењем Oil Red O бојом. Након фотографисања огледних група боја ће бити екстрахована, а интензитет боје квантификован на спектрофотометру.
Нивои експресије маркера адипогене диференцијације (LIPIN, FAP, PARPG) биће анализирани Real-time PCR методом, након изолације mRNK и реверзне транскрипције,а добијени резултати ће се користити за статистичку анализу.

2.5.5 Одређивање нивоа проинфламаторних цитокина из ћелија у кокултури

Ниво релативне експресија гена за проинфламаторне цитокине TNF-α, IL-1β, IL-6, MMP-2, MMP-9 биће спроведена употребом методе ланчане реакције реакције полимеразе у реалном времену, ((PT-qPCR) након изолације RNK помоћу раствора TRIzol-a (Invitrogen TM TRIzol TM, Thermo Fischer Scientific, САД). Реверзна транскрипција укупне РНК за све гене биће спроведена коришћењем комерцијално

доступног сета за реверзну транскрипцију (RevertAid RT Reverse Transcription Kit, Thermo Scientific, САД), у складу са упутством произвођача. Као референтни ген за нормализацију експресије биће одабран ген за глицериналдехид-3-фосфат дехидрогеназу (GAPDH), чија је конститутивна експресија претходно потврђена као стабилна у испитиваним узорцима. Сваки од датих узорака за испитивани ген биће анализиран у трипликату.
Све анализе ће бити спроведене на Real-time PCR систему Bio-Rad CFH96 (Bio-Rad Laboratories, САД) уз коришћење одговарајућег софтвера Bio-Rad CFH Manager за прикупљање и анализу података.

2.5.6 Пролиферација и вијабилност суспензије бактерија и гљивица

Како би се извршила процена антимикробног дејства испитиваних терапија (диодни ласер таласне дужине од 970 *nm* и ALADENT), пре и након третирања, вршиће се квантификација вијабилних микророганизама засејевањем на одговарајуће чврсте хранљиве подлоге. Биће направљена суспензија микроорганизама до оптичке густине која одговара 0.5 McFarland стандарду, а затим ће се извршити серијска десетострука разблажења у декстрозном бујону до коначне концентрације од 10^5 CFU/ml. Након третирања направљених суспензија диодним ласером и ALADENT-ом засејаваће се по 20 μl медијума и по дванаест десетоструких разблажења. Након инкубације (48 h, 37˚C), вршиће се квантификација микроорганизама. Број микроорганизама ће бити изражена као број Colony forming units по мililитру. Експеримент ће бити извршен у трипликату.

2.5.7 Ex vivo модел инфекције ендодонцијума на екстрахованим зубума

Студија ће бити изведена на 120 свеже екстрахованих, интактних, једнокорених зуба одраслих особа са завршеним растом корена, који су екстраховани из ортодонтских или пародонтолошких разлога на Клиници за оралну хирургију Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. Пре започињања експеримента зуби ће бити очишћени од остатака пародонцијума и наслага ултразвучним апаратом. Круна зуба ће потом бити одсечена дијамантском шајбном тако да корен сваког зуба буде дугачак 13 *mm*.
Радна дужина ће бити установљена уношењем ендодонтског инструмента K-file#10 све до визуелизације врха инструмента на форамену.
Препарација канала корена ће бити изведена до 0.5 *mm* од установљене дужине crown-down техником применом машинских ротирајућих инструмента Mtwo уз иригацију 2,25 % раствором NaOCl.
Ради елиминације размазног слоја који компромитује накнадну контаминацију дентинских тубула, узорци ће бити потапани у раствор 17% EDTA у ултразвучној кади у трајању од 4 минута. Након тога узорци ће бити испирани са 0.9% физиолошким раствором, затим третирани у ултразвучној кади у раствору 2,25% NaOCl још 4 минута и финално испирани са 0.9% физиолошким раствором. На овај начин размазни слој биће у потпуности елиминисан.
Апикални отвор зуба биће затворен глас јономер цементом (GC Corp, Tokyo Japan). Зубу ће бити појединачно упаковани у омотач за аутоклавирање, а затим ће се подвргнути стерилизацији на температури од 121° C у трајању од 15 минута.
У студији ће бити коришћени референтни сојеви *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212 и *Candida Albicans* ATCC 10231. Бактерија соја *Enterococcus Faecalis* у замрзнутом стању биће засејана на Колумбија агар са 5% овчије крви, а гљивица рода *Candida Albicans* на Sabouraud агар у трајању од 24 h на 37° C. Колоније појединачно ће након тога бити

пресејаване у 10 ml декстрозног бујона и инкубиране на 37 °C у трајању од 24 h за *Enterococcus Faecalis* и 48 h за *Candida Albicans*.
Након тога биће направљена суспензија микроорганизама до оптичке густине која одговара 0.5 McFarland стандарду, а затим ће се извршити серијска десетострука разблажења у декстрозном бујону до коначне концентрације од 10^5 CFU/ml.
По 1 *ml* ове суспензије ће микропипетором бити убацивано у сваки канал појединачно. Узорци са инокулисаним микроорганизмима ће бити убацивани у стерилне Епендорф тубе. Сваких 48 h ће бити извађено 500 *μl* дестрозног бујона, а потом ће се додати иста запремина стерилног декстрозног бујона да би се обезбедио експоненцијални раст микроорганизама, након чега ће узорци бити враћени у термостат на инкубацију. Након 14 дана инкубација ће бити прекинута, након чега ће се применити одговарајући антимикробни протоколи коришћењем диодног ласера таласне дужине од 970 *nm* и ALADENT-а и раствора NaOCl у концентрацијама од 0.5% и 2.25%.
Пре сваког антимикробног протокола, канали ће бити испирани са 2.5 ml 0.9% физиолошког раствора који ће додатно бити активиран уношењем инструмента K-file 25#. Након тога, папирни поени ће бити уношени у канал, серијски два папирна поена до радне дужине и задржавани у каналу 10 секунди, након чега ће бити пребачени у стерилне Епендорф тубе са 1 *ml* 0.9% физиолошког раствора. Зуби ће бити подвргнути одговарајућим третманима (Laser /ALADENT), након чега ће узорци из канала бити узети на исти начин папирним поенима. Квантификација броја микроорганизама биће обављена методом утврђивања броја формираних колонија на хранљивој подлози (CFU).

2.6.Очекивани резултати истраживања

Према процени кандидата очекује се да ће добијени резултати:
- дефинисати утицај и утврдити ефекте LED и диодног ласера на вијабилност *Enterococcus faecalis* и *Candida albicans*
- омогућити процену утицаја примене фотодинамске терапије и диодног ласера на вијабилност матичних ћелија зубне пулпе, као и на маркере остеогене, хондрогене и адипогене диференцијације
- утврдити ниво релативне експресије гена за испитиване проинфламаторне цитокине након примене фотодинамске терапије и диодног ласера

2.7.Научни допринос

Научни допринос овог истраживања, према очекиваним резултатима, може довести до развоја иновативних стратегија за лечење перзистентних ендодонтских инфекција отпорних на стандардне терапијске методе, бољем разумевању интеракција између матичних ћелија и патогених микроорганизама, као и њиховом утицају на инфламацију и регенерацију ткива. Ова студија може послужити као основа за даља истраживања у области терапије ласером и потенцијалне шире примене у стоматолошкој пракси, отварајући могућности за испитивање третмана других патогених микроорганизама и различитих терапијских протокола

3. Закључак

На основу увида у достављену документацију Комисија доноси следећи закључак: предложена тема **„Испитивање биоактивних и антимикробних ефеката**

фотодинамске терапије и диодног ласера на *in vitro* и *ex vivo* моделу инфекције ендодонцијума“ је актуелна, интересантна и подобна за израду докторске дисертације. Комисија сматра да тема пружа могућност развоја нових и напреднијих терапијских метода у ендодонцији, што ће значајно побољшати регенерацију ткива и смањити могућност компликација које се могу јавити због перзистентних инфекција.
Мишљење Комисије о теми докторске дисертације др Страхиње Недића јесте да испуњава све услове неопходне за приступање изради докторске дисертације.
На основу свега изнетог, Комисија у саставу: проф. др Катарина Бељић - Ивановић, ванредни професор, Стоматолошки факултет у Београду, доц. др Александар Јаковљевић, доцент, Стоматолошки факултет у Београду и проф. др Милица Поповић, редовни професор, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу предлаже Наставно научном већу Стоматолошког факултета у Београду да прихвати тему **„Испитивање биоактивних и антимикробних ефеката фотодинамске терапије и диодног ласера на *in vitro* и *ex vivo* моделу инфекције ендодонцијума“** др Страхиње Недића за израду докторске дисертације.

За менторе се предлажу проф. др Вања Опачић - Галић и ВНС др Дијана Митић.

У Београду, 22.06.2026. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

Проф. др Катрина Бељић - Ивановић
Стоматолошки факултет у Београду

_____

Доц. др Александар Јаковљевић
Стоматолошки факултет у Београду

_____

Проф. др Милица Поповић
Факултет медицинских наукаУниверзитета
у Крагујевцу

_____

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 Страхиње Недића,** под називом: **„Испитивање биоактивних и антимикробних ефеката фотодинамске терапије и диодног ласера на in vitro и ex vivo моделу инфекције ендодонцијума“.**

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 Вања Опачић Галић и др. сци Дијана Митић, виши научни сарадник, Стоматолошки факултет у Београду.

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:

„Испитивање биоактивних и антимикробних ефеката фотодинамске терапије и диодног ласера на in vitro и ex vivo моделу инфекције ендодонцијума“

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ Стоматолошке науке

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног од родитеља и презиме кандидата:
   Страхиња (Жељко) Недић
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: **2020.**
4. Година уписа на докторске студије: **2021.**
5. Назив студијског програма докторских студија: **Базична и клиничка истраживања у стоматологији**
6. Датум подношења пријаве теме докторске дисертације **20.05.2026..**

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ:

Име и презиме ментора: **Вања Опачић Галић**

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

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Ninkovic N, **Opacic Galic V**, Milosevic M, Trajkovic I, Kuzmanovic Pficer J, Bajuk-Bogdanović D, Milovanovic P, Yashin El-Bacha D, Djuric M, Miletic V. Effects of minimally invasive endodontic access cavity in molar teeth on polymerization, porosity and fracture resistance. Sci Rep. 2024 Sep 16;14(1):21635.
2. V. Petrović,**V.Opačić-Galić**, S. Živković, B. Nikolić, V. Danilović, V. Miletić, V. Jokanović, D. Mitić-Ćulafić. Biocompatibility of new nanostructural materials based on active silicate systems and hydroxyapatite: in vitro and in vivo study. International Endodontic Journal 2015; 48:966-975
3. **V.Opačić-Galić**, V. Petrović, S.Živković, V. Jokanović, B.Nikolić, J. Knežević-Vukčević, D. Mitić-Ćulafić. New nanostruktural biomaterials based on active silicate systems and hydroxyapatite: caracterization and genotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. International Endodontic Journal, 2013; 46:506-516
4. Milica Jovanović-Medojević, **Vanja Opačić-Galić**, Katarina Geler, Dušan Pavlica. Comparison of the efficiency of cleaning and disinfection protocols for hand endodontic instruments. Vojnosanitetski pregled (2023);80(7):596-603
5. Milica Jovanović-Medojević, Miljan Stošić, **Vanja Opačić-Galić**, Violeta Petrović. Endodontic glide path – importance and performance techniques. Srp Arh Celok Lek.2023 May-Jun;151 (5-6):380-384

Име и презиме ментора: **Дијана Митић**

Звање: **Виши научни сарадник, Стоматолошки факултет Универзитета у Београду**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Medojevic M, **Mitic D**, Jacimovic J, Devillard R, Jakovljevic A, Kérourédan O. Extracellular Vesicles-Enhanced 3D (Bio)Printing for Bone Regeneration: A Systematic Review. Tissue Eng Part B Rev. 2026; 19:19373341251363638. doi: 10.1177/19373341251363638.
2. Miličić Lazić M, **Mitić D**, Dojčinović B, Lazić M, Popović AS, Grgur BN. Determination of the Corrosion and Biocompatibility Properties of As-Cast TiNi Alloys. Metals. 2025; 15(7):758. doi: 10.3390/met15070758
3. Paraš S, Petrović B, **Mitić D**, Lazarević M, Popović Bajić M, Živković M, Mićić M, Biočanin V, Živković S, Jokanović V. Three-Dimensional-Printed Bone Grafts for Simultaneous Bone and Cartilage Regeneration: A Promising Approach to Osteochondral Tissue Engineering. Pharmaceutics. 2025; 17(4):489. doi: 10.3390/pharmaceutics17040489
4. **Mitic D**, Milosevic Markovic MS, Jovanovic ID, Mancic DD, Orhan K, Jokanovic VR, Markovic DL. A Biomimetic Approach to Diode Laser Use in Endodontic Treatment of Immature Teeth: Thermal, Structural, and Biological Analysis. Biomimetics. 2025; 10(4):216. doi: 10.3390/biomimetics10040216
5. Zmejkoski DZ, Zdravković NM, **Mitić DD**, Marković ZM, Budimir Filimonović MD, Milivojević DD, Todorović Marković BM. Graphene Quantum Dots in Bacterial Cellulose Hydrogels for Visible Light-Activated Antibiofilm and Angiogenesis in Infection Management. International Journal of Molecular Sciences. 2025; 26(3):1053. doi: 10.3390/ijms26031053

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