

**MEDICINSKI  
FAKULTET**

Adresa: Kruševac bb  
81000 PODGORICA  
CRNA GORA  
Tel: +382 20 246 651  
Fax: +382 20 243 842  
url: [www.ucg.ac.me/medf](http://www.ucg.ac.me/medf)  
E-mail: [infomedf@ac.me](mailto:infomedf@ac.me)



**MEDICAL  
FACULTY**

Address: Krusevac bb  
81000 PODGORICA  
MONTENEGRO  
Phone: +382 20 246 651  
Fax: +382 20 243 842  
url: [www.ucg.ac.me/medf](http://www.ucg.ac.me/medf)  
E-mail: [infomedf@ac.me](mailto:infomedf@ac.me)

Broj: 2047/17-1  
Podgorica, 07.12.2021. godine

**Univerzitet Crne Gore  
Odbor za doktorske studije  
n/r predsjednici – prof. dr Biljani Šćepanović**

Poštovana,

U skladu sa stavom 3 člana 35, i člana 55 Pravila doktorskih studija, i tačkom 3.6 . Vodiča za doktorske studije, dostavljamo Odluku Vijeća Medicinskog fakulteta o usvajanju Izvještaja Komisije za ocjenu prijave doktorske disertacije (obrazac D1) i inoviranu prijavu teme doktorske disertacije, doktoranda dr stom Ognjena Kovačevića.

S poštovanjem.

**MEDICINSKI FAKULTET  
DEKAN,**

**Prof. dr Miodrag Radunović**

**UNIVERZITET CRNE GORE**  
**MEDICINSKI FAKULTET**  
**Broj:2047/17**  
**Podgorica, 06.12.2021. godine**

Na osnovu člana 64 stav 2 tačka 9 Statuta Univerziteta Crne Gore, a u skladu sa članom 35 Pravila doktorskih studija Vijeće Medicinskog fakulteta na elektronskoj sjednici održanoj 03-06.12.2021. godine donijelo je

**ODLUKU**

1. Usvaja se Izvještaj Komisije za ocjenu prijave doktorske disertacije kandidata dr stom Ognjena Kovačevića, broj: 1844 od 01.11.2021. godine.
2. Predlaže se Senatu UCG da prihvati kao podobnu doktorsku tezu pod nazivom „**Analiza uticaja pušenja na molekulske markere paradontopatije u salivi**“ kandidata dr stom **Ognjena Kovačevića**.
3. Odluka Vijeća, Izvještaj Komisije iz tačke 1 ove odluke i novi obrazac Prijave radnog naziva doktorske teze (obrazac PD broj: 1844/1 od 01.11.2021. godine) , dostavlja se Centru za doktorske studije i Senatu Univerziteta Crne Gore, na dalju realizaciju.

**O B R A Z L O Ž E N J E**

**Dr stom Ognjen Kovačević podnio je prijavu teme doktorske disertacije pod nazivom “Analiza uticaja pušenja na molekulske markere paradontopatije u salivi” dana 08.07.2021. godine (Broj prijave: 1000).**

Senat Univerziteta Crne Gore na sjednici održanoj 24.09.2021. godine imenovao je Komisiju za ocjenu prijave doktorske disertacije, kandidata dr stom Ognjena Kovačevića u sastavu: prof. dr Milica Martinović, prof. dr Miloš Hadži Mihailović, doc. dr Mirjana Đuričković.

Kandidat je pred navedenom Komisijom javno obrazložio ciljeve i očekivane rezultate, odnosno izložio istraživački program doktorske teze, dana 22.10.2021. godine. Komisija je podnijela Vijeću Medicinskog fakulteta Izvještaj o ocjeni podobnosti doktorske disertacije broj:1844 od 01.11.2021. godine. Shodno stavu 7 tačke 3.6 Vodiča za doktorske studije, kandidat je postupio po primjedbama Komisije i dostavio inoviranu verziju Prijave teme doktorske disertacije broj: 1844/1 od 01.11.2021. godine.

Vijeće Medicinskog fakulteta na elektronskoj sjednici održanoj 03-06.12.2021. godine, nakon razmatranja izvještaja Komisije broj: 1844 od 01.11.2021. godine i nove Prijave broj: 1844/1 od 01.11.2021. godine, odlučilo je kao u dispozitivu ove odluke.

**VIJEĆE MEDICINSKOG FAKULTETA**  
**PREDSJEDAVAJUĆI,**  
**Prof. dr Miodrag Radunović, dekan**



## OCJENA PODOBNOSTI DOKTORSKE TEZE I KANDIDATA

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	dr Ognjen M. Kovačević spec.parodontologije i oralne medicine
Fakultet	Medicinski fakultet Podgorica
Studijski program	Doktorske studije
Broj indeksa	41/06
Podaci o magistarskom radu	/
NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Na službenom jeziku	<b>Analiza uticaja pušenja na molekulske markere parodontopatije u salivi.</b>
Na engleskom jeziku	Analysis of the influence of smoking on molecular markers of periodontitis in saliva
Datum prihvatanja teme i kandidata na sjednici Vijeća organizacione jedinice	06.12.2021.
Naučna oblast doktorske disertacije	Parodontologija i oralna medicina
Za navedenu oblast matični su sljedeći fakulteti	
Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore(studijski program Stomatologija)	
A. IZVJEŠTAJ SA JAVNE ODBRANE POLAZNIH ISTRAŽIVANJA DOKTORSKE DISERTACIJE	
<p>Javna odbrana ciljeva i očekivanih rezultata,kao i istraživačkog programa doktorske teze kandidata dr stom.Ognjena Kovačevića održana je 22.10.2021.godine u 12h, u Sali za sastanke(dekanat) na Medicinskom fakultetu u Podgorici,pred komisijom u sastavu:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. dr Milica Martinović redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore,</li> <li>2. dr Miloš Hadzi Mihailović,redovni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu,</li> <li>3. dr Mirjana Đuričković,docent Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore</li> </ol> <p>U tridesetominutnom izlaganju kandidat je obrazložio predloženu temu doktorske disertacije,izložio dosadašnja istraživanja u navedenoj oblasti u svijetu,definisao ciljeve i hipoteze koje će biti provjerene tokom izrade doktorskog istraživanja.Nakon toga,kandidat je Komisiji predstavio dizajn istraživanja,upoznao ih sa ispitanicima i metodologijom rada,statističkom analizom koja će biti korišćena pri izradi doktorske teze,kao i očekivanim rezultatima i naučnim doprinosom.</p> <p>Po završetku izlaganja članovi Komisije su postavljali pitanja,na koja je kandidat uspješno odgovorio i dali komentare i sugestije za uspješan završetak doktorske teze.Komisija je jednoglasno donijela odluku da je kandidat dr stom Ognjen Kovačević uspješno odbranio podobnost teme doktorske disertacije.</p>	

**B. OCJENA PODOBNOSTI TEME DOKTORSKE DISERTACIJE**

**B1. Obrazloženje teme**

Duvanski dim sadrži oko 4000 različitih toksičnih supstanci od čega su 40 kancerogene. U kancerogene supstance spadaju benzpiralen, benzperilen, radioaktivni polonijum i druge. (8) Pušenje izaziva naviku sto prouzrokuje i druge zdravstvene probleme.

Pušenje predstavlja jedan od glavnih faktora za nastanak parodontopatije. Parodontopatija je tri puta češća kod pušača nego kod nepušača bez obzira na nivo oralne higijene i ima težu kliničku sliku nego kod nepušača. (4,18) Utvrđeno je da efekat pušenja na parodontocijum kumulativan tako da negativne posledice na parodontocijum zavise od dužine pušenja i broja cigareta.

Histološki je utvrđeno da pušači imaju manji broj krvnih sudova u gingivi u odnosu na nepušače, a takodje i manji stepen inflamacije gingive što može predstavljati problem kod mlađjih ljudi jer se početni znaci parodontopatije mogu previdjeti. (23) Takodje kod pušača je prisutna i poremećena funkcija fibroblasta, što za posledicu dovodi do smanjene sinteze kolagena. (9) Pored toga kod pušača je povećana aktivnost osteoklasta koji su odgovorni za resorpciju i remodelaciju kosti. (5)

Pušenje duvana povećava broj patogenih mikroorganizama u parodontocijumu i takodje smanjuje produkciju antitijela, smanjuje hemotaksu i fagocitozu neutrofila. (14,17) Istraživanja pokazuju da se nikotin absorbuje u oralna tkiva i nadjen je na površini korijena zuba. Najznačajnija i najveća količina nikotina detektovana je u serumu, salivi i gingivalnoj tečnosti. (6)

Sastav pljuvačke je relativno slabo proučavan kod pušača. Pljuvačka kao zaštitna tečnost prva dolazi u kontakt sa duvanskim dimom. Jedan od najznačajnijih sastojaka pljuvačke su pljuvačni proteini. Proteini služe kao potencijalni biomarkeri za praćenje patoloških stanja tako da se pljuvačka može koristiti za sagledavanje oralnog zdravlja pojedinaca. (28)

Mnogobrojni proteini pljuvačke imaju važnu antimikrobnu, lubrikantnu i probavnu funkciju. Salivarni proteini su uključeni u modulaciju kolonizacije mikroorganizama na zubima i oralnoj sluzokoži. Takodje vrše modulaciju koncentracije kalcijum fosfata što je bitno za održavanje integriteta zubnih tkiva i stvaranja kamenca u pljuvačnim žlijezdama i u usnoj duplji. Salivarni proteini učestvuju u formiranju stečene pelikule koja ima uticaj na kolonizaciju mikroorganizama na površini zuba. Ukupni proteini pljuvačke pokazuju raznoliku aktivnost koja pomaže u očuvanju integriteta oralnih tkiva i zaštitu od oralnih i spoljnih mikroorganizama koji izazivaju infekciju.

Potencijalni biomarkeri parodontopatije su i matriksne metaloproteinaze. U ovoj studiji će se prije svega sagledavati želatinaze (MMP 2 i MMP 9) u salivi kod pušača i nepušača sa parodontopatijom.

Matriksne metaloproteinaze (MMP) su porodica ekstracelularnih cink i kalcijum zavisnih endopeptidaza zajedno sposobnih da razgrade sve komponente ekstracelularnog matriksa i zbog toga imaju značajnu ulogu u mnogim biološkim i patološkim procesima.

Familija MMP kod ljudi broji 23 člana klasifikovanih u šest grupa i to kolagenaze (MMP-1, MMP-8, MMP-13), želatinaze (MMP-2, MMP-9), stromelizine (MMP-3, MMP-10), matrilizine (MMP-7, MMP-26, MMP-11), metaloproteinaze membranskog tipa (MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25), i ostale MMP (MMP-12, -19, -20, -21, -23, -27, -28)

U gingivalnom tkivu opisane su mnogobrojne matriksne metaloproteinaze kao što su MMP-2, MMP-7, MMP-17, a najpručavanija je MMP-8, MMP-9 i MMP-13 u tečnosti gingivalnog sulkusa. (7,16)

Matriksne metaloproteinaze i tkivni inhibitori matriks metaloproteinaza (TIMP) treba da budu u ravnoteži kako bi se odvijao fiziološki proces remodelacije parodonticijuma. Svaka abnormalnost u odnosu između MMP i TIMP inicirat će nekontrolisanu destrukciju parodontalnog tkiva što dovodi do parodontopatije.

Fibroblasti iz periodontalnog ligamenta i ćelije gingive imaju značajnu ulogu u produkciji kolagenaza (MMP-1, -8, -13) dok neutrofili i makrofagi osim što proizvode kolagenaze proizvode i želatinaze (MMP-2 i MMP-9) koji su odgovorni za destrukciju parodontalnog tkiva.

Nivoi matriksnih proteinaza u tečnosti gingivalnog sulkusa, kod pacijenata sa parodontopatijom proučavani su u cilju dijagnostike i prognoze samog oboljenja. Studija od strane Ramseier i sar. (22) smatra da koncentracija MMP8 i MMP 9 u salivi može da predvidi nastanak parodontopatije. Nivo MMP -9 u gingivalnoj tečnosti smatra se korisnim biomarkerom za praćenje parodontalnog oboljenja. U kliničkoj studiji od strane Marcaccini i sar. (19) dokazana je povećana aktivnost želatinaza i MMP3, 8 i 9 u plazmi kod pacijenata sa hroničnom parodontopatijom dok je posle tri mjeseca, nakon kauzalne terapije nivo aktivnosti značajno opao.

MMP-9 ili želatinaza B primarno je nadjena u salivi i tečnosti gingivalnog sulkusa. Uključena je u procesima kao što je inflamacija, zarašćivanje rane i rast tumora. (25) Ova matriksna metaloproteinaza uključena je u razaranju kolagena tip 4 i nekolagenih komponenti ekstracelularnog matriksa.

MMP-9 smatra se značajnom proteinazom uključenom u resorpciju kosti. Smatra se da MMP-9 imaju značajnu ulogu u resorpciji alveolarne kosti uzrokovanu osteoklastima. MMP-9 stvara se iz polimorfonuklearnih leukocita, makrofaga i epitelnih ćelija. (12)

Povećan nivo MMP-2 je zabeležen u gingivalnoj tečnosti i gingivalnom tkivu kod osoba sa parodontopatijom. Matriksne metaloproteinaze 2 mogu razgraditi kolagen tipa 4, nekolagene strukture ekstracelularnog matriksa kao i nativni kolagen u gingivalnom tkivu. (29,1) Takođe MMP-2 utiču i na ćelijsku proliferaciju i njihovu apoptozu. One utiču i na aktivnost fibroblastnog faktora rasta-1 zbog toga imaju potencijal da moduliраju mitogenu i angiogenu aktivnost fibroblastnog faktora rasta. Ovo dovodi do zaključka da MMP-2 ne dovode samo do destrukcije parodontalnog tkiva već ima ulogu i u njegovoj reparaciji. (26,10) Glavni izvor MMP-2 u salivi su polimorfonuklearni leukociti. MMP2 stvaraju se iz fibroblasta, endotelnih ćelija i osteoblasta. (12)

U ovoj studiji ispitaće i uticaj pušenja na karcinoembrionalni antigen u salivi kod osoba sa parodontopatijom.

Karcinoembrionalni antigen (CEA) je trans membranski glikoprotein koji učestvuje u adheziji ćelija. Izolovan je u debelom crijevu fetusa i adenokarcinomu debelog crijeva. Kao i kod ostalih tumor markera njegova ekspresija raste s povećanjem mase tumora. Osim kod kolonorektalnog karcinoma njegova koncentracija raste i kod pacijenata sa karcinomima drugih organa jetre, pluća, dojki, želuca, bubrega, jajnika, prostate kao i kod benignim stanjima kao što su hronične plućne bolesti, zapaljenske bolesti crijeva, ciroza, benigna hipertrofija prostate.

Takođe je otkriveno prisustvo CEA i CEA srodnih molekula u gingivalnom tkivu, submandibularnim žlijezdama i salivi. (30,11) Nastanak parodontopatije je složen proces. Smatra se da su bakterije odgovorne za nastanak parodontalnog oboljenja. Bakterije

oslobadaju razne proteolitičke enzime i s tim postižu imunološke ćelije da stvaraju enzime koji razgrađuju parodontalno tkivo.(13)Kako je CEA uključen u procesu ćelijske adhezije uključujući i prepoznavanje bakterija,predpostavlja se da ima važnu ulogu u odžavanju strukture i funkcije oralne sluzokože kao i da je uključen u patološke procese u parodonticijumu.Dokazano je da je koncentracija CEA u salivi u korelaciji sa težinom kliničke slike parodontopatije.Najniža koncentracija salivarnog CEA je nadjena kog zdravog parodonticijuma a najveća kod ucero-nekrozne parodontopatije.Nakon terapije metronidazolom ucero-nekrozne parodontopatije zapaža se značajno sniženje salivarnog CEA antigena.(24)Ovi rezultati upućuju da salivarni CEA može biti potencijalni marker parodontopatije i biti koristan za dijagnozu i praćenje pacijenata sa parodontopatijom.

## B2. Cilj i hipoteze

**Ciljevi** ovog istraživanja bili bi da utvrdimo:

**Cilj 1:** da li pušenje ima uticaj na klinički stadijum parodontopatije

**Cilj 2:** da li postoji razlika u dubini parodontalnih depova i nivoa pripojnog epitela (Npe) između pušača i nepušača

**Cilj 3:** da li postoji razlika u indeksu krvarenja gingive između pušača i nepušača

**Cilj 4:** da li postoji korelacija između kliničkih stadijuma parodontopatije i različitih parametara u pljuvački ( ukupni proteini i karcinoembrionalni antigen (CEA)) kod pušača i nepušača

**Cilj 5:**da li postoji korelacija između pušenja i kliničkih stadijuma parodontopatije u odnosu na nivo matriksnih metaloproteinaza, posebno gelatinaza (MMP-2 i MMP-9)

## Hipoteze

**H01:**Kod pušača je prisutna teža klinička slika parodontopatije nego kod nepušača

**H02:**Pušenje utiče na proteinski sastav pljuvačke, što utiče na odbrambene mogućnosti parodonticijuma

**H03:**Pušenje utiče na enzimsku aktivnost matriksnih metaloproteinaza

**H04:**Pljuvačka je dobar medijum za određivanje stanja parodonticijuma,njen sastav tj.utvrđivanje potencijalnih molekularskih markera parodontalne inflamacije što može biti korisno za određivanje plana liječenja parodontopatije i poboljšanje oralnog zdravlja posebno kod pušača.

**H05:**Kod pušača se očekuje povećana koncentracija karcinoembrionalnog antigena u salivi što se može povezati sa promjenama u parodonticijumu i većim rizikom za nastanak karcinoma kod pušača u odnosu na nepušače što bi salivu činilo dobrim medijumom za eventualno praćenje terapije parodontopatije i karcinoma.

## B3. Metode i plan istraživanja

U ovom istraživanju uključeno bi bilo najmanje 80 pacijenata koji su se javili na stomatološku polikliniku KCCG radi liječenja parodontopatije, uzrasta od 25 do 55 godina.Pacijenti bi bili podijeljeni na dvije grupe (40 pušača koji konzumiraju najmanje jednu kutiju cigareta u posljednje dvije godine i 40 nepušača,kao kontrolna grupa). Studija bi bila na dobrovoljnoj osnovi.Pacijentima bi bila objašnjena svrha studija i tražen njihov pismeni pristanak.

**Kriterijumi za uključivanje pacijenata u studiju bi bili:**

1. odsustvo hroničnih sistemskih oboljenja i komorbiditeta od značaja za parodontopatiju (kardiovaskularnih, endokrinih, gastrointestinalnih, oralnih i respiratornih oboljenja), kao i dugotrajna i svakodnevna konzumacija alkohola.
2. pušači koji konzumiraju najmanje 1 kutiju cigareta dnevno u proteklih 2 godine

**Kriterijumi za isključivanje ispitanika bi bili:**

1. antipsihotika,
2. antiholinergika i antihipertenzivnih lijekova.
3. hronična sistemska oboljenja (kardiovaskularna, endokrinih, gastrointestinalna, oralna i respiratorna oboljenja)
4. bivši pušači
5. pacijenti koji su imali tretman parodontopatije u proteklih 6 mjeseci

**Sakupljanje pljuvačke** bi se vršilo ispljuvavanjem u epruvetu veličine 25 x 100 ml. To bi bila nestimulirana pljuvačka. Nakon toga uzorci bi bili poslani na duboko smrzavanje do daljnjeg pregleda.

Za procjenu stanja parodonticijuma koristili bi se sledeći parametri:

1. CPITN (Community periodontal index of treatment needs),
2. Dubina periodontalnih džepova
3. Nivo pripojnog epitela
4. Indeks dentalnog plaka po Silness-Loe
5. Indeks krvarenja (Aniamo-Bay 1975)

Ovi parametri ispitivali bi se korišćenjem parodontalne sonde (UNC 15 HuFriedy, Chicago, IL, USA), CPITN sonda, stomatološkog ogledalca i pincete.

Planira se korišćenje sledećih tehnika za analizu salive:

**Određivanje koncentracije ukupnih proteina u salivi bicinoninskom kiselinom (BCA)**

Ova metoda je kvantitativna kolorimetrijska metoda i zasniva se na redukciji  $\text{Cu}^{2+}$  u  $\text{Cu}^{1+}$  proteinom u alkalnoj sredini. Ljubičasto obojeni proizvod reakcije koji se dobija u ovom testu apsorbira se na 570 nm, a apsorbanca raste (skoro) linearno sa povećanjem koncentracije proteina. U ovoj doktorskoj tezi će se koristiti kupovni test za određivanje koncentracije proteina (Pierce™ Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific), i izvodi se prema uputstvu proizvođača. Optička gustina se meri na 570 nm na aparatu VICTOR 3V (PerkinElmer, USA).

**Zimografsko određivanje aktivnosti enzima matriksnih metaloproteinaza**

Želatinozna aktivnost u uzorcima ukupne salive određivaće se pomoću SDS-PAGE zimografije. Uzorci se razdvajaju u 11% gelu koji je sadržao 1 mg/mL želatina, u neredukujućim uslovima. Uzorci ukupne pljuvačke se razblažuju puferom za uzorke bez 2-merkaptetanola zatim se nanose po 25 µg po bunaru. Nakon elektroforeze, gelovi se ispiraju dva puta po 15 min kako bi se uklonio SDS, a zatim u  $\text{dH}_2\text{O}$ . Po inkubaciji preko noći na 37

°C u reakcionom puferu (50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7), gelovi su bojeni rastvorom CBB-a 30 min i odbojavani u 30% metanolu sa 10% glacijalnom sirćetnom kiselinom. Proteazna aktivnost se uočava kao providna traka razloženog želatina na mestu lokalizacije žalatinaza u gelu. Aktivnost se određuje semikvantitativno denzitometrijskom analizom zimograma pomoću aparata ChemiDoc MP Imaging Systems (Bio-Rad) i programa ImageMaster TotalLab v2.01 (Amersham Biosciences).

### **Određivanje koncentracije karcinoembrionalnog antigena (CEA) u uzorcijma ukupne pljuvačke**

IRMA CEA (nstitut za primenu nuklearne energije – INEP, Beograd, Srbija) je dijagnostički komplet namenjen kvantitativnom određivanju CEA, standardizovan prema I IRP SZO 73/601. To je imunoradiometrijski test na čvrstoj fazi, u kome se koristi komplementaran par monoklonskih antitela specifičnih za različite epitope na molekulu CEA. U toku prve faze izvođenja testa, antitela imobilisana na dnu epruvete vezuju CEA iz ispitivanog uzorka ili standrada. Na tako stvoren imunokompleks vezuju se monoklonska antitela obeležena radioaktivnim izotopom joda <sup>125</sup>I i obrazuje se tročlani imunokompleks. Nevezane komponente se uklanjaju ispiranjem, a radioaktivnost epruveta koja potiče od vezanih obeleženih antitela u kompleksu se meri u gama brojaču. Izmerena radioaktivnost je direktno proporcionalna koncentraciji CEA u uzorku. U ovom testu biće analizirani nerazblaženi uzorci ukupne salive, kao i uzorci razblaženi u puferu za razblaživanje visokih koncentracija CEA

(1/10 i 1/100). Aparat koji bi se koristio je Wizard 1470 Automatic  $\gamma$ -counter (PerkinElmer, Inc., Wellesey, MA, USA)

**Obrada podataka** Dobijene vrijednosti CPITNa, dubine parodontalnih džepova, nivoa pripojnog epitela, indeksa dentalnog plaka, indeksa krvarenja kao i salivarnih parametara (ukupni proteini, karcinoembrionalni antigen i matriksne metaloproteinaze) biće opisani metodama deskriptivne statistike. U zavisnosti od njihove prirode biće korišćene mjere centralne tendencije (srednja vrijednost i medijana) i mjere varijabiliteta (standardna varijacija-SD, i raspon-rang-opseg) kao i frekvencije i procenti.

Za testiranje razlika u kvantitativnim parametrima između ispitivanih podgrupa biće korišćen t-test, Wilcoxonov test (za dvije varijable) i analiza varijanse (za više od dvije



varijable). Hi kvadrat i Fisherov egzaktni test biće korišćeni za ispitivanje razlika između podgrupa u kategornim parametrima.

Povezanost između pušackog statusa i parodontopatije kao zavisnih varijabli sa bio-markerima i drugim eventualnim prognostičkim varijablama biće ispitana sa generalizovanim linearnim modelom (GLM).

Korišćeni nivo statističke značajnosti biće  $\alpha=0.05$ .

#### **B4. Naučni doprinos**

S obzirom da je pušenje duvana široko rasprostranjena navika u svijetu ,rezultati ovog istraživanja dali bi doprinos boljem razumijevanju uticaja duvanskog dima na nastanak parodontopatije.Pošto pljuvačka odražava čitav spektar fizioloških i patoloških stanja u organizmu,dao bi se značaj salivi kao medijumu koji omogućava brzu dijagnostiku i praćenje zdravlja usne duplje.

#### **B5. Finansijska i organizaciona izvodljivost istraživanja**

Sredstva za realizaciju predložene disertacije biće obezbijedjena od strane kandidata i organizaciono je izvodljivo.

#### **Popis literature**

- 1.Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4 and 1/4-length fragments1995;. J Biol Chem 17:5872e6.
2. Anina Raitio et al. Levels of matrix metalloproteinase-2, -9 and -8 in the skin, serum and saliva of smokers and non-smoker 2005. Arch Dermatol Res.297(6):242-8.
- 3.Bachtiar E.W et al.Correlation between the extent of smoking,salivary protein profiles and dental caries in young adult smokers. SDJ 2020 <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2020.09.002>
- 4.Bergstrom J, Perber H. Tobacco use as a risk factor. 1994;J Periodonrtol, 65:545-550.
5. Bergström J. Eliasson S., Preber H. *Cigarette smoking* and periodontal bone loss. (1991). J Periodontol 62:242-246
6. Benowitz NL. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. 1996 EmiolRev.;18(2) 188-204.
- 7.Choi, D.H et al.. Effects of sub-antimicrobial dose doxycycline therapy on crevicular fluid MMP-8, and gingival tissue MMP-9, TIMP-1 and IL-6 levels in chronic periodontitis2004. J. Periodontal Res., 39, 20–26.
- 8.Dobrenić, M. (1979) Oralne bolesti. Zagreb: Jugoslavenska medicinska naklada
- 9.David A.et al. Effects of Nicotine on Proliferation and Extracellular Matrix Production of Human Gingival Fibroblasts In Vitro 1995 Dec J Periodontol. ;66(12) 2012.16 ;3;350-353

- 10.Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G,Gogly B. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva. 2003 J Periodontol;74:188e95.
- 11.Golubović S, Marović-Stojković V, Janković Lj. Immunohistochemical detection of carcinoembryonic antigen (CEA) in the epithelia of inflamed gingiva 1997 Archive of Oncology 5: 61' 4
- 12.Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. Acta Odontol Scand 2007;65:1-13.
- 13.Henskens Y.M.C. Dissertation. Salivary cystatins and their relation to periodontal inflammation 1994. Vrije Universitet,Amsterdam, Netherlands
- 14.Kenney EB,Kraal JH,Saxe SR,Joenes J.The effect of cigarette smoke on human oral polymorphonuclear leukocytes.1977.J Peiodontal Res12:227-34
- 15.Kolte, A., Kolte, R., Laddha, R., 2012. Effect of smoking on salivary composition and periodontal status. J. Indian. Soc. Periodontology. 16, 350–353.
- 16.Kumar, M.S et al.Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus 2006,. J. Periodontol. 77, 1803–1808.
- 17.MacFarlane GD, Herzberg MC, Wolff LF, Hardie NA. Refractory periodontitis associated with abnormal polymorphonuclear leukocyte phagocytosis and cigarette smoking.1992Nov J Periodontol.;63(11):90813.
- 18.Machuca G, Rosales I, Lacalle JR et al. Effects of cigarette smoking on periodontal status of healthy young adults. 2000;J Periodontol, 71:73-78.
- 19.Marcaccini, A.M et al.Circulating matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) and MMP-9 are increased in chronic periodontal disease and decrease after non-surgical periodontal therapy. 2009,Clin. Chim. Acta 409, 117–122.
- 20.Pavitra,V.A.et al.Salivary total protein levels and their correlation to dental caries. 2013 Int.J.Oral maxillofac.pathol.4,13-16
- 21.Ramalingam K.et al.Quantitative estimation of sodium,potassium and total protein in saliva of diabetic smokers and nonsmokers: 2013 A novel study .J.Nat.sci.biol.4,341-345
- 22.Ramseier, C.A et al. Identification of Pathogen and Host-Response Markers Correlated with Periodontal Disease. 2009, J. Periodontol. 80, 436–446.
- 23.Rezavandi K, Palmer RM, Odell EW et al. Expresion of Eselection and ICAM-1 in gingival tissues of smokers and non-smokers with periodontitis. 2001 J Oral Path and Med, 31:59-64.

24.Snežana Golubović.Žanka Bojić i sar. Salivary carcinoembryonic antigen as in inflammatory marker 2003.Jugoslav Med Biohem 22.207-211

25.Sorsa T., Tjaderhane L., Konttinen Y.T., Lauhio A., Salo T., Lee H.M., Golub L.M., Brown D.L., Mantyla P. Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. Ann. Med. 2006;38:306–321.

26.Soell N, Elkaim R, Tenenbaum H, Cathepsin C. Matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. J Dent Res 2002;81:174e8.

27.Staab HJ, Anderer FA, Brümmendorf T, Hornung A, Fischer R. Prognostic value of preoperative serum CEA level compared to clinical staging: II. Stomach cancer. Br J Cancer 1982;45(5):718–727.

28. Streckfus, Charles F. (Ed.), 2015. Advances in Salivary Diagnostics. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg

29.Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevicular fluid 2003;. Periodontol 2000 31: 77-104.

30.Zoubir F, Khan WN, Hammarström S. Carcinoembryonic antigen gene family members in submandibular salivary gland: demonstration of pregnancy-specific glycoproteins by cDNA cloning. 1990; Biochem Biophys Res Commun 169: 203-216.

#### **Mišljenje i prijedlog komisije**

Nakon uvida u priloženu dokumentaciju ,izlaganja kandidata i diskusije,Komisija je zaključila da:

- Predložena tema dokorskog istraživanja je originalna i inovativna, te u potpunosti zadovoljava nivo doktorske disertacije;
- Izloženi ciljevi postavljene hipoteze su jasno definisani;
- Metodologija i plan istraživanja su detaljno objašnjeni;
- Postoji značajan naučni doprinos u cilju boljeg razumijevanja uticaja duvanskog dima na nastanak parodontopatije i davanju značaja salivi kao medijumu koji omogućava brzu dijagnostiku i praćenje zdravlja usne duplje.
- U radu su ispunjene sve etičke norme istraživanja.

Uzimajući u obzir sve navedeno,Komisija je dala pozitivnu ocjenu o podobnosti teme doktorske teze,kandidata dr stom.Ognjena Kovačevića.

Komisija predlaže Vijeću Medicinskog fakulteta i senatu Univerziteta Crne Gore da prihvate ovaj izještaj i odobre nastavak rada na doktorskoj disertaciji.

**Prijedlog izmjene naslova**

Komisija je saglasna sa predloženim naslovom teme doktorske disertacije.

**Prijedlog promjene mentora i/ili imenovanje drugog mentora**

/

**Planirana odbrana doktorske disertacije**

Prvi kvartal 2023.godine

**Izdvojeno mišljenje**

/

**Napomena**

/

**ZAKLJUČAK**

Predložena tema po svom sadržaju <b>odgovara</b> nivou doktorskih studija	<u>DA</u>	NE
Tema je <b>originalan</b> naučno-istraživački rad koji odgovara međunarodnim kriterijumima kvaliteta disertacije	<u>DA</u>	NE
Kandidat <b>može</b> na osnovu sopstvenog akademskog kvaliteta i stečenog znanja da uz adekvatno mentorsko vođenje realizuje postavljeni cilj i dokaže hipoteze	<u>DA</u>	NE

**Komisija za ocjenu prijave doktorske disertacije**

Prof.dr Milica Martinović, Medicinski fakultet, Univerzitet Crne Gore, Crna Gora	
Prof.dr Miloš Hadzi Mihailović, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Srbija	
Doc. dr Mirjana Djuričković Medicinski fakultet, Univerzitet Crne Gore, Crna Gora	

U Podgorici,

DEKAN

06.12. 2021.godine



**PRILOG**

PITANJA KOMISIJE ZA OCJENU PODOBNOSTI DOKTORSKE TEZE I KANDIDATA	
Prof.dr Milica Martinović, Medicinski fakultet,Univerzitet Crne Gore,Crna Gora	Da li treba isključiti ispitanike koji uzimaju bilo koju vrstu antihipertenzivnih lijekova ili samo pojedinu vrstu antihipertenziva?
Prof.dr Miloš Hadzi Mihailović, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu,Srbija	
Doc. dr Mirjana Djuričković Medicinski fakultet,Univerzitet Crne Gore,Crna Gora	Gdje će se studija raditi i koliko će da finansijski košta?
(Titula, ime i prezime člana komisije)	
(Titula, ime i prezime člana komisije)	
PITANJA PUBLIKE DATA U PISANOJ FORMI	
(Ime i prezime)	
(Ime i prezime)	
(Ime i prezime)	
ZNAČAJNI KOMENTARI	

## PRIJAVA TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	dr Ognjen M. Kovačević spec.parodontologije i oralne medicine
Fakultet	Medicinski fakultet Podgorica
Studijski program	Stomatologija
Broj indeksa	41/06
Ime i prezime roditelja	Milan Kovačević
Datum i mjesto rođenja	7.03.1978. Podgorica Crna Gora
Adresa prebivališta	Ul.Vojislavljevića 18 Podgorica
Telefon	068 274 033
E-mail	kovacevicognjenkoca@gmail.com
BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA	
Obrazovanje	Specijalizirao parodontologiju i oranu medicinu 2018.god. na Stomatološkom fakultetu Univerziteta Beograd. Završio medicinski fakultet Univerziteta u Nišu odsjek stomatologija 2006.godine sa srednjom ocjenom 8,17 Akademske doktorske studije Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore 2006
Radno iskustvo	Saradnik u nastavi-Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore od 2018- Specijalista- Stomatološka poliklinika KCCG od 2014- Specijalizant- Klinika za parodontologiju i oranu medicinu Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu (2015 - 2018) Stomatolog- P.Z.U., "Koča Dent"(2009 - 2014 ) Stomatolog- J.Z.U.Dom zdravlja Podgorica od 2006 do 2007god.
Popis radova	1) Zbog čega "zdravi zubi" ispadaju? / Ognjen Kovačević. U: MEDICAL cg. - ISSN 1800-7708. - God. 3, br. 34 (5. februar 2012),str.62-63. 616.314.16-008.1 COBISS.CG-ID 20523536 2).Pušenje faktor rizika za loše oralno zdravlje / Ognjen Kovačević. U: MEDICAL cg. - ISSN 1800-7708. - God. 3, br. 35 (5. mart 2012),str.24-25. 616.31-089:613.84 COBISS.CG-ID 20487696 3)Posjeta stomatologu tokom trudnoće/Ognjen Kovačević <a href="https://issuu.com/medicalcg/docs/medical_cg_74/75">https://issuu.com/medicalcg/docs/medical_cg_74/75</a> Apr 24, 2012 4)Dijabetes–uticaj na oralno zdravlje <a href="https://issuu.com/medicalcg/docs/medical_125">https://issuu.com/medicalcg/docs/medical_125</a> str 40-41 Septembar6.2019

<b>NASLOV PREDLOŽENE TEME</b>	
Na službenom jeziku	<b>Analiza uticaja pušenja na molekulske markere parodontopatije u salivi.</b>
Na engleskom jeziku	Analysis of the influence of smoking on molecular markers of periodontitis in saliva.
<b>Objasnenje teme</b>	
<p>Duvanski dim sadrži oko 4000 različitih toksičnih supstanci od čega su 40 kancerogene. U kancerogene supstance spadaju benzpiralen, benzperilen, radioaktivni polonijum i druge. (8) Pušenje izaziva naviku sto prouzrokuje i druge zdravstvene probleme. Pušenje predstavlja jedan od glavnih faktora za nastanak parodontopatije. Parodontopatija je tri puta češća kod pušača nego kod nepušača bez obzira na nivo oralne higijene i ima težu kliničku sliku nego kod nepušača. (4,18) Utvrđeno je da efekat pušenja na parodontocijum kumulativan tako da negativne posledice na parodontocijum zavise od dužine pušenja i broja cigareta.</p> <p>Histološki je utvrđeno da pušači imaju manji broj krvnih sudova u gingivi u odnosu na nepušače, a takodje i manji stepen inflamacije gingive što može predstavljati problem kod mlađih ljudi jer se početni znaci parodontopatije mogu previdjeti. (23) Takodje kod pušača je prisutna i poremećena funkcija fibroblasta, što za posledicu dovodi do smanjene sinteze kolagena. (9) Pored toga kod pušača je povećana aktivnost osteoklasta koji su odgovorni za resorpciju i remodelaciju kosti. (5)</p> <p>Pušenje duvana povećava broj patogenih mikroorganizama u parodontocijumu i takodje smanjuje produkciju antitijela, smanjuje hemotaksu i fagocitozu neutrofila. (14,17) Istraživanja pokazuju da se nikotin absorbuje u oralna tkiva i nadjen je na površini korijena zuba. Najznačajnija i najveća količina nikotina detektovana je u serumu, salivi i gingivalnoj tečnosti. (6)</p> <p>Sastav pljuvačke je relativno slabo proučavan kod pušača. Pljuvačka kao zaštitna tečnost prva dolazi u kontakt sa duvanskim dimom. Jedan od najznačajnijih sastojaka pljuvačke su pljuvačni proteini. Proteini služe kao potencijalni biomarkeri za praćenje patoloških stanja tako da se pljuvačka može koristiti za sagledavanje oralnog zdravlja pojedinaca. (28)</p> <p>Mnogobrojni proteini pljuvačke imaju važnu antimikrobnu, lubrikantnu i probavnu funkciju. Salivarni proteini su uključeni u modulaciju kolonizacije mikroorganizama na zubima i oralnoj sluzokoži. Takodje vrše modulaciju koncentracije kalcijum fosfata što je bitno za održavanje integriteta zubnih tkiva i stvaranja kamenca u pljuvačnim žlijezdama i u usnoj duplji. Salivarni proteini učestvuju u formiranju stečene pelikule koja ima uticaj na kolonizaciju mikroorganizama na površini zuba. Ukupni proteini pljuvačke pokazuju raznoliku aktivnost koja pomaže u očuvanju integriteta oralnih tkiva i zaštitu od oralnih i spoljnih mikroorganizama koji izazivaju infekciju.</p> <p>Potencijalni biomarkeri parodontopatije su i matriksne metaloproteinaze. U ovoj studiji će se prije svega sagledavati želatinaze (MMP 2 i MMP 9) u salivi kod pušača i nepušača sa parodontopatijom.</p> <p>Matriksne metaloproteinaze (MMP) su porodica ekstracelularnih cink i kalcijum</p>	



zavisnih endopeptidaza zajedno sposobnih da razgrade sve komponente ekstracelularnog matriksa i zbog toga imaju značajnu ulogu u mnogim biološkim i patološkim procesima. Familija MMP kod ljudi broji 23 člana klasifikovanih u šest grupa i to kolagenaze (MMP-1, MMP-8, MMP-13), želatinaze (MMP-2, MMP-9), stromelizine (MMP-3, MMP-10), matrilizine (MMP-7, MMP-26, MMP-11), metaloproteinaze membranskog tipa (MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25), i ostale MMP (MMP-12, -19, -20, -21, -23, -27, -28)

U gingivalnom tkivu opisane su mnogobrojne matriksne metaloproteinaze kao što su MMP-2, MMP-7, MMP-17, a najpručavanija je MMP-8, MMP-9 i MMP-13 u tečnosti gingivalnog sulkusa. (7,16)

Matriksne metaloproteinaze i tkivni inhibitori matriks metaloproteinaza (TIMP) treba da budu u ravnoteži kako bi se odvijao fiziološki proces remodelacije parodontijuma. Svaka abnormalnost u odnosu između MMP i TIMP inicirat će nekontrolisanu destrukciju parodontalnog tkiva što dovodi do parodontopatije.

Fibroblasti iz periodontalnog ligamenta i ćelije gingive imaju značajnu ulogu u produkciji kolagenaza (MMP-1, -8, -13) dok neutrofili i makrofagi osim što proizvode kolagenaze proizvode i želatinaze (MMP-2 i MMP-9) koji su odgovorni za destrukciju parodontalnog tkiva.

Nivoi matriksnih proteinaza u tečnosti gingivalnog sulkusa, kod pacijenata sa parodontopatijom proučavani su u cilju dijagnostike i prognoze samog oboljenja. Studija od strane Ramseier i sar. (22) smatra da koncentracija MMP-8 i MMP-9 u salivi može da predvidi nastanak parodontopatije. Nivo MMP-9 u gingivalnoj tečnosti smatra se korisnim biomarkerom za praćenje parodontalnog oboljenja. U kliničkoj studiji od strane Marcaccini i sar. (19) dokazana je povećana aktivnost želatinaza i MMP-3, 8 i 9 u plazmi kod pacijenata sa hroničnom parodontopatijom dok je posle tri mjeseca, nakon kauzalne terapije nivo aktivnosti značajno opao.

MMP-9 ili želatinaza B primarno je nadjena u salivi i tečnosti gingivalnog sulkusa. Uključena je u procesima kao što je inflamacija, zarašćivanje rane i rast tumora. (25) Ova matriksna metaloproteinaza uključena je u razaranju kolagena tip 4 i nekolagenih komponenti ekstracelularnog matriksa.

MMP-9 smatra se značajnom proteinazom uključenom u resorpciju kosti. Smatra se da MMP-9 imaju značajnu ulogu u resorpciji alveolarne kosti uzrokovanu osteoklastima. MMP-9 stvara se iz polimorfonuklearnih leukocita, makrofaga i epitelnih ćelija. (12)

Povećan nivo MMP-2 je zabeležen u gingivalnoj tečnosti i gingivalnom tkivu kod osoba sa parodontopatijom. Matriksne metaloproteinaze 2 mogu razgraditi kolagen tipa 4, nekolagene strukture ekstracelularnog matriksa kao i nativni kolagen u gingivalnom tkivu. (29,1) Takođe MMP-2 utiču i na ćelijsku proliferaciju i njihovu apoptozu. One utiču i na aktivnost fibroblastnog faktora rasta-1 zbog toga imaju potencijal da moduliraju mitogenu i angiogenu aktivnost fibroblastnog faktora rasta. Ovo dovodi do zaključka da MMP-2 ne dovode samo do destrukcije parodontalnog tkiva već ima ulogu i u njegovoj reparaciji. (26,10) Glavni izvor MMP-2 u salivi su polimorfonuklearni leukociti. MMP-2 stvaraju se iz fibroblasta, endotelnih ćelija i osteoblasta. (12)

U ovoj studiji ispitaće i uticaj pušenja na karcinoembrionalni antigen u salivi kod osoba sa parodontopatijom.

Karcinoembrionalni antigen (CEA) je trans membranski glikoprotein koji učestvuje u adheziji ćelija. Izolovan je u debelom crijevu fetusa i adenokarcinomu debelog crijeva. Kao i kod ostalih tumor markera njegova ekspresija raste s povećanjem mase tumora. Osim kod kolonorektalnog karcinoma njegova koncentracija raste i kod pacijenata sa karcinomima

drugih organa jetre, pluća, dojki, želuca, bubrega, jajnika, prostate kao i kod benignim stanjima kao što su hronične plućne bolesti, zapaljenske bolesti crijeva, ciroza, benigna hipertrofija prostate.

Takodje je otkriveno prisustvo CEA i CEA srodnih molekula u gingivalnom tkivu, submandibularnim žlijezdama i salivi. (30,11) Nastanak parodontopatije je složen proces. Smatra se da su bakterije odgovorne za nastanak parodontalnog oboljenja. Bakterije oslobadjaju razne proteolitičke enzime i s tim postižu imunološke ćelije da stvaraju enzime koji razgrađuju parodontalno tkivo. (13) Kako je CEA uključen u procesu ćelijske adhezije uključujući i prepoznavanje bakterija, predpostavlja se da ima važnu ulogu u održavanju strukture i funkcije oralne sluzokože kao i da je uključen u patološke procese u parodontocijumu. Dokazano je da je koncentracija CEA u salivi u korelaciji sa težinom kliničke slike parodontopatije. Najniža koncentracija salivarnog CEA je nadjena kog zdravog parodontocijuma a najveća kod ucero-nekrozne parodontopatije. Nakon terapije metronidazolom ucero-nekrozne parodontopatije zapaža se značajno sniženje salivarnog CEA antigena. (24) Ovi rezultati upućuju da salivarni CEA može biti potencijalni marker parodontopatije i biti koristan za dijagnozu i praćenje pacijenata sa parodontopatijom.

#### Pregled istraživanja

Tačan mehanizam duvanskog dima na parodontocijum još nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da je pušenje predstavlja veliki faktor rizika za nastanak i razvoj parodontalnog oboljenja. Nekoliko autora je proučavalo proteinski sastav salive kod pušača. Kolte i sar. (15) našli su da je koncentracija proteina u salivi smanjena kod pušača u odnosu na nepušače, smatrajući da je to rezultat dejstva nikotina na simpatički nervni sistem što rezultira smanjenom produkcijom salive i njenih komponenti. Drugi autori Pavitra i sar. (20), Ramalingam i sar. (21) smatraju da je niža koncentracija proteina u salivi kod pušača posledica hemijskog sastava duvanskog dima koji djeluje na kвалitativni i kvantitativni sastav pljuvačke.

Bachtar E.W i sar. (3) u svome radu zaključuju da je koncentracija ukupnih proteina u salivi niža kod pušača nego kod nepušača i da postoji razlika u proteinskom profilu kod pušača u odnosu na nepušače.

Nivoi matriksnih metaloproteinaz, posebno MMP-2 i MMP-9 u salivi kod pušača i ne pušača sa parodontopatijom nedovoljno su istraženi. U jednom radu Anina Raitio i sar. (2) napominje se da je nivo ukupnih MMP-9 u salivi značajno niži kod pušača u odnosu na nepušače. Međutim ne navodi se parodontalni status. Nivo MMP-2 u salivi kod pušača i ne pušača sa parodontopatijom još nije istažen.

Uticao pušenja na salivarni karcinoembrionalni antigen kao potencijalni biomarker parodontopatije još nije proučavan. Rad od strane Snežana Golubović, Žanka Bojić i sar. (24) koji je ispitivao koncentraciju karcinoembrionalnog antigena u salivi i serumu zdravih osoba i osoba sa parodontopatijom, ukazuje da je statistički značajno povećana koncentracija salivarnog karcinoembrionalnog antigena (CEA) kod osoba sa parodontopatijom u odnosu na zdrave osobe, što ukazuje da je CEA potencijalni marker parodontopatije.

### Cilj i hipoteze

**Ciljevi** ovog istraživanja bili bi da utvrdimo:

- da li pušenje ima uticaj na klinički stadijum parodontopatije
- da li postoji razlika u dubini parodontalnih depova i nivoa pripojnog epitela (Npe) između pušača i nepušača
- da li postoji razlika u indeksu krvarenja gingive između pušača i nepušača
- da li postoji korelacija između kliničkih stadijuma parodontopatije i različitih parametara u pljuvački (ukupni proteini i karcinoembrionalni antigen (CEA)) kod pušača i nepušača
- da li postoji korelacija između pušenja i kliničkih stadijuma parodontopatije u odnosu na nivo matriksnih metaloproteinaza, posebno gelatinaza (MMP-2 i MMP-9)

### Hipoteze

1. Kod pušača je prisutna teža klinička slika parodontopatije nego kod nepušača
2. Pušenje utiče na proteinski sastav pljuvačke, što utiče na odbrambene mogućnosti parodontocijuma
3. Pušenje utiče na enzimsku aktivnost matriksnih metaloproteinaza
4. Pljuvačka je dobar medijum za određivanje stanja parodontocijuma, njen sastav tj. utvrđivanje potencijalnih molekularnih markera parodontalne inflamacije što može biti korisno za određivanje plana liječenja parodontopatije i poboljšanje oralnog zdravlja posebno kod pušača.
5. Kod pušača se očekuje povećana koncentracija karcinoembrionalnog antigena u salivi što se može povezati sa promjenama u parodontocijumu i većim rizikom za nastanak karcinoma kod pušača u odnosu na nepušače što bi salivu činilo dobrim medijumom za eventualno praćenje terapije parodontopatije i karcinoma.

### Materijali, metode i plan istraživanja

U ovom istraživanju uključeno bi bilo najmanje 80 pacijenata koji su se javili na stomatološku polikliniku KCCG radi liječenja parodontopatije, uzrasta od 25 do 55 godina. Pacijenti bi bili podijeljeni na dvije grupe (40 pušača koji konzumiraju najmanje jednu kutiju cigareta u posljednje dvije godine i 40 nepušača, kao kontrolna grupa). Studija bi bila na dobrovoljnoj osnovi. Pacijentima bi bila objašnjena svrha studija i tražen njihov pismeni pristanak.

### Kriterijumi za uključivanje pacijenata u studiju bi bili:

1. odsustvo hroničnih sistemskih oboljenja i komorbiditeta od značaja za parodontopatiju (kardiovaskularnih, endokrinih, gastrointestinalnih, oralnih i respiratornih oboljenja), kao i dugotrajna i svakodnevna konzumacija alkohola.
2. pušači koji konzumiraju najmanje 1 kutiju cigareta dnevno u proteklih 2 godine

### Kriterijumi za isključivanje ispitanika bi bili:

1. antipsihotika,
2. antiholinergika i antihipertenzivnih lijekova.
3. hronična sistemska oboljenja (kardiovaskularna, endokrinih, gastrointestinalna, oralna i respiratorna oboljenja)
4. bivši pušači
5. pacijenti koji su imali tretman parodontopatije u proteklih 6 mjeseci

**Sakupljanje pljuvačke** bi se vršilo ispljuvavanjem u epruvetu veličine 25 x 100ml. To bi bila nestimulisana pljuvačka. Nakon toga uzorci bi bili poslani na duboko smrzavanje do daljeg pregleda.

Za procjenu stanja parodontijuma koristili bi se sledeći parametri:

1. CPITN (Community periodontal index of treatment needs),
2. Dubina periodontalnih džepova
3. Nivo pripojnog epitela
4. Indeks dentalnog plaka po Silness-Loe
5. Indeks krvarenja (Aniamo-Bay 1975)

Ovi parametri ispitivali bi se korišćenjem parodontalne sonde (UNC 15 HuFriedy, Chicago, IL, USA), CPITN sonda, stomatološkog ogledalca i pincete.

Planira se korišćenje sledećih tehnikaza analizu salive:

#### **Određivanje koncentracije ukupnih proteina u salivi bicinoninskom kiselinom (BCA)**

Ova metoda je kvantitativna kolorimetrijska metoda i zasniva se na redukciji  $\text{Cu}^{2+}$  u  $\text{Cu}^{1+}$  proteinom u alkalnoj sredini. Ljubičasto obojeni proizvod reakcije koji se dobija u ovom testu apsorbuje se na 570 nm, a apsorbanca raste (skoro) linearno sa povećanjem koncentracije proteina. U ovoj doktorskoj tezi će se koristiti kupovni test za određivanje koncentracije proteina (Pierce<sup>TM</sup> Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific), i izvodi se prema uputstvu proizvođača. Optička gustina se mjeri na 570 nm na aparatu VICTOR 3V (PerkinElmer, USA).

#### **Zimografsko određivanje ektivnosti enzima matriksnih metaloproteinaza**

Želatinozna aktivnost u uzorcima ukupne salive određivaće se pomoću SDS-PAG zimografije. Uzorci se razdvajaju u 11% gelu koji je sadržao 1 mg-mL želatina, u neredukujućim uslovima. Uzorci ukupne pljuvačke se razblažuju puferom za uzorke bez 2-merkaptetanola zatim se nanose po 25  $\mu\text{g}$  po bunaru. Nakon elektroforeze, gelovi se ispiraju dva puta po 15 min kako bi se uklonio SDS, a zatim u  $\text{dH}_2\text{O}$ . Po inkubaciji preko noći na 37  $^{\circ}\text{C}$  u reakcionom puferu (50 mM Tris-HCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7), gelovi su bojeni rastvorom CBB-a 30 min i odbojavani u 30% metanolu sa 10% glacijalnom sirćetnom kiselinom. Proteazna aktivnost se uočava kao providna traka razloženog želatina na mestu lokalizacije žalatinaza u gelu. Aktivnost se određuje semikvantitativno denzitometrijskom analizom zimograma pomoću aparata ChemiDoc MP Imaging Systems (Bio-Rad) i programa ImageMaster TotalLab v2.01 (Amersham Biosciences).

**Određivanje koncentracije karcinoembrionalnog antigena (CEA) u uzorcijma ukupne pljuvačke**

IRMA CEA (institut za primenu nuklearne energije – INEP, Beograd, Srbija) je dijagnostički komplet namenjen kvantitativnom određivanju CEA, standardizovan prema I IRP SZO 73/601. To je imunoradiometrijski test na čvrstoj fazi, u kome se koristi komplementaran par monoklonskih antitela specifičnih za različite epitope na molekulu CEA. U toku prve faze izvođenja testa, antitela imobilisana na dnu epruvete vezuju CEA iz ispitivanog uzorka ili standarda. Na tako stvoren imunokompleks vezuju se monoklonska antitela obeležena radioaktivnim izotopom joda  $^{125}\text{I}$  i obrazuje se tročlani imunokompleks. Nevezane komponente se uklanjaju ispiranjem, a radioaktivnost epruveta koja potiče od vezanih obeleženih antitela u kompleksu se meri u gama brojaču. Izmerena radioaktivnost je direktno proporcionalna koncentraciji CEA u uzorku. U ovom testu biće analizirani nerazblaženi uzorci ukupne salive, kao i uzorci razblaženi u puferu za razblaživanje visokih koncentracija CEA

(1/10 i 1/100). Aparat koji bi se koristio je Wizard 1470 Automatic  $\gamma$ -counter (PerkinElmer, Inc., Wellesey, MA, USA)

**Obrada podataka** Dobijene vrijednosti CPITNa, dubine parodontalnih džepova, nivoa pripojnog epitela, indeksa dentalnog plaka, indeksa krvarenja kao i salivarnih parametara (ukupni proteini, karcinoembrionalni antigen i matriksne metaloproteinaze) biće opisani metodama deskriptivne statistike. U zavisnosti od njihove prirode biće korišćene mjere centralne tendencije (srednja vrijednost i medijana) i mjere varijabiliteta (standardna varijacija-SD, i raspon-rang-opseg) kao i frekvencije i procenti.

Za testiranje razlika u kvantitativnim parametrima između ispitivanih podgrupa biće korišćen t-test, Wilcoxonov test (za dvije varijable) i analiza varijanse (za više od dvije varijable). Hi kvadrat i Fisherov egzaktni test biće korišćeni za ispitivanje razlika između podgrupa u kategorijalnim parametrima.

Povezanost između pušackog statusa i parodontopatije kao zavisnih varijabli sa biomarkerima i drugim eventualnim prognostičkim varijablama biće ispitana sa generalizovanim linearnim modelom (GLM).

Korišćeni nivo statističke značajnosti biće  $\alpha=0.05$ .

**Očekivani naučni doprinos**

S obzirom da je pušenje duvana široko rasprostranjena navika u svijetu ,rezultati ovog istraživanja dali bi doprinos boljem razumijevanju uticaja duvanskog dima na nastanak parodontopatije.Pošto pljuvačka odražava čitav spektar fizioloških i patoloških stanja u organizmu,dao bi se značaj salivi kao medijumu koji omogućava brzu dijagnostiku i praćenje zdravlja usne duplje.

**Spisak objavljenih radova kandidata**
**Popis literature**

- 1.Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4 and 1/4-length fragments1995;. J Biol Chem 17:5872e6.
2. Anina Raitio et al. Levels of matrix metalloproteinase-2, -9 and -8 in the skin, serum and saliva of smokers and non-smoker 2005. Arch Dermatol Res.297(6):242-8.
- 3.Bachtiar E.W et al.Correlation between the extent of smoking,salivary protein profiles and dental caries in young adult smokers. SDJ 2020 <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2020.09.002>
- 4.Bergstrom J, Perber H. Tobacco use as a risk factor. 1994;J Periodontol, 65:545-550.
5. Bergström J. Eliasson S., Preber H. Cigarette smoking and periodontal bone loss. (1991). J Periodontol 62:242-246
6. Benowitz NL. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. 1996 EmiolRev.;18(2) 188-204.
- 7.Choi, D.H et al.. Effects of sub-antimicrobial dose doxycycline therapy on crevicular fluid MMP-8, and gingival tissue MMP-9, TIMP-1 and IL-6 levels in chronic periodontitis2004. J. Periodontal Res., 39, 20–26.
- 8.Dobrenić, M. (1979) Oralne bolesti. Zagreb: Jugoslavenska medicinska naklada
- 9.David A.et al. Effects of Nicotine on Proliferation and Extracellular Matrix Production of Human Gingival Fibroblasts In Vitro 1995 Dec J Periodontol. ;66(12) 2012.16 ;3:350-353
- 10.Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G,Gogly B. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva. 2003 J Periodontol;74:188e95.
- 11.Golubović S, Marović-Stojković V, Janković Lj. Immunohistochemical detection of carcinoembryonic antigen (CEA) in the epithelia of inflamed gingiva 1997 Archive of Oncology 5: 61' 4
- 12.Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. Acta Odontol Scand 2007;65:1-13.

- 13.Henskens Y.M.C. Dissertation. Salivary cystatins and their relation to periodontal inflammation 1994. Vrije Universitet,Amsterdam, Netherlands
- 14.Kenney EB,Kraal JH,Saxe SR,Joenes J.The effect of cigarette smoke on human oral polymorphonuclear leukocytes.1977.J Peiodontal Res12:227-34
- 15.Kolte, A., Kolte, R., Laddha, R., 2012. Effect of smoking on salivary composition and periodontal status. J. Indian. Soc. Periodontology. 16, 350–353.
- 16.Kumar, M.S et al.Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus 2006,. J. Periodontol. 77, 1803–1808.
- 17.MacFarlane GD, Herzberg MC, Wolff LF, Hardie NA. Refractory periodontitis associated with abnormal polymorphonuclear leukocyte phagocytosis and cigarette smoking.1992Nov J Periodontol.;63(11):90813.
- 18.Machuca G, Rosales I, Lacalle JR et al. Effects of cigarette smoking on periodontal status of healthy young adults. 2000;J Periodontol, 71:73-78.
- 19.Marcaccini, A.M et al.Circulating matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) and MMP-9 are increased in chronic periodontal disease and decrease after non-surgical periodontal therapy. 2009,Clin. Chim. Acta 409, 117–122.
- 20.Pavitra,V.A.et al.Salivary total protein levels and their correlation to dental caries. 2013 Int.J.Oral maxillofac.pathol.4,13-16
- 21.Ramalingam K.et al.Quantitative estimation of sodium,potassium and total protein in saliva of diabetic smokers and nonsmokers: 2013 A novel study .J.Nat.sci.biol.4,341-345
- 22.Ramseier, C.A et al. Identification of Pathogen and Host-Response Markers Correlated with Periodontal Disease. 2009, J. Periodontol. 80, 436–446.
- 23.Rezavandi K, Palmer RM, Odell EW et al. Expresion of Eselection and ICAM-1 in gingival tissues of smokers and non-smokers with periodontitis. 2001 J Oral Path and Med, 31:59-64.
- 24.Snežana Golubović.Žanka Bojić i sar. Salivary carcinoembryonic antigen as in inflammatory marker 2003.Jugoslav Med Biohem 22.207-211
- 25.Sorsa T., Tjaderhane L., Kontinen Y.T., Lauhio A., Salo T., Lee H.M., Golub L.M., Brown D.L., Mantyla P. Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. Ann. Med. 2006;38:306–321.
- 26.Soell N, Elkaim R, Tenenbaum H, Cathepsin C. Matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. J Dent Res 2002;81:174e8.

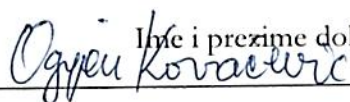
27. Staab HJ, Anderer FA, Brümmendorf T, Hornung A, Fischer R. Prognostic value of preoperative serum CEA level compared to clinical staging: II. Stomach cancer. *Br J Cancer* 1982;45(5):718-727.

28. Streckfus, Charles F. (Ed.), 2015. *Advances in Salivary Diagnostics*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg

29. Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevicular fluid 2003;. *Periodontol* 2000 31: 77-104.

30. Zoubir F, Khan WN, Hammarström S. Carcinoembryonic antigen gene family members in submandibular salivary gland: demonstration of pregnancy-specific glycoproteins by cDNA cloning. 1990; *Biochem Biophys Res Commun* 169: 203-216.



SAGLASNOST PREDLOŽENOG/ IH MENTORA I DOKTORANDA SA PRIJAVOM		
Odgovorno potvrđujem da sam saglasan sa temom koja se prijavljuje.		
Prvi mentor	Prof.dr Miloš Hadži Mihailović	<i>Miloš Hadži Mihailović</i>
Drugi mentor		
Doktorand	dr Ognjen Kovačević	<i>Ognjen Kovačević</i>
IZJAVA		
Odgovorno izjavljujem da doktorsku disertaciju sa istom temom nisam prijavio/la ni na jednom drugom fakultetu.		
U Podgorici,		
		 <small>Ime i prezime doktoranda</small>

Na osnovu člana 33 Zakona o upravnom postupku ("Službeni list CG", br. 56/14, 20/15, 40/16 i 37/17), člana 115 Zakona o visokom obrazovanju ("Službeni list CG", br. 44/14, 52/14, 47/15, 40/16, 42/17, 71/17, 55/18, 3/19, 17/19, 47/19, 72/19, 74/20 104/21) i službene evidencije, a po zahtjevu studenta Kovačević Milan Ognjen, izdaje se

## UVJERENJE O POLOŽENIM ISPITIMA

Student **Kovačević Milan Ognjen**, rođen **07-03-1978** godine u mjestu **Podgorica**, opština **Podgorica**, Republika **Crna Gora**, upisan je studijske **2006/2007** godine, u **I** godinu studija, kao student koji se **samofinansira** na **doktorske akademske studije**, studijski program **STOMATOLOGIJA**, koji realizuje **MEDICINSKI FAKULTET - Podgorica** Univerziteta Crne Gore u trajanju od **3 (tri)** godine sa obimom **180** ECTS kredita.

Student je položio ispite iz sljedećih predmeta:

Redni broj	Semestar	Naziv predmeta	Ocjena	Uspjeh	Broj ECTS kredita
1.	1	BIOSTATISTIKA	"D"	(zadovoljavajući)	10.00
2.	1	MEDICINSKA INFORMATIKA	"E"	(dovoljan)	10.00
3.	1	METODOLOGIJA NAUČNOG ISTRAŽIVANJA	"D"	(zadovoljavajući)	10.00
4.	2	ANESTEZIJA U STOMATOLOGIJI	"B"	(vrlodobar)	10.00
5.	2	ESTETIKA U STOMATOLOGIJI	"A"	(odličan)	10.00

Zaključno sa rednim brojem **5**.

Ostvareni uspjeh u toku dosadašnjih studija je:

- srednja ocjena položenih ispita **"C"** (**7.80**)
- ukupan broj osvojenih ECTS kredita **50.00** ili **83.33%**
- indeks uspjeha **6.50**.

*Uvjerjenje se izdaje na osnovu službene evidencije, a u svrhu ostvarivanja prava na: (dječji dodatak, porodičnu penziju, invalidski dodatak, zdravstvenu legitimaciju, povlašćenu vožnju za gradski saobraćaj, studentski dom, studentski kredit, stipendiju, regulisanje vojne obaveze i slično).*

Broj:  
Podgorica, 07.12.2021 godine



PROSEKRETAR  
*[Handwritten signature]*