

Одлуком Наставно-научног вијећа Медицинског факултета у Фочи, Универзитета у Источном Сарајеву, број 01-3-143 од 16.03.2023.године, именована је Комисија за оцјену и одбрану урађене докторске дисертације кандидата Радановић др Марине под насловом " Фенотипске и функционалне карактеристике мензехималних стромалних матичних ћелија изолованих из здравог и инфламираног ткива гингиве "

(у даљем тексту: Комисија)¹ у сљедећем саставу:

1. Проф. др Смиљка Цицмил, ванредни професор, ужа научна област Стоматологија, орална хирургија и медицина, Медицински факултет у Фочи, предсједник Комисије.
2. Проф. др Дејан Марковић, редовни професор, ужа научна област Клиничке стоматолошке науке, Стоматолошки факултет универзитета у Београду, члан Комисије.
3. Доц. др Душан Михајловић, доцент, ужа научна област Медицинска хемија, Медицински факултет у Фочи, УИС, члан Комисије.

Комисија је прегледала и оцијенила докторску дисертацију и о томе подноси Наставно-научном вијећу Медицинског факултета у Фочи, Универзитета у Источном Сарајеву следећи

ИЗВЈЕШТАЈ **о оцјени урађене докторске дисертације**

- | |
|--|
| 1. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области |
|--|

<p>Урађена докторска дисертација, којом су испитиване фенотипске и функционалне карактеристике мензехималних стромалних матичних ћелија изолованих из здравог и инфламираног ткива гингиве, обрађује актуелну проблематику која је са научног аспекта веома значајна. Пародонтопатија представља болест савременог доба, која доводи до губитка зуба услед дегенерације пародонцијума, што знатно нарушава орално здравље, као и укупни квалитет живота. Досадашња терапија пародонтопатије базира се на уклањању бактеријског биофилма и контроли упалног подручја али без успјешног ефекта на поновно успостављање првобитне анатомије пародонталног ткива. Због наведених недостатака у досадашњој терапији велики број студија посвећен је истраживању нових метода лијечења, укључујући и примјену мензехимских стромалних матичних ћелија као посебан вид биолошке терапије. Ове ћелије привлаче посебну пажњу због њихових познатих способности самообнављања, диференцијације у различите ћелије мезенхимског поријекла зуба и околних зубних структура, те клонотипских карактеристика. Због наведених својстава ове ћелије би могле имати позитиван утицај на регенерацију оштећених структура потпорног апарата зуба. До сада су MSC изоловане из различитих денталних ткива као што су периодонтални лигамент, зубна пулпа, млијечни зуби, зубни фоликул и апикална папила. Због компликоване процедуре при узимању биопсије из</p>

¹Комисија има најмање три члана од којих најмање један није у радном односу на Универзитету

наведених структура пажња је усмјерена ка MSC из гингивалног ткива (GMSC). Показано је да извјесне популације MSC могу имати про- инфламаторне особине што би се могло претпоставити и за GMSC у току пародонтопатије. Ову функционалну трансформацију GMSC из анти- инфламаторног у про- инфламаторни тип могу покренути микроорганизми из денталног плака, као што је *Porphyromonas gingivalis*. Међутим, наведене чињенице не дају одговор на питање колико се ова својства GMSC мијењају под утицајем бактерија из денталног плака, њихових продуката и других про-инфламацијских стимулуса. Кандидаткиња је у свом истраживању јасно показала да су GMSC изоловане из инфламираног ткива слободне гингиве у току пародонтопатије (P-GMSC) већ на неки начин припремљене на јачи одговор према *Porphyromonas gingivalis* у односу на GMSC успостављене из здраве гингиве (H-GMSC). Сви приказани резултати указују на то да P-GMSC дуго задржавају своја биолошка својства у култури и која бивају додатно модификована под бактеријским утицајем. Међутим, потребне су додатне студије да би се ријешило којим механизмима *Porphyromonas gingivalis* мијења функционална својства оба типа GMSC посебно са аспекта трансформација ових ћелија од имуносупресивног типа у проинфламаторни фенотип и функције.

2. Оцјену да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области

Резултати овог рада су производ оригиналних *ex vivo* истраживања на хуманом материјалу. У циљу изолације, пропагације, испитивања фенотипских и функционалних карактеристика GMSC коришћене су прихватљиве и савремене лабораторијске методе. Оригиналноост дисертације се огледа што су по први пут на компаративан начин испитиване и поређене GMSC из здраве и пародонтопатијом захваћене слободне гингиве и њихов анти-инфламацијски, имуносупресивни и регенеративни потенцијал под утицајем *Porphyromonas gingivalis* на основу експресије великог броја биолошки значајних гена. Оваква испитивања до сада нису публикована што ову дисертацију чини потпуно оригиналном.

3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

Кандидаткиња је овим истраживањем добила више значајних резултата. Осим доказивања да GMSC имају све морфолошке, фенотипске и диференцијационе карактеристике MSC, P-GMSC имају већи пролиферативни капацитет и већу способност диференцијације у остеобласте у односу на H-GMSC. Кандидаткиња је идентификовала GMSC у ткиву гингиве и показала да су перицити доминантно њихов резервоар *in situ*. Показала је да P-GMSC имају мањи имуносупресивни потенцијал и мањи анти-инфламацијски ефекат у односу на H-GMSC. Сва ова својства P-GMSC су додатно потенцирана у присуству *Porphyromonas gingivalis* што је поткрепљено анализом експресије великог броја гена.

4. Оцјену о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему (по поглављима)²

²Испуњеност обима и квалитета у односу на пријављену тему, нарочито, треба да садржи: аналитички и системски прилаз у оцјењивању истраживачког постављеног предмета, циља и задатака у

Увод

У поглављу увод дат је приказ досадашњих сазнања из литературе која су непосредно везана за предмет докторске дисертације. Кандидаткиња је јасно дефинисала патолошке процесе у току пародонтопатије, улогу имунских механизма у патогенези болести, најзначајније облике терапије пародонтопатије, као и принцип дјеловања терапије базиране на употреби матичних ћелија. Такође, кандидаткиња је навела фенотипске и функционалне карактеристике MSC које у овом моменту признаје научна заједница, механизме којима ове ћелије дјелују у инфламираној микросредини, као и протоколе за њихову диференцијацију *in vitro*. На крају овог поглавља јасно је истакнут научни проблем који је везан за непознанице о MSC у инфламираном ткиву гингиве и њихова потенцијална улога у пародонтопатији што је била основа да се одредили за конкретно истраживање. Пошто до сада није јасно описано да ли у току пародонтопатије GMSC поред познатих антиинфламаторних особина, могу имати и про-инфламаторна својства и како се та својства мјењају под утицајем бактерија из денталног плака, њихових продуката и других про-инфламацијских стимулуса, то је било довољно за поставку хипотеза и адекватних циљева истраживања.

Циљеви

У поглављу циљеви истраживања, који су били у својству провјере хипотезе да се P-GMSC и H-GMSC разликују по бројним биолошким својствима и различитим одговором на *Porphyromonas gingivalis*, кандидаткиња је јасно поставила конкретне циљеве истраживања да: изолује, испита и упореди фенотип, способност за самообнављање и потенцијал за диференцијацију GMSC изолованих из здравог и пародонтопатијом захваћеног гингивалног ткива у култури; одреди ткивну локализацију, фенотип и бројност GMSC у здравом и инфламираном ткиву гингиве; испита и упореди потенцијал раста и пролиферације GMSC изолованих из здравог и инфламираног гингивалног ткива у култури; испита и упоредити утицај *Porphyromonas gingivalis*-а на продукцију цитокина, хемокина и других биомолекула (IL-6, IL-8, IL-27, IL-1P α , IL-10, IFN- γ , TGF- β , HGF, MCP-1, CCL3, CHCL12, HIF-1 α , IGFBP-4, GRO, SDF-1, TIMP-2, LAP, RANTES, MMP-3, OPG,IDO, TLR2, TLR4) од стране GMSC изолованих из здраве и инфламиране гингиве на нивоу протеина или генске експресије.

Материјал и методе

Кандидаткиња је у истраживању користила најсавременију методологију из области култивације GMSC, њихове диференцијације, пролиферације и испитивање фенотипских својстава модерним имунолошким техникама као што су проточна цитометрија, имунохистохемија и конфокална микроскопија. Највећи дио методологије се односио на примену ланчане реакције полимеразе у реалном времену (RT-PCR). Такође треба споменути функционалне имунолошке есеје, и адекватне статистичке методе. За истраживање је обезбјеђен пристанак донора и одобрење од надлежног Етичког комитета.

Резултати

Резултати су јасно приказани у виду графикана, правилно обрађени применом адекватних статистичких метода и јасно интерпретирани. Показано је да GMSC показују типичну фибробластоидну морфологију, адхерентност за пластику као и експресију основних маркера (CD90, CD73 и CD105), што је у сагласности са минималним критеријумима за њихову класификацију. Поред наведеног, ове ћелије су имале способност остеогене, хондрогене и адипогене диференцијације. GMSC су показале и инхибиторни ефекат на пролиферацију лимфоцита, који је био израженији код H-GMSC у односу на P-GMSC. Надаље, анализирани су концентрације интерлеукина у ћелијским културама које су третиране са *Porphyromonas gingivalis* током 24 часа. Показано је да су обје врсте ћелијских линија продуковале знатно веће концентрације IL-6 и IL-8 након третмана са овом бактеријом у односу на базалне вриједности. Одређени су и гени повезани са инфламацијом, гдје је третман са *Porphyromonas gingivalis* довео до пораста експресије TLR-2 у P-GMSC. *Porphyromonas gingivalis* је повећао експресију IL-6, MCP-1 и GRO- α у обје линије H-GMSC и P-GMSC. IL-8 и RANTES су били повећани само у P-GMSC. Анализирани су и гени повезани са имуномодулацијом, гдје је експресија IFN- γ и IP-10 била значајно већа у P-GMSC, у поређењу са H-GMSC, за разлику од експресије IDO-1 који је био смањен. Третман са *Porphyromonas gingivalis* није промјенио експресију TGF- β . Међутим, експресија LAP је била већа у неким линијама P-GMSC. Поред наведеног, одређена је и експресија гена удружених са ткивном регенерацијом. Анализирано је укупно седам гена повезаних са регенерацијом ткива у GMSC након третмана са *P. gingivalis*om. Од њих, само је HGF био смањен у H-GMSC како на базалном нивоу тако и након третмана са *P. gingivalis*om.

Дискусија

Кандидаткиња је кроз цитирање великог броја референци на веома компетентан начин анализирала сваки добијени резултат, наводећи веома често и сва ограничења студије. Посебно је анализирала експресију маркера GMSC у ткиву и немогућност тврђења да су само перицити извор GMSC у ткиву због непостојања јединственог маркера ових ћелија. Сваки ген је детаљно анализиран са аспекта експресије и функције, посебно када су у питању GMSC . Улози *Porphyromonas gingivalis* у патогенези пародонтопатије је дата посебна пажња, а потпуно нови резултати како ова бактерија мења генску експресију у GMSC дато је не само објашњење кроз аналогне студије већ су изнете и неке сопствене хипотезе што дискусији даје додатну вриједност.

Закључци

У овом поглављу су јасно и таксативно наведени најважнији закључци докторске дисертације који престављају концизне одговоре на постављене циљеве истраживања. Закључци јасно показују да се GMSC из здраве и пародонтопатијом захваћеном гингивом разликују по многим својствима и да про-инфламаторно окружење у ткиву мијења функционална својства GMSC које дуго таква својства задржавају у култури. Због тога су ове ћелије и подложне да другачије реагују на *Porphyromonas gingivalis*.

Литература

У раду је цитирано 130 библиографских јединица из ове области, правилно наведених у тексту и поглављу Литература. Више од 10% референци припадају онима објављених у последњих 5 година.

На основу наведеног, докторска теза је по квалитету, обиму и сложености испунила циљеве и задатке постављене у пријави тезе.

5. Научне резултате докторске дисертације

Испитивање разлика између GMSC из здраве и инфламиране гингиве и њиховог одговора на нивоу више од 20 гена под утицајем *Porphyromonas gingivalis* који су укључени у инфламацију, имунски одговор, регенерацију и репарацију ткива представља оригинални научни резултат кандидаткиње.

6. Примјењивост и корисност резултата у теорији и пракси³

Према подацима Свјетске здравствене организације, пародонтопатија представља најчешће обољење у области стоматологије и водећи је узрок губитка зуба. Статистички подаци се разликују у зависности од регионалне распрострањености и најчешће се крећу од 5%- 15% када је у питању тешка форма пародонтопатије. Све ово упућује на хитну потребу за бољим опцијама превенције, дијагностике и лијечења обољелих, нарочито уколико је пародонтопатија узнапредовала. Због тога резултати из ове докторске дисертације могу допринијети разматрању нових терапијских метода у лијечењу пародонтопатије. Развој нових терапијских метода уз употребу GMSC би могао бити један од путева за откривање ефикаснијих стратегија за терапију пародонталних обољења. Коначни циљ свих ових истраживања је помоћ у лијечењу пацијената оболелих од пародонтопатије. Међутим, до тог циља пут је дуг, а ово истраживање је тестирало неке од њих на истраживачком нивоу.

7. Начин презентирања резултата научној јавности⁴

Др Марина Радановић је дио резултата свога истраживања приказала на 5. Европском конгресу имунолога, одржаном у Амстердаму, Холандији у септембру 2018. године, и објавила рад у часопису *International Journal of Molecular Sciences* у марту 2022. године (IF: 6.208).

8. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ⁵

³ Истаћи посебно примјенљивост и корисност у односу на постојећа рејешења теорије и праксе

⁴ Наводе се радови докторанта у зборницима и часописима у којима су објављени (истраживачки проблеми и резултати предмета истраживања докторске дисертације)

⁵У закључку се, поред осталог, наводи и назив квалификације коју докторант стиче одбраном тезе

На основу детаљне анализе докторске дисертације под називом „Фенотипске и функционалне карактеристике мезенхималних стромалних матичних ћелија изолованих из здравог и инфламираног ткива гингиве“, Комисија је једногласно закључила да је кандидат изабрао актуелну и оригиналну тему истраживања коју је спровео поштујући све принципе научног рада и користећи савремене методе испитивања и анализе резултата. Добијени резултати, оригинални по свом садржају и интерпретацији, представљају значајан допринос савременој медицинској науци. На основу наведеног, Комисија са задовољством предлаже Научно-наставном већу Медицинског факултета у Фочи, Универзитета у Источном Сарајеву да прихвати извјештај о урађеној докторској дисертацији др Марине Радановић, под горе наведеним насловом и одобри њену јавну одбрану, у поступку стицања звања доктора медицинских наука.

Мјесто: Фоча

Датум: 02.05.2023

Комисија:

1. Проф. др Смиљка Цицмил, ванредни професор, ужа научна област Стоматологија, орална хирургија и медицина, Медицински факултет у Фочи, предсједник Комисије.

2. Проф. др Дејан Марковић, редовни професор, ужа научна област Клиничке стоматолошке науке, Стоматолошки факултет универзитета у Београду, члан Комисије.

3. Доц. др Душан Михајловић, доцент, ужа научна област Медицинска хемија, Медицински факултет у Фочи, УИС, члан Комисије.

Издвојено мишљење⁶:

⁶Чланови комисије који се не слажу са мишљењем већине чланова комисије, обавезни су да у извештај унесу издвојено мишљење са образложењем разлога због се не слажу са мишљењем већине чланова комисије (члан комисије који је издвојио мишљење потписује се испод навода о издвојеном мишљењу)

1. _____, у звању _____ (НО _____, УНО
_____,
Факултет _____ у _____, члан Комисије;
