

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU STOMATOLOŠKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

PREDMET: Izveštaj stručne komisije i ocena završene doktorske disertacije dr Aleksandre Milosavljević pod nazivom „ĆELIJSKI I MOLEKULARNI MEHANIZMI DEJSTVA MELATONINA U ZUBNOJ PULPI I PAROTIDNOJ PLJUVAČNOJ ŽLEZDI KOD PACIJENATA SA DIJABETES MELITUSOM TIP 2”.

Na osnovu člana 50. Statuta Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u školskoj 2021/2022. godini, održanoj 21. decembra 2021. godine, doneta je odluka o imenovanju stručne komisije za ocenu završene doktorske disertacije kandidatkinje dr Aleksandre Milosavljević, pod nazivom: „ĆELIJSKI I MOLEKULARNI MEHANIZMI DEJSTVA MELATONINA U ZUBNOJ PULPI I PAROTIDNOJ PLJUVAČNOJ ŽLEZDI KOD PACIJENATA SA DIJABETES MELITUSOM TIP 2” u sastavu:

1. **Prof. dr Jelena Milašin**, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Institutski predmeti
2. **Prof. dr Jugoslav Ilić**, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Klinika za bolesti zuba
3. **Prof. dr Nataša Nikolić Jakoba**, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Klinika za parodontologiju i oralnu medicinu
4. **Prof. dr Maja Miletić**, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Institutski predmeti
5. **Dr sci. Nina Petrović**, Institut za nuklearne nauke „Vinča” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu

Nakon analize dostavljenog teksta doktorske disertacije i priložene dokumentacije, komisija podnosi Nastavno-naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ:

1. BIOGRAFSKI PODACI O KANDIDATKINJI

Dr Aleksandra Milosavljević rođena je 3. septembra 1987. godine u Kruševcu. Šabačku gimnaziju završila je 2006. godine, nakon čega upisuje Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu, školske 2006/2007. godine. Osnovne akademske studije na Stomatološkom

fakultetu Univerziteta u Beogradu završila je 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,20, nakon što je odbranila diplomski rad pod nazivom „Regenerativna terapija parodontopatija” sa ocenom 10,0. Obavezan lekarski staž, kao doktor stomatologije, obavila je u Domu zdravlja „Dr Milutin Ivković“ u Beogradu, u Kliničko-bolničkom centru Zemun i na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu i 2014. godine položila stručni ispit. Školske 2013/2014. godine nastavlja dalje usavršavanje i upisuje doktorske studije na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Na doktorskim studijama položila je sve ispite predviđene nastavnim planom i programom sa prosečnom ocenom 10,0. Oktobra 2020. godine bira se u zvanje istraživač saradnik i od školske 2020/2021. godine angažovana je u izvođenju praktične nastave na predmetu Stomatološka farmakologija na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Do sada je objavila dva originalna naučno-istraživačka rada. Deo rezultata dobijenih u istraživanjima sprovedenih u okviru doktorske disertacije objavila je u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti ***International Endodontic Journal*** (M21a), **DOI:10.1111/iej.12934.**

2. OSNOVNI PODACI O DOKTORSKOJ DISERTACIJI

Nastavno-naučno veće Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu je na IV redovnoj sednici u školskoj 2016/2017. godini, održanoj 25. aprila 2017. godine, usvojilo pozitivan Izveštaj stručne komisije za ocenu predloga teme pod nazivom „Ćelijski i molekularni mehanizmi dejstva melatonina u zubnoj pulpi i parotidnoj pljuvačnoj žlezdi kod pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2” kandidatkinje dr Aleksandre Milosavljević, za koji je dobila saglasnost veća Naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.

Za mentora disertacije imenovana je dr Jelena Roganović, tada docenta Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti ove doktorske disertacije, utvrđeno je da podudaranje teksta sa drugim izvorima iznosi 5%. Ovo podudaranje se odnosi, pre svega, na nužno prisutne elemente doktorske disertacije, kao što su bibliografski podaci o korišćenoj literaturi, stručna terminologija, lična imena i institucije, i prethodno objavljeni rezultati istraživanja sprovedenih u okviru doktorske disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i ukazuje na originalnost doktorske disertacije.

3. PREDMET I SADRŽAJ DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija dr Aleksandre Milosavljević napisana je na 76 strana i ilustrovana sa jednom slikom, pet tabela i 10 grafikona. Doktorska disertacija sadrži zahvalnicu, sažetak na srpskom i engleskom jeziku, spisak skraćenica, poglavlja: uvod i ciljeve istraživanja, metode, rezultate istraživanja, diskusiju i zaključke, zatim pregled literature sa 301 bibliografskim podatkom i priloge.

U **uvodu** je ukazano na značaj očuvanja oralne homeostaze za celokupno zdravlje, kao i na načine na koje dijabetes melitus (DM) remeti oralnu homeostazu, među kojima su najznačajniji disfunkcija pljuvačnih žlezda i smanjeni reparatori i regenerativni potencijal oralnih tkiva. S druge strane, ukazano je i na važnost oralnog zdravlja za adekvatnu kontrolu glikemije, a time i progresiju DM. U razmatranjima molekularnih mehanizama uključenih u nastanak hroničnih komplikacija DM ističu se patološki mehanizmi hiperglikemijom-izazvanog oksidativno-nitrozativnog stresa i hronične inflamacije u tkivima. U nastavku, detaljno se navode rezultati studija o citoprotektivnom značaju melatonina (MEL) u uslovima eksperimentalnog dijabetesa, ali i u kliničkim istraživanjima kod obolelih od DM. Kao ključni mehanizmi protektivnog dejstva MEL u literaturi navode se: direktna neutralizacija slobodnih radikala, povećanje antioksidativnog ćelijskog odgovora stimulacijom Nrf2 (faktor 2 povezan sa nuklearnim faktorom-eritroidom 2), kao i inhibicija inflamacije posredovane proinflamatornim transkripcionim faktorom NF-κB (transkripcioni jedarni factor kappa B). Značajno je da su antiinflamatorni efekti MEL rezultat epigenetičkih mehanizama koji uključuju inhibiciju acetilirajućeg enzima histon acetil-transferaze p300 (p300).

U hipotezi istraživanja navedeno je da se ekspresija MEL, proinflamatornog enzima inducibilne azot-monoksid sintaze (iNOS), citoprotektivnog neurotrofnog faktora poreklom glijalnih ćelija (GDNF), kao i aktivnost antioksidativnog enzima superoksid dizmutaze (SOD) razlikuju u tkivima parotidne pljuvačne žlezde i zubne pulpe zdravih ispitanika u odnosu na ispitanike sa DM tip 2, kao i da MEL, *in vitro*, smanjujući oksidativno-nitrozativni stres i inflamaciju, pokazuje citoprotektivni efekat prema humanim ćelijama parotidne pljuvačne žlezde i zubne pulpe u uslovima hiperglikemije. Na osnovu hipoteze, postavljeni su sledeći **ciljevi istraživanja:**

- odrediti i uporediti ekspresiju proteina MEL, iNOS i GDNF i aktivnost SOD u humanim tkivima parotidne pljuvačne žlezde i zubne pulpe u grupi zdravih ispitanika i u grupi ispitanika sa DM tip 2;

- ispitati efekte farmakoloških koncentracija MEL (0,1 mM i 1mM), *in vitro*, na metaboličku aktivnost i vijabilnost humanih ćelija parotidne pljuvačne žlezde i zubne pulpe;
- ispitati efekte farmakoloških koncentracija MEL, *in vitro*, na ekspresiju proteina iNOS, p300 i GDNF i na aktivnost SOD u kulturama ćelija parotidne pljuvačne žlezde poreklom zdravih ispitanika i poreklom ispitanika sa DM tip 2;
- ispitati efekte farmakoloških koncentracija MEL, *in vitro*, na ekspresiju proteina iNOS, p300 i GDNF i na aktivnost SOD u humanim kulturama ćelija zubne pulpe u uslovima normoglikemije i hiperglikemije.

U poglavlju koje se odnosi na **metodologiju** istraživanja jasno je opisan način i tok sprovedenih ispitivanja. Za potrebe istraživanja u studiju je bilo uključeno 72 ispitanika. U studiju za ispitivanja na tkivima parotidne pljuvačne žlezde i zubne pulpe bilo je uključeno 64 ispitanika, a po četiri ispitanika su bila uključena u studije na kulturama ćelija parotidne pljuvačne žlezde i zubne pulpe. Prikupljanje uzoraka i sva ispitivanja sprovedena su na klinikama i u laboratorijama Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Klinika za maksilofacialnu hirurgiju, Klinika za bolesti zuba, Klinika za oralnu hirurgiju, Laboratorija za ćelijske kulture, Istraživačka laboratorija Klinike za bolesti zuba). Kriterijumi za uključivanje i isključivanje ispitanika jasno su navedeni. Svi ispitanici, sistemski zdravi i oboleli od DM tip 2, nakon obrazloženja o značaju i toku istraživanja, potpisali su pismenu saglasnost za davanje uzorka tkiva parotidne pljuvačne žlezde ili zubne pulpe. Za *in vitro* istraživanja na ćelijskim kulturama, ćelije parotidne pljuvačne žlezde izolovane su od dva sistemski zdrava ispitanika i dva ispitanika sa DM tip 2, dok su ćelije zubne pulpe izolovane iz umnjaka sa završenim rastom korena poreklom od četiri sistemski zdravi ispitanika. Postupci izolacije ćelija metodom eksplanta, njihove sledstvene kultivacije i tretman ćelija MEL detaljno i precizno su opisani. Nakon dokaza o biokompatibilnosti MEL (MTT i NRU testovi), ćelije parotidne pljuvačne žlezde su tretirane MEL u koncentraciji od 0,1 mM (24 sata), dok su ćelije zubne pulpe prvo izlagane hiperglikemiji (72 sata), a potom MEL u koncentracijama 0,1 mM i 1 mM. Imunoenzimskom metodom (ELISA), primenom komercijalnih ELISA kitova, merena je ekspresija iNOS, GDNF i p300, kao i aktivnost SOD u ćelijskim kulturama.

Rezultati istraživanja predstavljeni su kroz četiri tabele i deset grafikona. Dobijeni rezultati pokazuju da tkiva parotidne pljuvačne žlezde i zubne pulpe, u grupi ispitanika sa DM tip 2, sadrže znatno manju količinu MEL, uz istovremeno značajno povećanje proteina iNOS i GDNF. Aktivnost SOD bila je značajno povećana u tkivu parotidne pljuvačne žlezde u grupi

ispitanika sa DM tip 2, dok u tkivu zubne pulpe nije bilo značajne promene u aktivnosti SOD između dve grupe ispitanika. Tokom ispitivanja citotoksičnosti farmakoloških koncentracija MEL, 0,1 mM i 1 mM (inkubiranih u trajanju od 24 sata), MTT testom je ustanovljeno citotoksično delovanje 1 mM, ali ne i 0,1 mM koncentracije MEL na ćelije parotidne pljuvačne žlezde. Obe ispitivane koncentracije MEL nisu uticale značajno na vrednosti MTT i NRU testa u kulturi ćelija zubne pulpe. U kulturi ćelija parotidne pljuvačne žlezde pokazano je da tretman ćelija MEL značajno povećava koncentraciju proteina GDNF i aktivnost SOD u ćelijama poreklom zdravih ispitanika, odnosno smanjuje aktivnost SOD u ćelijama poreklom ispitanika sa DM tip 2. U kulturi ćelija zubne pulpe pokazano je da se koncentracija proteina iNOS, p300 i GDNF značajno povećava, dok se aktivnost SOD značajno smanjuje, kada se ćelije izlože dejstvu hiperglikemije, pri čemu je Spirmanovim testom utvrđena jaka pozitivna korelacija između nivoa iNOS i p300. U ispitivanjima efekata MEL u kulturi ćelija zubne pulpe u uslovima normoglikemije pokazano je da primena MEL u koncentraciji od 0,1 mM značajno povećava koncentraciju proteina GDNF, dok primena MEL u većoj koncentraciji (1 mM) utiče značajno samo na koncentraciju iNOS, koju povećava. U ispitivanjima efekata MEL u kulturi ćelija zubne pulpe u uslovima hiperglikemije, primena MEL u nižoj koncentraciji normalizuje aktivnost SOD, dok u višoj koncentraciji značajno smanjuje povećane koncentracije iNOS, p300 i GDNF i normalizuje aktivnost SOD, pri čemu je dobijena statistički značajna pozitivna korelacija između nivoa iNOS i p300.

Dobijene rezultate dr Milosavljević u **diskusiji** analizira u kontekstu postojećih znanja vezanih za komplikacije reparatornog/regeneratornog potencijala oralnih tkiva u toku DM, ali uz novi aspekt koji uključuje mehanizme dijabetesom-narušene oralne homeostaze i, po prvi put, mogućnosti MEL da deluje protektivno na očuvanje dijabetesom-narušene oralne homeostaze. Pre svega, ovo istraživanje je pokazalo da kod pacijenata sa DM tip 2 u oralnim tkivima postoji deficit MEL koji prati stanje oksidativno-nitrozativnog stresa, što ukazuje na jedan od mogućih ćelijskih mehanizama uključenih u smanjeni reparatori/regeneratorni potencijal oralnih tkiva u DM tip 2. Potvrda ove hipoteze pokazana je u *in vitro* eksperimentima, u ćelijskim kulturama parotidne pljuvačne žlezde poreklom od pacijenata sa DM tip 2 i zubne pulpe u uslovima hiperglikemije, gde je suplementacija MEL ovih humanih ćelija pokazala značajno smanjenje ispitivanih parametara inflamacije i oksidativno-nitrozativnog stresa. Pokazani antiinflamatorni i antioksidativni efekti MEL su pokazani i u ćelijama poreklom periodontalnog ligamenta, odnosno parodontopatiji, ali je ovde po prvi put pokazan značaj MEL i mehanizam uključen u hiperglikemijom-izazvanu disfunkciju ćelija zubne pulpe. Šta više, pokazano je da su efekti MEL u uslovima hiperglikemije/DM tip 2

povezani sa promenom u nivou enzima uključenog u acetilaciju histona, čime je ukazano na epigenetičku ulogu MEL u regulaciji funkcije ćelija oralnih tkiva u toku hiperglikemije/DM tip2. Po prvi put, pokazano je da u efektima MEL u ćelijama oralnih tkiva, značajnu ulogu ima GDNF, jedan od ključnih faktora regenerativnih procesa u oralnim ćelijama, sa citoprotektivnom ulogom u patološkim stanjima oralnih tkiva.

U **zaključcima** istraživanja ukazano je da postoji deficit MEL kao i disbalans u ekspresiji pro- i anti-inflamatornih medijatora u tkivima parotidne pljuvačne žlezde i zubne pulpe obolelih od DM tip 2, koji mogu biti od značaja za dijabetesom-narušenu oralnu homeostazu. Obe primenjene farmakološke koncentracije MEL u humanim ćelijama zubne pulpe, a samo niža koncentracija MEL u humanim ćelijama parotidne žlezde, pokazuju biokompatibilnost i ne ispoljavaju citotoksičnost, a njihova primena normalizuje parametre oksidativno-nitrozativnog stresa u ćelijama u uslovima hiperglikemije/DM tip 2. Primena MEL *per se* povećava nivo GDNF, molekula od značaja za reparatorne/regenerativne procese u ćelijama oralnih tkiva. Primena MEL smanjuje hiperglikemijom-indukovano povećanje koncentracije iNOS, p300 i GDNF u humanim ćelijama zubne pulpe i normalizuje smanjenu aktivnost SOD, u ćelijama zubne pulpe i ćelijama parotidne žlezde obolelih od DM tip 2, čime ispoljava antioksidativno i antiinflamatorno protektivno dejstvo na ćelije zubne pulpe u uslovima *in vitro* hiperglikemije, odnosno na ćelije parotidne pljuvačne žlezde u uslovima DM tip 2. Pri tome, pokazana korelacija između iNOS i p300 u ćelijama zubne pulpe u uslovima hiperglikemije, nakon primene MEL, upućuje na epigenetički mehanizam antiinflamatornog dejstva MEL u humanim ćelijama zubne pulpe.

ZAKLJUČNO MIŠLJENJE

Dr Aleksandra Milosavljević u svojoj doktorskoj disertaciji bavi se aktuelnim pitanjima vezanim za nastanak intraoralnih komplikacija dijabetesa, kao i mogućnostima njihove kontrole, a sa ciljem povećanja efikasnosti stomatološke terapije kod pacijenata sa DM. U tom smislu, kandidatkinja je pošla od idejne prepostavke da bi primena MEL, endogenog medijatora sa imunomodulatornim i antioksidativnim dejstvom, mogla biti korisna kao pomoćno sredstvo u lečenju patoloških stanja usne duplje. U svojoj disertaciji, dr Milosavljević ispituje mogućnost primene MEL u ćelijama zubne pulpe i parotidne pljuvačne žlezde u uslovima hiperglikemije, odnosno DM tip 2, i rezultati pokazuju protektivnu ulogu MEL u zaštiti tkiva od oštećenja izazvanih oksidativno-nitrozativnim stresom. Značajno je i da rezultati pružaju uvid u nove ćelijske mehanizme uključene u nastanak intraoralnih komplikacija u DM, posebno apostrofirajući ulogu epigenetičkih regulatornih mehanizma u

njihovom nastanku, što, imajući u vidu reverzibilnost ovih promena, sugeriše i mogućnost novih terapijskih pristupa. Zaključci ovog istraživanja postaju smernice za dalje kliničke oglede kao i specifične studije kako bi se terapijske mogućnosti MEL ispitale i u stanjima izazvanim drugim intraoralnim bolestima.

Na osnovu značaja dobijenih rezultata članovi komisije predlažu Nastavno-naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati Izveštaj komisije o pozitivnoj oceni doktorske disertacije dr Aleksandre Milosavljević pod nazivom „ĆELIJSKI I MOLEKULARNI MEHANIZMI DEJSTVA MELATONINA U ZUBNOJ PULPI I PAROTIDNOJ PLJUVAČNOJ ŽLEZDI KOD PACIJENATA SA DIJABETES MELITUSOM TIP 2” i da odobri javnu odbranu doktorske disertacije.

U Beogradu, 4. 2. 2022. godine

Članovi Komisije:

Prof. dr Jelena Milašin, redovni profesor

Stomatološkog fakulteta Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Jugoslav Ilić, vanredni profesor Stomatološkog

fakulteta Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Nataša Nikolić Jakoba, vanredni profesor

Stomatološkog fakulteta Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Maja Miletić, vanredni profesor Stomatološkog

fakulteta Univerzitet u Beogradu

Dr sci. Nina Petrović, viši naučni saradnik Instituta za

nuklearne nauke „Vinča” – Institut od nacionalnog
značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu