

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**  
**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

**ПРЕДМЕТ:**  
**ИЗВЕШТАЈ КОМИСИЈЕ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ**  
**ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

На седници Наставно-научног већа Факултета медицинских наука у Крагујевцу, одржаној дана 03.06.2015. године, одлуком 01-5586/3-43 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом „Улога IL-33/ST2 сигналног пута у патогенези експерименталних периапексних лезија” кандидата Милене Д. Алексић, у следећем саставу:

**Проф. др Драгиња Којовић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Пародонтологија и орална медицина, председник

**Доц. др Иван Јовановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, члан

**Доц. др Гордана Радосављевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију кандидата Милене Д. Алексић, и подноси Наставно-научном већу следећи

## ИЗВЕШТАЈ

### 2.1. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области

Докторска дисертација кандидата Милене Д. Алексић под називом „Улога IL-33/ST2 сигналног пута у патогенези експерименталних периапексних лезија” представља оригиналну студију која се бавила испитивањем утицаја IL-33/ST2 сигналног пута на развој и ток периапексних лезија у мишјем моделу индукованом излагањем отворених пулпи мандибуларних молара микрофлори усне дупље.

Периапексне лезије представљају локалну инфламаторну реакцију на анаеробну инфекцију канала корена зуба, која најчешће настаје као последица несанираног каријеса, фрактуре зуба, трауматских оперативних денталних процедура, као и усред дејства јатрогених и других фактора који омогућавају продор микроорганизама у комору пулпе. Инфламаторни процес у периапексу започиње регрутацијом ћелија неспецифичне имуности на место инфекције. Неутрофилне гранулоците, поред фагоцитозе, карактерише продукција леукотријена и простагландина. Леукотријен B4 привлачи нове неутрофиле и макрофаге у област инфламације, а заједно са простагландином E2 и I2 има улогу у активацији остеокласта, ћелија одговорних за ресорпцију кости. Ресорпција кости представља једну од главних патолошких промена периапексних лезија која се може детектовати испитивањем експресије TRAP-а (енгл. *tartrate resistant acid phosphatase*) и одређивањем RANKL/OPG односа (енгл. *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand/ osteoprotegerin ratio*) у периапексном ткиву. TRAP је важан цитохемијски маркер остеокласта, а повећани RANKL/OPG однос је кључни индикатор ресорптивне активности ових ћелија.

У случају пролонгираног присуства иритације (бактерија и њихових продуката) периапексни регион инфилтрише све већи број лимфоцита и процес поприма хронични ток. Резултати имунохистохемијских студија показују доминацију Т лимфоцита у односу на В лимфоците. Однос између CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита мења се током развоја хроничне инфламацијске лезије. У раним стадијумима болести уочена је доминација CD4<sup>+</sup> у односу на CD8<sup>+</sup> Т лимфоците, као и обрнута пропорција ових ћелија у каснијим фазама.

Поларизација имунског одговора има вишеструк утицај на патогенезу периапексних лезија. Док Th1/Th17 имунски одговор стимулише периапексну инфламаторну деструкцију, Th2

лимфоцити и регулаторни Т лимфоцити (енгл. *regulatory T cells*, Tregs) одговорни су за процес репарације у апексном периодонцијуму.

Интерлеукин-33 (IL-33) је нови члан IL-1 фамилије цитокина. Први пут је описан као нуклеарни фактор у венулама високог ендотела лимфног ткива који је повезан са хроматином и регулише транскрипцију, тако да истовремено делује и као цитокин и као нуклеарни фактор. Главни извор IL-33 су ендотелне, епителне и ретикуларне фибробластне ћелије. Како се у екстрацелуларни простор ослобађа из некротичних ћелија, може да има улогу „алармина“ који обавештава имунски систем да постоји деструкција ткива. Недавно је показано да је IL-33 специфичан лиганд за ST2 рецептор (ST2L). ST2L налази се на површини Th2 лимфоцита, макрофага, NK, NKT ћелија, мастоцита, базофилних и еозинофилних гранулоцита. Интеракцијом са хетеродимерним рецепторским комплексом састављеним од ST2L молекула и помоћног протеина IL-1R (енгл. *IL-1R accessory protein*, IL-1RAcP), IL-33 активира транскрипциони фактор NF-κB (енгл. *nuclear factor- κB*) и MAP киназе (енгл. *mitogen-activated protein kinases*), и на тај начин индукује продукцију Th2 цитокина.

Улога IL-33/ST2 сигналног пута у патогенези периапексних лезија до данас није проучавана. Актуелно истраживање показује да делеција гена за ST2 молекула и апликација рекомбинантног IL-33 имају утицаја на развој и ток експериментално изазваних периапексних гранулома. Делеција гена за ST2 молекула убрзава настанак периапексних лезија. Главне манифестације убрзаног настанка болести код ST2 дефицијентних мишева су повећање обима ресорпције периапексне алвеоларне кости, пораст броја TRAP-позитивних остеокласта у периапексном ткиву, повећање RANKL/OPG односа у периапексним лезијама и прогресивна инфилтрација неутрофилних гранулоцита и CD4<sup>+</sup> лимфоцита који продукују про-инфламаторне цитокине (TNF-α-, IL-6-, IFN-γ- и IL-17) у инфламрани периапексни регион и лимфне чворове врата. Примена IL-33 након индукције лезија смањила је инфлукс мононуклеарних ћелија у периапекс и лимфно ткиво, супримирала продукцију про-инфламаторних цитокина у CD4<sup>+</sup> лимфоцитима и стимулирала продукцију IL-4 у CD3<sup>+</sup> Т лимфоцитима BALB/c мишева. Основни закључак спроведене студије је да активација IL-33/ST2 сигналног пута значајно смањује инфламаторну деструкцију периапексних лезија.

**2.2. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области**

Прегледом литературе и увидом у биомедицинске базе података "Medline" и "CoBSON" помоћу следећих кључних речи: "interleukin-33", "ST2", "periapical lesions", "bone loss", "osteoclasts", "TRAP", "RANKL", "inflammation", "Th1/Th17 cells" утврђено је да до сада није спроведена студија у којој је испитивана улога IL-33/ST2 сигналног пута у патогенези периапексних лезија. На основу тога, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата Милене Д. Алексић, под називом „Улога IL-33/ST2 сигналног пута у патогенези експерименталних периапексних лезија”, урађена под менторством проф. др. Александре М. Лукић, представља резултат оригиналног научног рада који расветљава улогу ћелија периапексног запаљеног инфилтратата и њихових продуката у деструкцији алвеоларне кости и упућује на комплексност имунопатогенетских збивања у патогенези апексног периодонтитиса.

### **2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области**

#### **А. Лични подаци**

Милена Алексић (рођена Величковић) рођена је 7. фебруара 1985. године у Прокупљу, где је као ђак генерације завршила основну школу „Милић-Ракић Мирко“. Гимназију у Прокупљу, природно-математички смер, завршила је 2004. године са одличним успехом. Исте године уписала је Медицински факултет у Нишу, студијски смер - стоматологија, који је завршила 1. јуна 2010. године са просечном оценом 9,74. Школске 2008/2009. године вршила је функцију демонстратора на предмету Болести зуба - претклиника. Одмах након завршетка основних студија обавила је обавезни лекарски стаж у трајању од годину дана у Дому здравља у Нишу и положила стручни испит. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Молекулска медицина – подручје: Имунологија, инфламација и инфекција, уписала је школске 2010/2011. године, а усмени докторантски испит положила је 31. октобра 2012. године са оценом 10.

Као стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја 2011. године укључена је на пројекат Министарства под називом: „Утицај IL-33/ST2 сигналног пута и

галектина-3 у патогенези експерименталних периапикалних промена“ (број пројекта: ОР 175071). Поред тога, учесник је Макро-пројекта Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу под називом: „Имунопатологија инфламаторних, аутоимунских и малигних обољења: целуларни и молекуларни аспекти“ (МП 01/12). Кроз истраживачке програме Факултета медицинских наука у Крагујевцу 2012. године прошла је обуку В категорије надлежна лица – истраживачи. Рецензент је часописа *Journal of Dentistry and Oral Hygiene*.

### **Б. Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)**

Кандидат Милена Д. Алексић (рођена Величковић), остварила је 20,5 бодова по основу радова објављених у целини у међународним или домаћим часописима, бодованих у складу са важећим Законом о високом образовању, Статутом Факултета медицинских наука и Правилником о стицању звања наставника Универзитета и то: два рада у часопису категорије М21, један рад у часопису категорије М23 и један рад у часопису категорије М52, чиме је, у складу са чланом 204. став 3. пречишћеног текста Статута Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, испунила услов за одбрану докторске дисертације.

1. **Velickovic M**, Pejnovic N, Mitrovic S, Radosavljevic G, Jovanovic I, Kanjevac T, Jovicic N, Lukic A. ST2 deletion increases inflammatory bone destruction in experimentally induced periapical lesions in mice. *J Endod* 2015; 41(3): 369-375.  
**M21 - 8 бодова**
2. **Velickovic M**, Pejnovic N, Mitrovic S, Petrovic R, Jeftic I, Kanjevac T, Lukic A. Expression of interleukin-33 and its receptor ST2 in periapical granulomas and radicular cysts. *J Oral Pathol Med* 2015; doi: 10.1111/jop.12312. **M21 - 8 бодова**
3. Jankovic I, Kovacevic P, Visnjic M, Jankovic D, **Velickovic M**. A unique case of hereditary bilateral segmental neurofibromatosis on the face. *An Bras Dermatol* 2012; 87(3): 459-462. **M23 - 3 бода**
4. **Veličković M**, Mitrović S, Kanjevac T, Radosavljević G, Pavlović S, Lukić A. Gradacioni kriterijumi eksperimentalnih periapeksnih lezija kod miševa. *Serb J Exp Clin Res* 2013; 14(2): 71-76. **M52 - 1.5 бод**

## 2.4. Оцена о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему

Наслов докторске дисертације и урађеног истраживања се поклапају. Одобрени циљеви истраживања и постављени циљеви у раду остали су у највећој мери исти. Примењена методологија истраживања идентична је са одобреном.

Докторска дисертација кандидата Милене Д. Алексић под називом „Улога IL-33/ST2 сигналног пута у патогенези експерименталних периапексних лезија” садржи следећа поглавља: Увод, Циљеви истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература.

У уводном делу кандидат је јасно, прецизно и свеобухватно, користећи најсавременије литературне податке, изложио досадашња сазнања о патогенези настанка периапексних лезија, са посебним освртом на улогу различитих ћелија имунског система и цитокина у процесу настанка инфламаторне периапексне деструкције. У даљем теоретском разматрању акценат је стављен на структурне особине и биолошке функције IL-33 и ST2 молекула. Детаљно су изложена најновија сазнања о улози IL-33/ST2 сигналног пута у одбрани од инфекције, у аутоимуности и алергијама, као и у антитуморској имуности.

У другом поглављу јасно су изложени основни и специфични циљеви истраживања. Главни циљ ове студије био је да испита улогу IL-33/ST2 сигналног пута у патогенези периапексних лезија. Дефинисани експериментални задаци студије подразумевали су: 1. испитивање утицаја делеције гена за ST2 рецептор на обим периапексне деструкције одређивањем површина експерименталних периапексних лезија хистоморфометријским методама; 2. испитивање утицаја делеције ST2 гена на интензитет периапексне инфламације одређивањем броја различитих инфламаторних ћелија (неутрофилних гранулоцита, макрофага и лимфоцита) по  $\text{mm}^2$  индукованих периапексних лезија; 3. испитивање утицаја делеције гена за ST2 рецептор или стимулације IL-33/ST2 сигналног пута на састав имунских ћелија у експерименталним периапексним лезијама и регионалним лимфним чворовима; 4. испитивање утицаја делеције гена за ST2 рецептор или стимулације IL-33/ST2 сигналног пута на субпопулације Т лимфоцита у индукованим периапексним лезијама; 5. испитивање експресије IL-33 и ST2 молекула у здравом периодонталном лигаменту и индукованом периапексном гранулому BALB/с мишева, као и у хуманом

периапекном ткиву, и то периодонталном лигаменту, периапексним грануломима и радиксним цистама.

Материјал и методологија рада подударни су са наведеним у пријави дисертације и презентовани су на одговарајући начин. Детаљно су описане све технике коришћене у студији: индукција експерименталних периапексних лезија, патохистолошка анализа хистолошких промена, хистоморфометрија, проточна цитофлуорометријска анализа мононуклеарних ћелија периапексних лезија и лимфних чворова врата, имунохистохемијска анализа експресије IL-33 и ST2 молекула у мишјем и хуманом периапексном ткиву и имунофлуоресцентна анализа IL-33/ST2 ко-експресије у хуманим периапексним лезијама.

Резултати истраживања приказани су систематично и добро документовани. Приказаним резултатима показано је да делеција гена за ST2 убрзава настанак периапексних лезија. Главне манифестације убрзаног настанка болести код ST2 дефицијентних мишева су повећање обима ресорпције периапексне алвеоларне кости, пораст броја TRAP-позитивних остеокласта у периапексном ткиву, повећање RANKL/OPG односа у периапексним лезијама и прогресивна инфилтрација неутрофилних гранулоцита и CD4<sup>+</sup> лимфоцита који продукују про-инфламаторне цитокине (TNF- $\alpha$ -, IL-6-, IFN- $\gamma$ - и IL-17) у периапексне лезије и лимфне чворове врата. Насупрот томе, примена IL-33 након индукције лезија смањује инфлукс инфламаторних ћелија у периапекс и лимфно ткиво, супримира продукцију про-инфламаторних цитокина у CD4<sup>+</sup> лимфоцитима и подстиче продукцију IL-4 у CD3<sup>+</sup> Т лимфоцитима BALB/с мишева. Повећана експресија IL-33 и ST2 рецептора била је присутна у периапексним лезијама у поређењу са периодонталним лигаментом BALB/с мишева. Резултатима је додатно документовано повећање броја IL-33- и ST2-позитивних фибробласта у хуманим периапексним лезијама. IL-33/ST2 ко-експресија била је присутна у фибробластима и ендотелним ћелијама хуманих периапексних лезија.

У поглављу Дискусија анализирани су добијени резултати и поређени са литературним подацима из ове области. Коментари добијених резултата су језгровити, а начин приказивања података чини их прегледним и разумљивим. Резултати су детаљно дискутовани у контексту утицаја делеције гена за ST2 молекула и апликације рекомбинантног IL-33 на развој периапексних лезија, као и експресије IL-33 и ST2 рецептора у хуманом и мишјем периапексном ткиву.

Литература је адекватна по обиму и садржини. Наведени су, у међународним оквирима, најзначајнији оригинални и ревијски научни радови у овој области.

На основу претходно изнетих чињеница, Комисија сматра да завршена докторска дисертација кандидата Милене Д. Алексић под називом „Улога IL-33/ST2 сигналног пута у патогенези експерименталних периапексних лезија”, по обиму и квалитету израде у потпуности одговара пријављеној теми дисертације.

## **2.5. Научни резултати докторске дисертације**

Најзначајнији резултати истраживања садржани су у следећим закључцима:

1. Делесија ST2 гена повећава обим ресорпције алвеоларне кости у периапексном региону BALB/c мишева након индукције лезија
2. Делесија ST2 гена повећава RANKL/OPG однос и број TRAP-позитивних остеокласта у периапексним лезијама
3. ST2 делесија повећава инфлукс имунских ефекторских ћелија у периапексне лезије
4. ST2 делесија подстиче поларизацију ка Th1/Th17 имунском одговору, а инхибира Th2 имунски одговор у периапексним лезијама
5. Активација IL-33/ST2 сигналног пута смањује инфлукс ефекторских мононуклеарних ћелија и редукује инфламацију у периапексним лезијама BALB/c мишева
6. Егзогена примена рекомбинантног IL-33 у периапексним лезијама BALB/c мишева инхибира продукцију про-инфламаторних цитокина (TNF- $\alpha$ -, IL-6-, IFN- $\gamma$ - и IL-17) у CD4<sup>+</sup> Т лимфоцитима, а подстиче продукцију IL-4 у CD3<sup>+</sup> Т лимфоцитима
7. Повећан број IL-33- и ST2-позитивних фибробласта у хуманим периапексним лезијама указује на могућу улогу IL-33/ST2 сигналног пута у фиброзирању инфламираног периапексног ткива

## **2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси**

Презентовани резултати истраживања дају оригинални и важан допринос разумевању значаја и утицаја IL-33/ST2 сигналног пута на развој и ток периапексних лезија.



Појачана инфламаторна деструкција након делеције ST2 гена и смањена инфламација у периапексним лезијама BALB/c мишева након примене рекомбинантног IL-33 указује на важну протективну улогу IL-33/ST2 сигналног пута у патогенези овог честог патолошког процеса код људи.

Резултати добијени у овој студији представљају добру полазну тачку за даље испитивање и могу пружити нове приступе у терапијској стратегији периапексних гранулома и радикалних циста.

## **2.7. Начин презентирања резултата научној јавности**

Резултати овог истраживања су као оригинални научни рад публиковани у часописима међународног значаја, категорије M21 (*Velickovic M, Pejnovic N, Mitrovic S, Radosavljevic G, Jovanovic I, Kanjevac T, Jovicic N, Lukic A. ST2 deletion increases inflammatory bone destruction in experimentally induced periapical lesions in mice. J Endod 2015; 41(3): 369-375.; Velickovic M, Pejnovic N, Mitrovic S, Petrovic R, Jeftic I, Kanjevac T, Lukic A. Expression of interleukin-33 and its receptor ST2 in periapical granulomas and radicular cysts. J Oral Pathol Med 2015; doi: 10.1111/jop.12312.*).

Резултати спроведеног истраживања презентовани су на међународном научном скупу: 19<sup>th</sup> Congress of the Balkan Stomatological Society - BaSS. Belgrade, Serbia, 24<sup>th</sup> – 27<sup>th</sup> April 2014, у виду постер презентације.

## **ЗАКЉУЧАК**

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата Милене Д. Алексић под називом „Улога IL-33/ST2 сигналног пута у патогенези експерименталних

периапексних лезија” на основу свега наведеног оцењује да је истраживање у оквиру дисертације адекватно постављено и спроведено.

Комисија сматра да докторска дисертација кандидата Милене Д. Алексић, урађена под менторством проф. др Александре М. Лукић, има оригинални научни и практични значај у разумевању значаја и утицаја IL-33/ST2 сигналног пута на комплексну имунопатогенезу периапексних лезија.

На основу свега изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом „Улога IL-33/ST2 сигналног пута у патогенези експерименталних периапексних лезија” кандидата Милене Д. Алексић буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

#### **ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:**

**Проф. др Драгиња Којовић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Пародонтологија и орална медицина, председник

---

**Доц. др Иван Јовановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, члан

---

**Доц. др Гордана Радосављевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

---