

MEDICINSKI FAKULTET UNIVERZITETA U NIŠU

- Nastavno-naučnom veću -

- Odboru za poslediplomske studije -

Predmet: Izveštaj Komisije o izrađenoj doktorskoj disertaciji Ivana Kostića, studenta DAS-bazična stomatologija.

Na osnovu odluke Nastavno-naučnog veća Medicinskog fakulteta u Nišu broj 04-BS-11/08 prihvaćen je izveštaj mentora prof. dr Steve Najmana o izrađenoj doktorskoj disertaciji Ivana Kostića pod odobrenim nazivom „*Efekti primene sredstava za retrakciju gingive na eksperimentalnim modelima*“.

Tom prilikom imenovana je Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije u sledećem sastavu:

Prof. dr Ljiljana Kesić, predsednik

Prof. dr Stevo Najman, mentor i član

Prof. dr Dragan Mihailović, član

Prof. dr Ljiljana Aleksov, član

Doc. dr Tatjana Puškar, član sa Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

U skladu sa odlukom, Komisija podnosi sledeći

IZVEŠTAJ

I Opšti podaci

Izrada doktorske disertacije kandidata Ivana Kostića, doktora stomatologije, odobrena je na Naučno-Nastavnom Veću održanom 04.12.2013. godine. Istraživanja su sprovedena u: Naučnoistraživačkom centru za biomedicinu, Institutu za biologiju sa humanom genetikom i Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Nišu.

II Stepen usaglašenosti sa sadržajem prijavljene teme

Doktorska disertacija je izrađena u skladu sa obrazloženjem koje je kandidat priložio prilikom prijave teme. Sadržaj izrađene doktorske disertacije u potpunosti odgovara njenom naslovu. U toku izrade doktorske disertacije ciljevi istraživanja i odabrana metodologija nisu menjani.

III Tehničke karakteristike doktorske disertacije

Doktorska disertacija „*Efekti primene sredstava za retrakciju gingive na eksperimentalnim modelima*“ kandidata Ivana Kostića napisana je na 137 strana. Rad je ilustrovan sa 35 slika, a rezultati istraživanja prezentovani su u 82 tabele i na 20 grafikona. Doktorska disertacija je podeljena u 9 poglavlja: Kratak sadržaj, Uvodne napomene, Pregled literature, Cilj rada, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključak i Literatura. Pri izradi disertacije korišćeno je 192 bibliografska citata stranih i domaćih autora.

IV Sadržajna struktura doktorske disertacije

Da bi se sprečila dublja oštećenja parodonta zuba posebnu pažnju treba usmeriti ka očuvanju zdravlja gingive u toku stomatoloških intervencija. U **Uvodnim napomenama** kandidat ukazuje na značaj upotrebe rastvora za retrakciju gingive u svakodnevnoj stomatološkoj praksi. Sa druge strane, istraživanja brojnih autora pokazuju da retrakciona procedura, koja je uobičajena kod uzimanja otiska za indirektnu protetičke restauracije (veštačke krunice i mostove), može da dovede do oštećenja tkiva gingive i konsekutivne parodontopatije. Obzirom na učestalost primene sredstava za retrakciju gingive nameće se potreba za kompleksnijim sagledavanjem njihovih bioloških karakteristika, kao i međusobnu komparaciju.

Drugo poglavlje, **Pregled literature**, koncipirano je u četiri celine: Opšte karakteristike gingivalnog tkiva, Uzimanje otiska granice preparacije zuba, Sredstva za retrakciju gingive i Biokompatibilnost sredstava za retrakciju gingive.

Prvi deo poglavlja odnosi se na anatomsku i histološka svojstva zdravih desni u cilju podsećanja na finu i kompleksnu strukturu ovog tkiva i nivoa na kojima su moguća njegova oštećenja. Naime, oštećenja desni dovode do zapaljenskih promena koje se označavaju kao gingivitis. Ako se na vreme ne sanira, naizgled beznačajna upala desni prelazi u hroničnu inflamaciju, koja dovodi do atrofije desni i ogoljavanja vrata zuba. Dalja destrukcija parodonta dovodi do formiranja parodontalnih džepova. Oboljenja parodonta, na kraju, rezultiraju klaćenjem, migracijom i ispadanjem zuba.

Zdravlje parodontalnih tkiva blisko je povezano sa kvalitetom marginalnog naleganja fiksne nadoknade, što sa druge strane, zavisi od tehnike uzimanja otiska. U drugom delu poglavlja opisana je tehnika otiskivanja granice preparacije fiksnih nadoknada, kao i značaj retrakcionih sredstava u tom postupku. Za adekvatno otiskivanje predela demarkacione linije brušenog zuba, smeštene u ili ispod nivoa gingivalne ivice neophodna je reverzibilna dilatacija gingivalnog sulkusa i njegovo isušivanje.

Naredni deo poglavlja odnosi se na analizu sastava i uloge sredstava koja se koriste za retrakciju gingive. Njihova uloga jeste privremeno potiskivanje gingivalnog tkiva, kao i kontrola hemoragije i protoka gingivalnog fluida, čiji je balans uvek poremećen nakon marginalne preparacije zuba. Komercijalno dostupna sredstva mogu se podeliti na adstringentna (soli metala, pre svega aluminijuma) i vazokonstriktorna (adrenalin). Obzirom na pojedina njihova neželjena dejstva opisana u literaturi, dat je i pregled alternativnih sredstava iz grupe simpatomimetskih vazokonstriktora (tetrahidrozolin i oksimetazolin). Oni poseduju željenu efikasnost, bez neželjenih lokalnih i sistemskih efekata.

U poslednjem delu ovog poglavlja opisuje se savremeni aspekt ispitivanja biokompatibilnosti sredstava za retrakciju gingive koji podrazumeva tri nivoa istraživanja: u *in vitro* i *in vivo* uslovima i testove primene. Raznovrsnost testova za ispitivanje biokompatibilnosti akrilata omogućava bolje sagledavanje dobijenih rezultata, kao i međusobnu komparaciju ispitivanih materijala, sve u cilju poboljšanja njihovih kvaliteta i adekvatnije primene u uslovima stomatološke prakse.

Radna hipoteza. U istraživanju se pošlo od pretpostavke da sredstva za retrakciju gingive ispoljavaju izvestan toksični efekat na tkiva sa kojima dolaze u kontakt prilikom uzimanja otiska za fiksne stomatološke nadoknade, a stepen oštećenja gingivalnog tkiva je različit i zavisi od vrste, koncentracije i trajanja njihovog dejstva. Biološki prihvatljivija sredstva za retrakciju gingive od na tržištu dostupnih preparata na bazi aluminijum hlorida i adrenalina treba tražiti među simpatomimetskim vazokonstriktorima (tetrahidrozolin).

Istraživanje je preduzeto skladu sa postavljenim **ciljevima**:

1. Usporedna analiza citotoksičnog efekta sredstava za retrakciju gingive u uslovima *in vitro*.
2. Usporedna analiza potencijalno toksičnog efekta sredstava za retrakciju gingive na gingivalno tkivo u uslovima *in vivo*.

Materijal i metode. U radu je korišćena savremena metodologija, koja je detaljno objašnjena i može se ponoviti. Ispitivani materijal je obuhvatio tri sredstva koji se u stomatološkoj protetici koriste za retrakciju gingive prilikom uzimanja otisaka za indirektno restauracije. U istraživanju su korišćena dva materijala na bazi aluminijum hlorida (10% i 25% rastvor), kao i sredstvo na bazi adrenalina (8% rastvor). Istraživanje je obuhvatilo i simpatomimetski vazokonstriktor tetrahidrozolin (0,05% rastvor).

Biokompatibilnost sredstava za retrakciju gingive ispitivana je u uslovima *in vitro* na MDCK (Madin-Darby canine kidney) kontinuiranoj ćelijskoj liniji i u *in vivo* uslovima na eksperimentalnim životinjama. MDCK ćelijska kultura se može smatrati modelom epitela uopšte, pa u tom smislu i epitela gingive, dok je struktura gingivalnog tkiva i dubina gingivalnog sulkusa kunića gotovo identična humanoj.

Efekat retrakcionih sredstava i tetrahidrozolina na vijabilnost i oporavak MDCK ćelija ispitivan je MTT testom. MTT test spada u grupu metaboličkih testova. Vijabilne ćelije mogu da redukuju žutu tetrazolijumovu so (MTT) do formazana, jedinjenja plave boje koje se u vidu kristala u njima taloži. Liziranjem membrane izopropanolom formazan se rastvara i dobija se obojeni rastvor čija se apsorbanca očitava na višekanalnom spektrofotometru. Postoji direktna srazmera izmerene apsorbance i broja živih ćelija. Toksično dejstvo testiranih materijala smanjuje aktivnost celularnih enzima, pa samim tim i redukciju MTT. Korišćeni su rastvori ispitivanih materijala dobijeni njihovim razblaženjem u Ringerovom rastvoru u sledećim koncentracijama: 5%, 10%, 25% i 50%. Merenja intenziteta redukcije MTT-a vršena su neposredno nakon dejstava različitih materijala u trajanju od tri, šest i deset minuta kako bi odredila vijabilnost, odnosno nakon perioda jednodnevnog oporavka ćelija u hranjivom medijumu u cilju određivanja stepena oporavka ćelija. Vrednosti dobijene u *in vitro* uslovima bile su osnov za statističku analizu i obrađeni su programom SPSS 15.0. Korišćena je analiza

varijanse (ANOVA), sa sledstvenom Post-Hoc analizom, a za statistički značajne smatrani su nivoi od $p < 0,05$. Kvantitativne promene u vijabilnosti ćelija predstavljene su i opisno.

In vivo istraživanja obavljena su u skladu sa Pravilnikom o postupanju sa eksperimentalnim životinjama i sa Helsinškom deklaracijom (Odobrenje Etičkog Komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu, broj 01-2066-2). Eksperimentalni dizajn predvideo je aplikaciju retrakcionog konca impregniranog ispitivanim sredstvom na bazi aluminijum hlorida i adrenalina, kao i simpatomimetskog vazokonstriktora tetrahidrozolina u gingivalni sulkus levih maksilarnih i mandibularnih sekutića kunića. Postupak i vreme aplikacije retrakcionih sredstava i tetrahidrozolina od 7 minuta odgovarali su kliničkim uslovima. Predviđene su negativna kontrola (odsustvo intervencije) i lažni tretman (aplikacija retrakcionog konca bez ispitivanog sredstva). Biopsija tretiranog gingivalnog tkiva i kontrole sprovedena je nakon opservacionih perioda od jednog sata, jednog, sedam i trideset dana. Preparati bojeni klasičnom metodom *Hematoksilin & Eozin* (HE) analizirani su patohistološki sistemom za analizu slika Lucia 3,2 G na svetlosnom mikroskopu. Zastupljenost kolagenih vlakana analizirana je pod polarizacionim svetlom. Ocena rezultata izvršena je semikvantitativno, na osnovu prisustva inflamatorne reakcije i fibroze tkiva, kao i eventualnih destruktivno-nekrotičnih promena.

Rezultati. U *in vitro* istraživanju je potvrđena pretpostavka da vijabilnost i oporavak ćelijske kulture zavise od koncentracije ispitivanih rastvora, trajanja njihovog dejstva, kao i od tipa primenjenog materijala. Sa porastom koncentracije i trajanja dejstva rastvora vijabilnost ćelija statistički je značajno opadala, što govori u prilog potencijalne toksičnosti ispitivanih materijala. Pri najmanjim koncentracijama (5% i 10%) i nakon opservacionih perioda od tri i šest minuta, rastvori komercijalno dostupnih sredstava za retrakciju gingive pokazali su se necitotoksičnim do blago citotoksičnim. Sa druge strane, ozbiljan citotoksični efekat primećen je nakon desetominutnog dejstva viših koncentracija rastvora materijala na bazi aluminijum hlorida. Rezultati studije pokazali su najmanji citotoksični efekat simpatomimetskog vazokonstriktora tetrahidrozolina, iako je i kod ove vrste materijala uočen pad vijabilnosti ćelija sa porastom trajanja dejstva i koncentracije rastvora. Uzevši u obzir nizak citotoksični efekat tetrahidrozolina, očekivan je i kompletniji oporavak u ćelijskoj kulturi, nakon jednodnevne inkubacije. Nasuprot tome, signifikantno više vrednosti ćelijske vijabilnosti neposredno posle dejstva komercijalnih sredstava u odnosu na vrednosti nakon dodatne inkubacije ćelija govore o prolongiranom štetnom uticaju preparata aluminijum hlorida i o mogućnosti pokretanja sekundarnog inflamatornog odgovora.

Rezultati *in vivo* istraživanja ukazali su na reverzibilno oštećenje gingivalnog tkiva posle lokalne aplikacije materijala na bazi aluminijum hlorida i adrenalina. Značajnijih promena u strukturi tkiva jedan sat nakon uklanjanja materijala nije bilo. Međutim, njihova upotreba dovela je do akutnog inflamatornog odgovora nakon opservacionih perioda od jednog i sedam dana. Posle trideset dana uočena je reparacija oštećenog tkiva. Inflamatorne promene nastale primenom tetrahidrozolina bile su slabije izražene u odnosu na sredstava za retrakciju gingive na bazi aluminijum hlorida i adrenalina i rezultovale su ozdravljenjem nakon sedmodnevnog opservacionog perioda. Tetrahidrozolin se pokazao biološki prihvatljivijim u odnosu na ostale ispitivane materijale.

U **diskusiji** su detaljno komentarisani dobijeni rezultati. Kandidat se u diskusiji poziva na slične vrednosti iz literature i objašnjava razlike jasno ukazujući na mogućnosti kliničke primene dobijenih rezultata.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se **zaključiti**: 1. Citotoksičnost sredstva za retrakciju gingive zavisi od njihove koncentracije i trajanja dejstva. 2. Rastvori sredstava za retrakciju gingive na bazi aluminijum hlorida u koncentraciji od 25% i 50% su pokazali statistički značajan citotoksičan efekat već pri trominutnom dejstvu. 3. Sredstva za retrakciju gingive na bazi aluminijum hlorida imaju prolongirano dejstvo i negativno utiču na oporavak i rast ćelijske kulture jedan dan nakon aplikacije. 4. U *in vitro* uslovima rastvori tetrahidrozolina pokazali su se netoksičnim u nižim, odnosno blago do umereno toksičnim u višim koncentracijama, a samim tim i biološki prihvatljivijim od komercijalno dostupnih retrakcionih sredstava. 5. Aplikacija retrakcionih sredstava na bazi aluminijum hlorida i adrenalina u gingivalni sulkus kunića dovodi do akutne inflamatorne reakcije čiji se intenzitet vremenom smanjuje. Oporavak tkiva uočen je nakon tidesetodnevnog opservacionog perioda. 6. Upotreba tetrahidrozolina izaziva blago reverzibilno oštećenje gingivalnog tkiva kunića, sa potpunim ozdravljenjem nakon sedmodnevne aplikacije. 7. Preparat na bazi tetrahidrozolina pokazao je veći stepen biokompatibilnosti u uslovima *in vitro* i *in vivo*, što ga preporučuje za upotrebu u svakodnevnoj stomatološkoj praksi. 8. U cilju prevencije oštećenja gingivalnog tkiva neophodno je smanjenje koncentracije upotrebljenog sredstva za retrakciju gingive ispiranjem gingivalnog sulkusa, smanjenje trajanja retrakcione procedure ispod šest minuta, kao i kontrolisano brušenje zuba sa što manjim oštećenjem tkiva.

IV Ocena naučnog doprinosa doktorske disertacije

Doktorska disertacija *“Efekti primene sredstava za retrakciju gingive na eksperimentalnim modelima”* predstavlja originalan i samostalan naučni rad kandidata. Izrađena doktorska disertacija predstavlja originalni doprinos nauci s obzirom da iscrpna komparativna analiza dejstava retrakcionih sredstava na bazi aluminijum hlorida i adrenalina na gingivalno tkivo do sada nije rađena. U cilju prevencije oštećenja gingivalnog tkiva neophodno je smanjenje koncentracije upotrebljenog sredstva za retrakciju gingive ispiranjem gingivalnog sulkusa fiziološkim rastvorom ili vodenim sprejom, smanjenje trajanja retrakcione procedure na tri do šest minuta, kao i kontrolisano brušenje zuba sa što manjim oštećenjem tkiva. Preparat na bazi tetrahidrozolina pokazao se kao dobra alternativa za ispitivana retrakciona sredstva zbog većeg stepena biokompatibilnosti u uslovima *in vitro* i *in vivo*, što ga, uz odsustvo sistemskih reakcija, preporučuje za upotrebu u svakodnevnoj stomatološkoj praksi.

V Ocena kandidata

Kandidat dr Ivan Kostić iskazao je sposobnost za primenu naučno-istraživačke metodologije i korišćenjem obimne literature dobio jasne odgovore na postavljene ciljeve istraživanja.

ZAKLJUČAK

Doktorska disertacija „*Efekti primene sredstava za retrakciju gingive na eksperimentalnim modelima*“ predstavlja samostalan multidisciplinarni naučni rad kandidata, rađen prema savremenim principima naučno-istraživačkog rada. Sa uspehom su realizovani postavljene ciljevi, a rezultati su jasno prikazani. Doktorska disertacija predstavlja originalno naučno delo koje ima praktičnu primenu.

Komisija prihvata i pozitivno ocenjuje izrađenu doktorsku disertaciju, te Naučno-Nastavnom Veću predlaže da usvoji pozitivnu ocenu izrađene doktorske disertacije dr Ivana Kostića i odobri njenu javnu odbranu.

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

Prof. dr Ljiljana Kesić, predsednik

Prof. dr Stevo Najman, mentor i član

Prof. dr Dragan Mihailović, član

Prof. dr Ljiljana Aleksov, član

Doc. dr Tatjana Puškar, član sa Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

DOPRINOS DOKTORSKE DISERTACIJE

Ivan M. Kostić

Doktorska disertacija *“Efekti primene sredstava za retrakciju gingive na eksperimentalnim modelima“* predstavlja originalni doprinos nauci s obzirom da iscrpna komparativna analiza dejstava retrakcionih sredstava na bazi aluminijum hlorida i adrenalina na gingivalno tkivo do sada nije rađena. U cilju prevencije oštećenja gingivalnog tkiva neophodno je smanjenje koncentracije upotrebljenog sredstva za retrakciju gingive ispiranjem gingivalnog sulkusa fiziološkim rastvorom ili vodenim sprejom, smanjenje trajanja retrakcione procedure na tri do šest minuta, kao i kontrolisano brušenje zuba sa što manjim oštećenjem tkiva. Alternativni preparat na bazi tetrahidrozolina pokazao je veći stepen biokompatibilnosti u uslovima *in vitro* i *in vivo*, što ga, uz odsustvo sistemskih reakcija, preporučuje za upotrebu u svakodnevnoj stomatološkoj praksi.

Doctoral dissertation *“Application effects of gingival retraction agents on experimental models”* represents an original contribution to science with respect to an extensive comparative analysis of the effects of retraction agents based on aluminum chloride and adrenaline on the gingival tissue has not been done. In order to prevent damage to the gingival tissue is necessary to decrease the concentration of agent used for gingival retraction gingival sulcus by rinsing with saline or water spray, reducing the duration of the retraction procedure in three to six minutes, as well as controlled teeth preparation with minimal tissue damage. Alternative product based on tetrahydrozoline showed a higher degree of *in vitro* and *in vivo* biocompatibility, which, along with the absence of systemic reactions, it is recommended for use in everyday dental practice.

SPISAK RADOVA KANDIDATA

Ivan Kostić

- 1. Kostić M, Krunić N, Nikolić Lj, Nikolić V, Najman S, Kostić I, Rajković J, Manić M, Petković D. Influence of residual monomer reduction on acrylic denture base resins quality. *Hemijska Industrija* 2011; 65: 171-177.**
- 2. Kostić I, Najman S, Kostić M, Stojanović S. Comparative review of gingival retraction agents. *Acta Medica Medianae* 2012; 51(1): 81-84.**
3. Kostić M, Najman S, Najdanović J, Krunić N, **Kostić I.** Application of direct contact test in evaluation of cytotoxicity of acrylic denture base resins. *Acta Medica Medianae* 2012; 51(1): 66-72.
- 4. Kostić I, Mihailović D, Najman S, Stojanović S, Kostić M. The rabbit gingival tissue response to retraction liquids and tetrahydrozoline. *Vojnosanit Pregl* 2014; 71(1): 46-51.**
5. Krunić N, Kostić M, Janosević P, Petrović D, **Kostić I,** Petrović M, Igić M. Prosthetic rehabilitation in patient with forced class III malocclusion. *Stomatologija (Mosk)* 2014; 93: 46-9.