

NAUČNO - NASTAVNOM VEĆU
STOMATOLOŠKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

PREDMET: Izveštaj stručne komisije i ocena završene doktorske disertacije dr Nikole Radovića pod nazivom „MIKRO RNK-146a I MIKRO RNK-155 U GINGIVALNOJ TEČNOSTI, KAO POTENCIJALNI BIOMARKERI PARODONTOPATIJE KOD SISTEMSKI ZDRAVIH OSOBA I OBOLELIH OD DIJABETES MELITUSA 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 2018/19. godini, održanoj 28.05. 2019. godine, doneta je odluka o imenovanju stručne komisije za ocenu završene doktorske disertacije kandidata dr Nikole Radović, pod nazivom: „MIKRO RNK-146a I MIKRO RNK-155 U GINGIVALNOJ TEČNOSTI, KAO POTENCIJALNI BIOMARKERI PARODONTOPATIJE KOD SISTEMSKI ZDRAVIH OSOBA I OBOLELIH OD DIJABETES MELITUSA TIP 2” u sastavu:

1. **Prof. dr Saša Janković**, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Klinika za parodontologiju i oralnu medicinu
2. **Prof. dr Božidar Brković**, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Klinika za oralnu hirurgiju
3. **Doc. dr Sanja Milutinović Smiljanić**, Stomatološki fakultet, Univerziteta u Beogradu, Institutski predmeti
4. **Doc. dr Zoran Mandinić**, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Klinika za dečiju i preventivnu stomatologiju
5. **Dr sci. Nina Petrović**, naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča” Univerziteta u Beogradu

Na osnovu detaljne analize priloženog teksta doktorske disertacije i priložene dokumentacije, komisija podnosi Nastavno - naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

1. BIOGRAFSKI PODACI

Dr Nikola Radović rođen je 09.06.1987. godine u Beogradu, gde je završio osnovnu i srednju školu. Osnovne studije upisao je 2005. godine na Stomatološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Diplomirao je 17.02.2011. godine, sa prosečnom ocenom 9.00, odbranom diplomskog rada pod nazivom „*Etiopatogenetski aspekt mukogingivalnih anomalija*” pod rukovodstvom mentora prof. dr Božidara Dimitrijevića na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta u Beogradu.

Po završetku fakulteta, obevezan pripravnički staž, kao doktor stomatologije, obavio je na Vojnomedicinskoj akademiji u periodu od 17.05.2011. - 17.05.2012. godine. Stručni ispit za doktora stomatologije položio je 30.05.2012. godine.

Od jula 2012. do jula 2017. godine bio je zaposlen kao doktor stomatologije u stomatološkoj ordinaciji „dr Koković”. Trenutno je zaposlen kao doktor stomatologije u stomatološkoj ordinaciji „Dental studio 3”.

Specijalističke studije iz oblasti *Parodontologija i oralna medicina* na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisao je 01.06.2015. godine. Specijalistički ispit položio je 27.06.2018. godine sa odličnom ocenom. Školske 2012/2013. godine na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisao je doktorske studije, na kojima je položio sve ispite predviđene planom i programom studija sa prosečnom ocenom 9.94.

Do sada je publikovao 1 naučni rad. Kao rezultat svog istraživanja, deo rezultata iz doktorske disertacije objavio je u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti *Journal of Clinical Periodontology* (M21a). DOI: 10.1111/jcpe.12888. Član je Udruženja parodontologa Srbije, Srpskog lekarskog društva (SLD), Sekcije za parodontologiju i Evropske federacije za parodontologiju (EFP). Posедуje znanje engleskog jezika (viši nivo), nemačkog jezika (srednji nivo), ruskog jezika (početni nivo), kao i veštine rada na računaru.

2. OSNOVNI PODACI O DOKTORSKOJ DISERTACIJI

Nastavno - naučno veće Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu je na IV redovnoj sednici školske 2016/17. godine, održanoj 25.04. 2017. godine usvojilo pozitivan Izveštaj stručne komisije kandidatu dr Nikoli Radoviću za ocenu predloga teme pod nazivom „Mikro RNK-146a i mikro RNK-155 u gingivalnoj tečnosti, kao potencijalni biomarkeri parodontopatije kod sistemski zdravih osoba i obolelih od dijabetes melitusa tip 2” uz saglasnost veća Naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.

Za mentora disertacije imenovana je prof. dr Jelena Roganović, vanredni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a za komentora prof. dr Nataša Nikolić Jakoba, vanredni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3. PREDMET I SADRŽAJ DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija dr Nikole Radovića, pod nazivom „Mikro RNK-146a i mikro RNK-155 u gingivalnoj tečnosti, kao potencijalni biomarkeri parodontopatije kod sistemski zdravih osoba i obolelih od dijabetes melitusa tip 2” napisana je na 136 strana, ilustrovana je sa 35 slika, 15 tabela i 15 grafikona.

Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, uvod i ciljeve istraživanja, materijal i metode, rezultate istraživanja, diskusiju, zaključke, pregled literature (sa 217 bibliografskih podataka) i priloge.

U **uvodu** se opisuje značaj parodontopatije kao jedne od najučestalijih bolesti današnjice sa značajnim posledicama po opšte zdravlje čoveka. Kao jedan od najznačajnijih faktora rizika za nastanak parodontopatije je dijabetes mellitus. Ukazano je na to da su dijabetes i parodontopatija veoma tesno povezani i ispreplitani. Naime, dijabetes melitus može da utiče na težinu kliničke slike parodontopatije, dok parodontopatija, negativno utičući na kontrolu glikemije obolelih od dijabetes melitusa, doprinosi bržem razvoju komplikacija dijabetesa. Savremena istraživanja govore u prilog multifaktorijalnoj etiopatogenezi ovih patoloških stanja i značajnoj regulatornoj ulozi epigeneičkih faktora kao što su miRNK. Cirkulatorne miRNK, koje mogu da kruže

krvotokom i da se nađu u telesnim tečnostima, su veoma stabilne i zadržavaju biološku funkciju, tako da mogu poslužiti kao pouzdaniji biomarkeri patološkog stanja koje izaziva promene u njihovoj ekspresiji, u odnosu na druge biomarkere, kao što su npr. bakterijski produkti ili enzimi. Značajno je napomenuti da se u osnovi patofiziološkog mehanizma koji povezuje dijabetes melitus i parodontopatiju nalaze inflamacija i oksidativni stres. U tom smislu, dokumentovan je značaj dosadašnjih istraživanja vezanih za ulogu miRNK-146a i miRNK-155 kao finih regulatora inflamacije uključenih u fiziološka, ali i patološka stanja, kao što je dijabetes melitus. Pokazan je značaj ovih miRNK u inflamatornim procesima u gingivi, ali podataka o njihovom prisustvu u gingivalnoj tečnosti kao i o značaju za sliku parodontopatije kod obolelih od dijabetesa, do sada nije bilo. U uvodu doktorske teze dalje se razmatra i značaj gingivalne tečnosti kao dijagnostičkog medijuma. Kandidat detaljno navodi tehnike uzorkovanja gingivalne tečnosti, kao i njen sastav. Takođe, precizno je navedeno koji su to faktori poreklom iz gingivalne tečnosti u prethodnih nekoliko decenija istraživani u sklopu dijagnoze i prognoze parodontopatije, posebno ističući da je ovo prva studija koja se bavila ispitivanjem cirkulatornih miRNK iz ovog dijagnostičkog medijuma.

U drugom poglavlju jasno i precizno su definisani **ciljevi** istraživanja. Autor polazi od pretpostavke da kod obolelih od hronične parodontopatije, kako sistemski zdravih ispitanika tako i obolelih od dijabetes melitusa tip 2, cirkulatorne miRNK- 146a i miRNK- 155 izolovane iz gingivalne tečnosti, pokazuju značajno veće nivoe ekspresije u odnosu na osobe sa zdravim parodontcijumom. Takođe, pretpostavka je da se nakon sprovedene kauzalne terapije parodontopatije smanjuju nivoi ekspresije ovih proinflamatornih miRNK. Smanjenje nivoa ekspresije miRNK- 146a i miRNK- 155 u gingivalnoj tečnosti je povezano sa smirivanjem inflamacije u gingivi, kao i sa smanjenjem koncentracije MMP- 9 i sa padom u aktivnosti enzima SOD kod sistemski zdravih ispitanika i obolelih od dijabetes melitusa tip 2. Kandidat je definisao sledeće ciljeve istraživanja:

- Određivanje nivoa ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 kod ispitanika sa zdravim parodontcijumom i obolelih od hronične parodontopatije sistemski zdravih i obolelih od DM tipa 2

- Ispitavanje i analiziranje uticaja kauzalne terapije parodontopatije na nivoe ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 kod ispitanika sa hroničnom parodontopatijom, sistemski zdravih i obolelih od DM tipa 2
- Ispitavanje povezanosti miRNK-146a i miRNK-155 sa kliničkim parametrima (dubina sondiranja i nivo pripojnog epitela)
- Upoređivanje koncentracije molekula MMP-9 u gingivalnoj tečnosti/gingivalnom eksudatu sistemskih zdravih ispitanika i obolelih od DM tipa 2 sa zdravim parodoncijumom, kao i kod obolelih od hronične parodontopatije
- Ispitavanje i analiziranje aktivnosti enzima SOD u gingivalnoj tečnosti/gingivalnom eksudatu sistemskih zdravih ispitanika i obolelih od DM tipa 2 sa zdravim parodoncijumom, kao i kod obolelih od hronične parodontopatije
- Ispitavanje uticaja kauzalne terapije na vrednosti koncentracija molekula MMP-9 i na vrednosti aktivnosti enzima SOD u gingivalnom eksudatu kod ispitanika sa hroničnom parodontopatijom, sistemski zdravih i obolelih od DM tipa 2
- *In silico* analizom ispitavanje predikcije ciljnih gena regulisanih molekulima miRNK-146a i miRNK-155
- Analiza korelacije između nivoa ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 sa koncentracijom molekula MMP-9 kao i sa aktivnošću enzima SOD-e u gingivalnom eksudatu sistemski zdravih ispitanika i obolelih od DM tipa 2.

U sledećem, trećem poglavlju, navedeni su podaci od značaja za **materijal i metode** primenjene u ovom istraživanju, koje je obavljeno na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu, u RJ Inštitutski predmeti Stomatološkog fakulteta u Beogradu i u Institutu za nuklearne nauke „Vinča” u Beogradu. Za potrebe ovog istraživanja studija je obuhvatila 96 ispitanika podeljenih u 4 grupe: 24 sistemski zdrava spitanika sa hroničnom parodontopatijom (HP grupa), 24 ispitanika sa hroničnom parodontopatijom obolelih od dijabetes melitusa tip 2 (HPDM grupa), 24 ispitanika obolelih od dijabetes melitusa tip 2 sa klinički zdravim parodoncijumom (ZDM grupa), 24 sistemski zdrava ispitanika sa klinički zdravim parodoncijumom (Z grupa). Kandidat je detaljno opisao uključujuće i isključujuće kriterijime koji su se primenjivali prilikom regrutacije ispitanika u studiju. Detaljno su opisani klinički parametri za procenu stanja parodoncijuma i nivoa oralne

higijene (plak indeks, gingivalni indeks, indeks krvarenja na provokaciju, dubina sondiranja, nivo ivice gingive, nivo pripojnog epitela), kao i metode uzorkovanja gingivalne tečnosti i način na koji su uzorci skladišteni i čuvani do trenutka analize. Uzorci gingivalne tečnosti uzimani su sa dva reprezentativna mesta filter papirima PerioPaper®, 24h nakon merenja i beleženja kliničkih parametara, kako bi se izbegla kontaminacija krvlju neposredno nakon sondiranja. Koncentracije MMP-9 u gingivalnoj tečnosti merene su imunoeesejskom metodom (ELISA), dok su aktivnosti enzima SOD kvantitativno određivane spektrofotometrijskom metodom. Ekspresija miRNK odrađena je u sklopu metode kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu, korišćenjem prajmera sa petljom (*Stem-Loop qRT-PCR*) uz pomoć Taqman®2xUniversal PCR Master Mix, No AmpersaeUNG (Applied Biosystems, by Life Technologies, Warrington, UK) i specifičnih eseja: hsa-miR-146a (ID:000468); hsa-miR-155(ID: 002623) i RNU6B (ID:001093), koristeći standardne temperaturne uslove; 95°C (10 min), 95°C (15 S) i 60°C 60 S u 40 ciklusa, na 7500 Real Time PCR System aparatu (Applies Biosystems, Foster City, California, USA).

Navedenim istraživanjem došlo se do **rezultata** koje je kandidat detaljno i sistematično opisao i prikazao pomoću 12 tabela, 15 grafikona i 29 slika, u četvrtom poglavlju ove disertacije. Naime, pokazano je da su mereni klinički parametri (plak indeks, gingivalni indeks, dubina sondiranja, krvarenje na provokaciju, nivo pripojnog epitela) na svim zubima, kao i na reprezentativnim mestima, statistički značajno veći kod ispitanika u grupama HPDM i HP, u poređenju sa grupama ispitanika sa zdravim parodontcijumom, grupe ZDM i Z ($p<0.01$). Takođe, prosečne vrednosti dubine sondiranja i nivoa pripojnog epitela su značajno veće u grupi HPDM u poređenju sa HP grupom, dok se ostali parametri (plak indeks, gingivalni indeks i krvarenje na provokaciju) ne razlikuju značajno između ove dve grupe. Kandidat ističe da su nivoi ekspresije molekula miRNK-146a pokazivali statistički značajno veće vrednosti u grupi ispitanika ZDM u odnosu na Z grupu, u grupi ispitanika HPDM pre terapije u odnosu na ZDM grupu. Takođe, nivoi ekspresije molekula miRNK-146a su imale statistički značajno veće vrednosti u grupi ispitanika HP pre terapije u odnosu na Z grupu. Kandidat navodi da su u grupama HPDM i HP nivoi ekspresije molekula miRNK-146a bili statistički značajno povećani pre kauzalne terapije, dok su se nivoi ekspresije smanjili nakon kauzalne terapije do nivoa bliskih onima kod ispitanika u ZDM i Z grupama. Nivoi ekspresije miRNK-146a se nisu statistički značajno razlikovale u grupama obolelih od DM tip 2

(HP grupi i HPDM), kao ni kod ispitanika sa zdravim parodontcijumom (ZDM i Z grupa) pre kauzalne terapije. Ipak, bilo je statistički značajne razlike u nivou ekspresije molekula miRNK-155 u HPDM grupi pre terapije u odnosu na ZDM grupu. Nivoi ekspresije molekula miRNK-155 su pokazali statistički značajno veće vrednosti u HP grupi pre terapije u odnosu na Z grupu. U grupama HPDM i HP nivoi ekspresije molekula miRNK-155 su bili statistički značajno povećani pre kauzalne terapije, ali su se smanjili nakon terapije do nivoa bliskih onima kod ispitanika u ZDM i Z grupama. Dobijeni rezultati nivoa ekspresije molekula miRNK-155 se nisu statistički značajno razlikovali u HPDM i HP grupi pre kauzalne terapije. Kandidat u rezultatima jasno navodi da su vrednosti aktivnosti enzima SOD bile statistički značajno veće u grupama ispitanika sa hroničnom parodontopatijom (HPDM i HP grupe), dok su se vrednosti njene aktivnosti smanjile šest nedelja nakon kauzalne terapije na vrednosti slične onima kao kod ispitanika sa zdravim parodontcijumom (ZDM i Z grupe). Takođe, navodi se i da su vrednosti koncentracije molekula MMP-9 bile značajno veće u grupama ispitanika sa hroničnom parodontopatijom (HPDM i HP grupe), dok su se šest nedelja nakon kauzalne terapije vrednosti koncentracija smanjile na vrednosti slične onima kod ispitanika sa zdravim parodontcijumom (ZDM i Z grupe). Primenom Spearmanovog testa dobijena je statistički značajna pozitivna korelacija između nivoa ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 i nivoa aktivnosti enzima SOD kako pre terapije, tako i nakon primenjene terapije u HP i HPDM grupama. Istim testom je pokazana statistički značajna pozitivna korelacija između nivoa ekspresije miRNK-146a i miRNK-155 kako pre terapije, tako i nakon primenjene terapije u HP i HPDM grupama. Takođe, nije bilo statistički značajne korelacije između vrednosti koncentracije molekula MMP-9 i obe ispitivane miRNK pre kauzalne terapije, kao ni posle primenjene terapije u HP i HPDM grupama. Takođe se navodi da ovom analizom nije dobijena statistički značajna korelacija između zasebnih vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 sa kliničkim parametrima. Sa druge strane, pokazana je pozitivna korelacija između aktivnosti enzima SOD sa nivoom pripojnog epitela u HPDM grupi, kao i povezanost koncentracije MMP-9 sa nivoom pripojnog epitela u HP grupi. Regresionom analizom pokazano je da su miRNK-146a i miRNK-155 dobri biomarkeri parodontopatije i kod sistemski zdravih i kod obolelih od dijabetesa. MiRNK-146a pokazuje najbolje karakteristike, sa senzitivnošću od 100%, specifičnošću od 96%, cutoff vrednošću od 4.11 arbitarnih jedinica, kod sistemski zdravih ispitanika obolelih od hronične parodontopatije. Kod ispitanika obolelih od

dijabetes melitusa tip 2, miRNK- 155 pokazuje bolje karakteristike u odnosu na miRNK- 146a, sa senzitivnošću od 72%, specifičnošću od 100% i cutoff vrednošću od 3.56 arbitrarnih jedinica.

U petom poglavlju, primenjene metode i rezultati dobijeni u ovom istraživanju su kritički i detaljno **diskutovani** i poređeni sa navodima iz savremene literature koja se bavi ovom izuzetno kompleksnom i važnom problematikom. Ova studija je prva kohortna studija koja je obuhvatala 96 ispitanika, koja je pored analize nivoa ekspresije miRNK u grupama sa i bez parodontopatije, i udruženog DM, analizirala i efekte kauzalne terapije parodontopatije na nivoe miRNK kao biomarkera parodontopatije u gingivalnom eksudatu. Tokom analitičkog razmatranja rezultata ovog rada i drugih autora, sugerisano je da miRNK-146a i miRNK-155 imaju isprepletane uloge u parodontopatiji. Naime, rezultati ove studije su utvrdili povezanost svake zasebno, miRNK-146a i miRNK-155 samo sa jednim kliničkim parametrom parodontopatije (nivo pripojnog epitela), u različitim grupama pacijenata sa hroničnom parodontopatijom, najverovatnije zbog toga što u kontroli inflamacije ne deluju zasebno, već u interakciji. U prilog postojanja ove interakcije, i to sinergističke, govore i rezultati o snažnoj pozitivnoj korelaciji između miRNK-146a i miRNK-155, opažene u grupama sa parodontopatijom i nezavisno od prisustva DM tip 2. U nastavku, rezultati predikcije ciljnih gena ispitivanih miRNK ukazuju na veliku mogućnost da iRNK SOD₂ gena bude regulisana od strane ovih molekula, sugerišući da miRNK-146a i miRNK-155 u kombinaciji mogu imati izuzetno veliku verovatnoću da regulišu ekspresiju SOD₂ gena, na taj način utičući na regulaciju mehanizma oksidativnog stresa.

U **zaključku**, u ovoj studiji, po prvi put su izolovani i analizirani molekuli miRNK-146a i miRNK-155 u gingivalnoj tečnosti pacijenata sa hroničnom parodontopatijom, kao i kod pacijenata sa hroničnom parodontopatijom i udruženim DM tip 2, za koji je poznato da predstavlja faktor rizika za nastanak parodontopatije i da je pod kontrolom epigenetičkih regulatora. Takođe, po prvi put je praćen i uticaj kauzalne terapije parodontopatije na ekspresiju ovih miRNK u gingivalnom eksudatu i pokazano da kauzalna terapija normalizuje nivoe ovih biomarkera. Pokazano je da su miRNK-146a i miRNK-155 iz gingivalnog eksudata dobri dijagnostički biomarkeri hronične parodontopatije i kod sistemski zdravih i kod obolelih od DM tip 2, kao i da u kompleksnoj interakciji, ove miRNK, sa velikom verovatnoćom, regulišu aktivnost SOD enzima, sugerišući da njihova uloga u parodontopatiji verovatno uključuje i regulaciju oksidativnog stresa.

ZAKLJUČNO MIŠLJENJE

Dr Nikola Radović je za predmet svog istraživanja izabrao oblast do sada neispitivanu, ali izuzetno značajnu za stomatološku struku i nauku. Imajući u vidu da su istraživanja o značaju miRNK kao epigenetičkih regulatora u nastanku oralnih komplikacija DM tek u začetku, identifikacija miRNK-146a i miRNK-155 iz gingivalne tečnosti kao pouzdanih biomarkera parodontopatije vrlo je značajna jer se miRNK zbog svoje stabilnosti i specifične funkcije smatraju boljim biomarkerima u odnosu na proteine ili bakterijske produkte. Takođe, pokazano je da je primenom ove neinvazivne dijagnostičke metode moguće i praćenje efekata kauzalne terapije parodontopatije u toku dijabetes melitusa. Treba napomenuti i da rezultati ove disertacije pružaju svež i nov uvid u patogenetske molekularne mehanizme uključene u nastanak i progresiju parodontopatije u toku dijabetes melitusa tip 2. Naime, pokazano je da pacijenti oboleli od DM tip 2 imaju povišenu ekspresiju inflamatorno - modulatorne miRNK-146a i tako nose izmenjeni “epigenetički zapis”- što može uticati na promene u inflamatornom odgovoru susednih parodontalnih tkiva i dovodi do ozbiljnije kliničke slike parodontopatije, koja se može opaziti kod pacijenata sa DM tip 2 i pored dobro kontrolisane glikemije.

Na osnovu svega navedenog, ostvarenih rezultata, kvaliteta i originalnosti primenjenih metoda i značajnog naučnog doprinosa, članovi komisije sa zadovoljstvom predlažu Nastavno - naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati pozitivnu ocenu završene

doktorske disertacije pod nazivom „MIKRO RNK- 146a I MIKRO RNK- 155 U GINGIVALNOJ TEČNOSTI, KAO POTENCIJALNI BIOMARKERI PARODONTOPATIJE KOD SISTEMSKI ZDRAVIH OSOBA I OBOLELIH OD DIJABETES MELITUSA TIP 2”, kandidata dr Nikole Radovića i odobri javnu odbranu doktorske disertacije pred odabranom komisijom.

Beograd, 03.06. 2019.

Članovi komisije:

Prof. dr Saša Janković

(Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu)

Prof. dr Božidar Brković

(Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu)

Doc. dr Sanja Milutinović Smiljanić

(Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu)

Doc. dr Zoran Mandinić

(Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu)

Dr sci. Nina Petrović, naučni saradnik

(Institut za nuklearne nauke „Vinča”, Univerzitet u Beogradu)