

## NASTAVNO – NAUČNOM VEĆU STOMATOLOŠKOG FAKULTETA, UNIVERZITETA U BEOGRADU

Nastavno - naučno veće Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu je na drugoj redovnoj sednici u školskoj 2020/2021. godini, održanoj 23.02.2021. imenovalo komisiju u sastavu:

1. Dr Tamara Perić, vanredni profesor Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
2. Dr Milena Radunović, docent Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
3. Dr Tatjana Marković, naučni savetnik Instituta za lekovito bilje „Dr Josif Pančić“ Beograd
4. Dr Biljana Nikolić, vanredni profesor Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
5. Dr Jelena Filipović Tričković, naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu

za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom: „**Dejstvo etarskih ulja na bakterije inficiranog korenskog kanala mladih stalnih zuba**“

**Kandidat:** dr Jelena Marinković

**Mentori:** Dr Dejan Marković, redovni profesor Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

Dr Ana Ćirić, naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu.

Na osnovu pregleda priloženog materijala, komisija podnosi Nastavno - naučnom veću sledeći

### IZVEŠTAJ

Kandidat dr Jelena Marinković je rođena 26.06.1989. u Paraćinu. Stomatološki fakultet, Univerziteta u Beogradu, upisala je 2008. godine, a diplomirala 2014. godine kao najbolji student u generaciji sa prosečnom ocenom 9,78. Nakon završenih studija obavila je pripravnički staž i položila stručni ispit. Doktorske studije na Stomatološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu upisala je 2015. godine. Položila je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija. U toku doktorskih studija bila je stipendista Ministarstva prosvete nauke i tehnološkog razvoja, nakon čega je od septembra 2018. zaposlena u Institutu za nuklearne nauke „Vinča“ - Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu.

Kandidat dr Jelena Marinković publikovala je jedan rad u časopisu sa SCI liste i 2 u časopisima od nacionalnog značaja. Član je Srpskog lekarskog društva.

## A. Prikaz sadržaja doktorske disertacija

Doktorska disertacija dr Jelene Marinković napisana je na 106 strana, i sadrži delove: sažetak na srpskom i engleskom jeziku, uvod, ciljeve israživanja, materijale i metode, rezultate i diskusiju, zaključke i literaturu. Dokumentovana je sa 18 tabela, 15 figura i 14 slika.

U UVODU kandidatkinja detaljno opisuje puteve prodora mikroorganizama u prostor zubne pulpe, kao i nastanak infekcije u ovom prostoru i njeno širenje u okolna tkiva. Definiše apikalni periodontitis i daje uvid u njegovu simptomatsku, tj. asimptomatsku formu. Potom prikazuje, literaturno poznate, klasifikacije apikalnih periodontitisa. Kako je broj izolovanih bakterijskih sojeva iz zuba sa apikalnim periodontitisima izrazito visok i razlikuje se među istraživačima, autorka tabelarnim prikazom izdvaja vrste koje su prepoznate od strane većine autora ovakvih studija. Potom detaljno objašnjava nastanak i razvoj biofilma, kao specifične trodimenzionalne strukturne zajednice odgovorne za infekciju u pulpnom prostoru i posledično i apikalni periodontitis. U nastavku autorka definiše mlade stalne zube i objašnjava specifičnosti njihovog lečenja. Ovde objašnjava da usled široko otvorenog apeksa korena zuba, kao i prisustva tankih i gracilnih korenova nije moguće sprovesti standardnu endodontsku proceduru za obeskličenje korenskih kanala. Takođe navodi činjenicu da postoje bakterijski sojevi koji mogu da sačuvaju virulenciju, i nakon izlaganja standardnim terapeutima u endodonciji, što može ukazati na kliničke situacije u kojima se ne može kontrolisati endodontska infekcija i njeno širenje. Iz ovog razloga autorka prikazuje tabelarno pregled bakterijskih izolata, koji su u literaturi prikazani kao oni koji mogu da zadrže virulenciju u kanalima nakon standardno primenjene terapije. Poseban osvrt pravi na sojeve koji su dokumentovani kao rezistentni na neku od komponenata iz triantibiotske paste (TAP). Kako problem rastuće antibiotske rezistencije nije zaobišao ni stomatologiju, a literatura dokumentuje nedostatke konvencionalne terapije, autorka temelji svoju tezu na ideji da ima smisla tragati za novim antimikrobnim sredstvom, ali koje nije zasnovano na antibioticima. Od njega očekuje dodatno obeskličenje kanala i efikasnost u situacijama kada ona manjka konvencionalnim sredstvima primenjivim u endodontskoj terapiji. Takođe, navodi kao potrebno da ovakvo sredstvo ne doprinosi formiranju rezistentnih sojeva, da bi u svakom pogledu bilo superiornije od konvencionalnih antimikrobnih sredstava. Novo antimikrobno sredstvo autorka traži u prirodnim proizvodima poput etarskih ulja, za koje postoji veliki broj literaturnih navoda o potvrđenom antimikrobnom potencijalu. U poglavlju u kome se bavi etarskim uljima detaljno predstavlja svako ulje ponaosob, sa osvrtom na dokumentovani antibakterijski potencijal. Zatim, objašnjava značaj poznavanja hemijskog sastava ulja, dovodeći ga u vezu sa antimikrobnim potencijalom istih. U poslednjem potpoglavlju, sugerise ulogu etarskih ulja u savremenoj stomatologiji, ističući njihov potencijal u vodicama za ispiranje usta. Takođe pravi i poseban osvrt na limitirani broj publikacija koje za temu imaju potencijalnu ulogu etarskih ulja u endodontskoj terapiji.

U poglavlju CILJEVI istraživanja jasno su definisani sledeći ciljevi:

- *Izolacija i identifikacija mikroorganizama poreklom iz inficiranog korenskog kanala i njihova kvantifikacija, radi određivanja predominantnih vrsta.*
- *Definisanje hemijskog sastava etarskih ulja uključenih u istraživanja.*

- *Ispitivanje antibakterijskog potencijala kroz određivanje minimalnih inhibitornih (MIK) i baktericidnih koncentracija (MBK) etarskih ulja, na predominantnim bakterijskim izolatima i odgovarajućim referentnim ATCC sojevima.*
- *Procena antibiofilmnog potencijala odabranih etarskih ulja.*
- *Uporedna analiza razlika u osetljivosti između kliničkih bakterijskih izolata i referentnih sojeva (ATCC) na delovanje etarskih ulja.*
- *Uporedno ispitivanje citotoksičnosti etarskih ulja, natrijum-hipohlorita i triantibiotske paste u MIK i MBK koncentracijama, specifičnim testovima citotoksičnosti*
- *Definisanje potencijala odabranih etarskih ulja ili njihovih aktivnih komponenti za dalja predklinička i klinička ispitivanja, usmerena na unapređenje efikasnosti endodontske terapije inficiranog korenskog kanala mladih stalnih zuba.*

U poglavlju **MATERIJALI I METODE** detaljno su opisani materijal i metode korišćeni za realizaciju postavljenih ciljeva. U potpoglavlju **MATERIJAL** navedena su (1) etarska ulja korišćena u studiji (2) referentni sojevi ATCC kolekcije (3) tečne i čvrste podloge za gajenje bakterija kao i (4) mešavina antibiotika koja je korišćena za pravljenje triantibiotske paste. Odeljak **METODE** počinje odeljkom „*Odabir inficiranih korenskih kanala*“ kojim se detaljno prikazuje na koji način su odabrani pacijenti iz čijih korenskih kanala (35) je izvršeno uzorkovanje. U narednim odeljcima je detaljno objašnjen postupak uzorkovanja iz kanala, kao i identifikacija mikrobiološkog sadržaja kanala. Potom su opisane metode za kvalitativnu i kvantitativnu identifikaciju sadržaja etarskih ulja. U odeljku „*Ispitivanje antibakterijskog dejstva etarskih ulja*“ najpre su prikazani protokoli priprema inokuluma kao i mikrodilucioni test za procenu antibakterijskog potencijala etarskih ulja. Sledeći odeljci bili su posvećeni opisu ispitivanja delovanja etarskih ulja na bakterijske biofilme i to kroz njihov efekat na jednospecijske i multispecijske biofilme. U odeljku „*Formulisanje iriganasa na bazi etarskih ulja, njihova karakterizacija i procena njihovog antibiofilmnog efekta na biofilm korenskih kanala*“ prikazana je metoda za formulisanje emulzija zasnovanih na etarskim uljima, zatim metoda za ispitivanje njihovog antibiofilmnog potencijala *in situ* (na korenskim kanalima izvađenih zuba), kao i Skenirajuća Elektronska Mikroskopija (SEM) multispecijskih biofilмова. Odeljak je završen ispitivanjem citotoksične aktivnosti gde je data procena uticaja etarskih ulja na ćelijsko preživljavanje nakon direktne ekspozicije ćelija uljima.

Poglavljje **REZULTATI I DISKUSIJA** se sastoji od osam potpoglavlja. U prvom delu je predstavljeno 148 sojeva bakterija koji su izolovani, identifikovani i kvantifikovani, poreklom iz 35 inficiranih korenskih kanala mladih stalnih zuba. Pored tabelarno prikazane kvantifikacije, takođe je grafički prikazana detekcija izolata iz simptomatskih, odnosno asimptomatskih zuba sa apikalnim periodontitisom. Po prvi put je dat uvid u mikrobiom mladih stalnih zuba sa apikalnim periodontitisom i istaknuto prisustvo fakultativnih (*Streptococcus*, *Actinomyces*, *Enterococcus*) i striktnih anaeroba (*Veillonella*, *Prevotella*, *Fusobacterium*). Takođe je grafičkim prikazom sugerisana veza između konkretnog izolata i jednog od tri klinička simptoma (bola, otoka, osetljivosti na perkusiju). U narednom odeljku kandidatkinja objašnjava način na koji je izvršen odabir etarskih ulja, kao sledećeg važnog parametra u studiji. Na osnovu detaljnih pregeda

literature uočeno je da bi ulja bogata oksigenovanim monoterpenima, tj. konkretno geraniolom, 1,8-cineolom i timolom mogla biti efikasna protiv bakterija iz inficiranih kanala zuba. Na osnovu ovih saznanja odabrana su etarska ulja: *Cinnamomum camphora cineoliferum*, *Pelargonium graveolens*, *Pelargonium roseum*, *Leptospermum petersonii*, *Eucalyptus citriodora*, *Melaleuca ericifolia*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon martinii* i *Thymus zygis*, čija je hemijska analiza, prikazana tabelarno. Pokazano je da sva ulja poseduju u svom sastavu oksigenovane monoterpe, a neka i željene komponente geraniol, 1,8-cineol i/ili timol. Kada su definisane bakterije i etarska ulja, naredni odeljak kandidatkinja posvećuje prvim mikrobiološkim testovima, sprovedenim u cilju procene antibakterijskog potencijala navedenih ulja. Ti testovi su pokazali da se antibakterijski potencijal ulja može prikazati u rastućem nizu: *C. camphora cineoliferum* < *M. ericifolia* < *E. citriodora* < *P. roseum* < *P. graveolens* < *L. petersonii* < *C. citratus* < *C. martinii* < *T. zygis*. Objašnjenje za antibakterijski potencijal ulja traženo je u hemijskom sastavu ulja. Razlike u ostvarenim vrednostima MIK između ovih ulja i ulja sličnog sastava, iz literature, diskutovane su sa aspekta finih razlika u sastavima dva ulja, ali i razlika u osetljivosti između izolata iz ove i drugih studija. U narednom odeljku prikazani su rezultati testova kojima je ispitivan antibiofilmni efekat etarskih ulja. Ovi testovi podrazumevali su testove procene uticaja etarskih ulja na inicijalno formiranje biofilma, kao i uticaja na već formirani biofilm. Dobijeni rezultati prikazani su grafički i pokazali su da su sva testirana etarska ulja imala značajan uticaj na inicijalnu fazu formiranja biofilma. Među posmatranim etarskim uljima, najbolju aktivnost su pokazala ulja vrsta *C. citratus* i *C. martinii*. Ispitivanje uticaja na već formirani biofilm je pokazalo da su gotovo sva ulja, izuzev *C. martinii* i *T. zygis*, imala i reduktivni i proliferativni potencijal na jednospecijski biofilm. Kako ulja vrsta *C. martinii* i *T. zygis* nisu imala proliferativni potencijal evaluiran je njihov uticaj na multispecijski biofilm, sa posebnim osvrtom na ćelijsku redukciju. Grafički prikaz je prezentovao umerenu ćelijsku redukciju u multispecijskom biofilmu. Kako su se nakon svih pomenutih testova ova dva ulja izdvojila kao ulja obećavajućeg potencijala, kandidatkinja je predstavila novi način njihove isporuke u vodenoj fazi i to u vidu mikro- (*T. zygis*) i nano- (*C. martinii*) emulzija. Nanoemulzija koja je sadržala uljane kapljice etarskog ulja *C. martinii* bila je providna i stabilna, sa veličinom čestica od 100 nm. Mikroemulzija ulja *T. zygis* je imala sedefasti odsjaj i veličinu čestica veću od 100 nm. Na ovaj način je omogućena primena ulja u irigaciji korenskih kanala (*in situ*). Irigansi (emulzije) zasnovani na uljima *C. martinii* i *T. zygis* pokazali su jednako ili bolje dejstvo u redukciji ćelija iz kanalnog biofilma u odnosu na 1,5% NaOCl. Ovaj reduktivni potencijal je ilustrovan i SEM mikroskopijom. Pretposlednji odeljak studije bio je posvećen uočavanju razlika u osetljivosti između referentnih bakterijskih sojeva iz ATCC kolekcije i kliničkih izolata. Ono što je proisteklo iz pomenute komparativne analize osetljivosti je saznanje da se za većinu kliničkih izolata odgovor na etarsko ulje razlikovao od odgovora referentnog soja. Poslednji odeljak studije kandidatkinja posvećuje analizi citotoksičnosti ulja. Uočena visoka citotoksičnost ulja, je bila poredbena sa citotoksičnošću pozitivnih kontrola, koje su u širokoj primeni u stomatologiji (NaOCl i TAP). Sve prikazane rezultate, kandidatkinja objašnjava u skladu sa dostupnim literaturnim podacima. Na samom zavšetku ovog odeljka definisana su potencijalna

etarska ulja (*C. martinii* i *T. zygis*) i njihove aktivne komponente (geraniol, timol) kojim bi se moglo ući u dalja predklinička i klinička ispitivanja u cilju unapređenja efikasnosti endodontske terapije inficiranog korenskog kanala mladih stalnih zuba. Ova disertacija otvara mogućnost za dalja istraživanja u oblastima stomatologije i biomedicine, što može biti značajno sa terapeutskeg aspekta.

**ZAKLJUČCI** pružaju odgovore i jasno su formulisani. Dato je sumiranje najvažnijih informacija navedenih u poglavlju REZULTATI I DISKUSIJA, čime je istaknut naučni doprinos doktorske disertacije. Kandidatkinja navodi da je nakon izolacije i identifikacije mikroorganizama dobijen reprezentativni uzorak mikrobioma inficiranih korenških kanala mladih stalnih zuba sa apikalnim periodontitisom, u kome su dominirali fakultativni anaerobi. Odabrana etarska ulja biljnih vrsta bila su bogata oksigenovanim monoterpenima. Najviši antibakterijski potencijal imala su ulja *C. martinii* i *T. zygis*. Oba ulja su imala inhibitorno dejstvo na posmatrane biofilme, kao i baktericidno na slobodno-živeće ćelije i ćelije unutar biofilma. Napravljen je novi način primene ulja *C. martinii* i *T. zygis* u vodenoj fazi u formi nano-, odnosno mikroemulzije, a za potrebe irigacije korenških kanala. Irigants koji je sadržao ulje *C. martinii* je bio izuzetno uspešan kada je bio primenjen u finalnoj irigaciji, što je potvrdila i SEM mikroskopija. Studija je potvrdila da ATCC sojevi ne mogu ni u kom slučaju oslikavati kliničke izolate, kao i da je u cilju postizanja veće relevantnosti rezultata istraživanja neophodno testirati veliki broj kliničkih izolata, poznatog porekla i iz prve pasaže. Citotoksičnost ulja bila je uporediva ili niža od toksičnosti pozitivnih kontrola.

Najbolji antibakterijski i antibiofilni potencijal ostvarila su etarska ulja *T. zygis* i *C. martinii*. Prošla su prvi korak u proceni bezbedne primene i uspešno su integrisana, kao prirodni biološki aktivni sastojci, u emulzije namenjene primeni u korenškim kanalima. U ostvarenoj studiji se može konstatovati uspešan odabir etarskih ulja, kao i to da su karakteristične komponente ovih ulja, timol odnosno geraniol, vrlo verovatno okosnica njihove učinkovitosti.

Poglavlje **LITERATURA** sadrži 157 bibliografskih jedinica iz relevantne literature. Kandidatkinja je navela najvažnije izvore podataka relevantne za temu doktorske disertacije, a posebno je značajno to što je uključila veliki broj novih literaturnih izvora, publikovanih u poslednjih par godina, čime je potvrdila da prati savremene naučne tokove u svetu iz relevantne naučne oblasti.

## **B. Objavljeni radovi i saopštenja koji čine deo doktorske disertacije**

1. Marinković J, Čulafić DM, Nikolić B, Đukanović S, Marković T, Tasić G, Ćirić A, Marković, D. Antimicrobial potential of irrigants based on essential oils of *Cymbopogon martinii* and *Thymus zygis* towards in vitro multispecies biofilm cultured in ex vivo root canals. *Arch Oral Biol.* 2020;117:104842. (M22)

2. Marinković J, Marković T, Brkić S, Radunović M, Soldatović I, Ćirić A, Marković D. Microbiological analysis of primary infected root canals with symptomatic and asymptomatic apical periodontitis of young permanent teeth. *Balk J Dent Med.* 2020;24. (M24)
3. Bogojević J, Nikolić M, Marković T, Ćirić A, Marković D. Analysis of chemical composition of the most efficient essential oils towards *Enterococcus faecalis* referent strain ATCC 29212 and clinical isolates. *Med Raw Mater.* 2016;36:3–25. (M52)

### **C. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija dr Jelene Marinković predstavlja dobro dizajniranu studiju koja daje značajan doprinos u oblasti proučavanja antimikrobnog potencijala prirodnih proizvoda u terapiji inficiranih kanala mladih stalnih zuba.

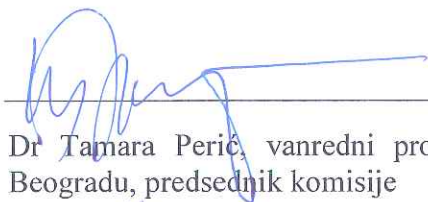
Obzirom da su postavljeni ciljevi proučeni odgovarajućim naučnim metodama, rezultati jasno predstavljeni i objašnjeni, a diskusija detaljna i sveobuhvatna, komisija smatra da kompleksnost ove disertacije ukazuje na naučnu zrelost kandidata. Nakon uvida u dostavljeni tekst komisija je jednoglasno ocenila da doktorska disertacija pod nazivom „**Dejstvo etarskih ulja na bakterije inficiranog korenskog kanala mladih stalnih zuba**“ dr Jelene Marinković predstavlja originalno, samostalno i dobro-dokumentovano istraživanje.

Doktorska disertacija ispunjava sve kriterijume propisane Zakonom o Univerzitetu i statutima Univerziteta i Stomatološkog fakulteta u Beogradu. Na osnovu iznetog predlažemo Nastavno - naučnom veću Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu da prihvati izveštaj i da odredi datum javne odbrane ove doktorske disertacije.

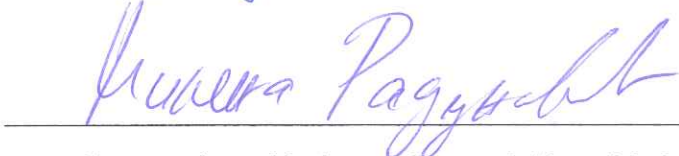
U Beogradu

-----

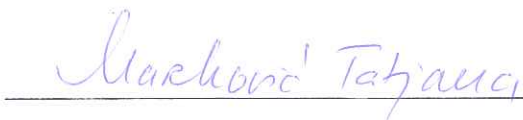
Članovi komisije



Dr Tamara Perić, vanredni profesor Stomatološkog fakulteta u Beogradu, Univerziteta u Beogradu, predsednik komisije



Dr Milena Radunović, docent Stomatološkog fakulteta u Beogradu, Univerziteta u Beogradu, član komisije



Dr Tatjana Marković, naučni savetnik Instituta za lekovito bilje „Dr Josif Pančić“ Beograd, član komisije



Dr Biljana Nikolić, vanredni profesor Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, član komisije



Dr Jelena Filipović Tričković, naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, član komisije