

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА  
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

На IX редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 13.07.2016. године, прихваћен је извештај ментора др Александре Јауковић о урађеној докторској дисертацији **Иване Н. Окић Борђевић**, истраживача сарадника на Институту за медицинска истраживања под насловом „*Ефекти интерлеукина-17 на функционална својства хуманих мезенхимских матичних ћелија периодонцијума*“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

1. др Александра Јауковић, виши научни сарадник, Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду,
2. др Биљана Божић, ванредни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду,
3. др Јелена Крстић, научни сарадник, Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

**ИЗВЕШТАЈ**

**Општи подаци о докторској дисертацији:**

Докторска дисертација **Иване Н. Окић Борђевић** под називом: „*Ефекти интерлеукина-17 на функционална својства хуманих мезенхимских матичних ћелија периодонцијума*“ својом темом, циљевима, методолошким приступом, добијеним резултатима и њиховим тумачењем представља оригинални истраживачки допринос разумевању биологије и функционалних карактеристика мезенхимских матичних ћелија периодонцијума под утицајем интерлеукина (IL)-

17 укључујући пролиферацију, клоногени капацитет, миграцију, остеогену диференцијацију и имуномодулаторна својства ПД-ММЋ. Такође, одређивањем улоге сигналних путева у регулацији ових ефеката ИЛ-17 на ПД-ММЋ значајно се доприноси разјашњавању механизма деловања ИЛ-17 на ПД-ММЋ. Уз то, испитивањем ефеката ИЛ-17 на експресију ензима ПД-ММЋ који учествују у разградњи екстраћелијског матрикса као и механизма који су укључени у ове процесе додатно се проширују сазнања о комплексности деловања овог цитокина. Добијени резултати указују на јединственост биологије ММЋ изолованих из различитих извора и њихове интеракције са факторима средине и представљају основу будућим истраживањима у циљу примене ових ћелија у терапијске сврхе.

Докторска дисертација је у потпуности урађена у Лабораторији за експерименталну хематологију и матичне ћелије Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, у оквиру пројекта основних истраживања (ОИ175062) под називом „Регенеративни и модулаторни потенцијал адултних матичних ћелија“ финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. Докторска дисертација под наведеним насловом је написана на 135 страна и садржи 7 поглавља, 38 слика, 4 табеле, 279 литературних података и 1 прилог. На почетку дисертације приложени су резиме на српском и апстракт на енглеском језику (без пагинације). Пагинирани текст ове докторске дисертације састоји се од 7 поглавља и то: *Увод* (37 страна), *Циљеви* (3 стране), *Материјал и методе* (20 страна), *Резултати* (35 страна), *Дискусија* (14 страна), *Закључци* (2 стране) и *Литература* (25 страна).

### **Анализа докторске дисертације:**

Предмет докторске дисертације Иване Н. Окић Ђорђевић јесте проучавање утицаја интерлеукина-17 (ИЛ-17) на функционална својства хуманих мезенхимских матичних ћелија перидонцијума.

Поглавље **Увод** је подељено на 3 целине. У првом делу кандидаткиња описује појам мезенхимских матичних ћелија (ММЋ), њихове карактеристике и улогу у организму. Дат је историјат открића матичних ћелија, наведени су извори из којих

се ове ћелије могу изоловати и описани критеријуми за карактеризацију ММЋ. Описана су најновија сазнања о улози ММЋ у хомеостазу и репарацији оштећених ткива, као и њихова имуномодулаторна својства. На крају првог дела посебно детаљно су описане мезенхимске матичне ћелије периодонцијума (ПД-ММЋ), као и њихове регенеративне и имуномодулаторне особине. У другом делу поглавља кандидаткиња описује структуру, функције и механизме деловања плејотропног цитокина ИЛ-17. Наведени су до сада познати извори овог цитокина и објашњена структура ИЛ-17 рецептор-лиганд фамилије, као и сигнални путеви активирани овом фамилијом цитокина. Детаљно су описани многобројни биолошки ефекти ИЛ-17, укључујући и досадашња сазнања о деловању овог цитокина на различите функције ММЋ. У последњем делу уводног поглавља кандидаткиња описује појам, узроке и механизме развоја пародонтопатије, болести која утиче на здравље милиона људи широм света. Посебно су описане функције и улога ензима матриксних металопроотеиназа и урокиназног активатора плазминогена у разградњи екстраћелијског матрикса ткива периодонцијума у пародонтопатији. Додатно је дат преглед литературе о имунологији коштаног ткива са фокусом на механизме међусобних интеракција ћелија имунског и коштаног система који доприносе ресорпцији алвеоларне кости током пародонтопатије. Посебно су изнета досадашња сазнања везана за присуство Th17 ћелија у оболелом ткиву периодонцијума и улози ових ћелија у имунском одговору у пародонтопатији.

У поглављу **Циљеви истраживања** јасно су описани основни циљеви истраживања у оквиру ове дисертације који обухватају:

- 1) Изолацију и карактеризацију ММЋ из ткива периодонцијума здравих особа.
- 2) Испитивање утицаја и механизма деловања ИЛ-17 на функционална својства ПД-ММЋ, укључујући њихову пролиферацију, клоногени капацитет, миграцију и остеогену диференцијацију.
- 3) Испитивање утицаја и механизма деловања ИЛ-17 на експресију ензимски активних матриксних металопроотеиназа и урокиназног активатора плазминогена у ПД-ММЋ.
- 4) Испитивање утицаја ИЛ-17 на имуномодулаторне особине ПД-ММЋ.

У склопу испитивања механизма деловања IL-17 на наведене карактеристике ПД-ММЋ анализирана је активација и улога MAPK (енгл. *Mitogen activated protein kinase*) сигналних путева у остваривању ефеката овог цитокина.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** детаљно су описани експериментални протоколи за сваки од циљева, као и методе које су коришћене у овом истраживању. Описане су методе изолације, култивације и карактеризације ПД-ММЋ. За анализу специфичних ћелијских функција примењене су следеће методе: за анализу пролиферације коришћен је МТТ тест, док је клоногени капацитет анализиран CFU-F тестом, а миграција *Scratch* тестом. Диференцијација ПД-ММЋ у правцу остеогене, хондрогене и адипогене лозе индукована је култивацијом у оговарајућим медијумима. Описане су и различите методе за детекцију експресије протеина (проточном цитометријом, имуноцитохемијским обележавањем, зимографијом, као и Western blot методом) и гена (RT-PCR). Учешће MAPK сигналних путева у деловању IL-17 на ПД-ММЋ испитивано је детектовањем нивоа активације ових молекула коришћењем Western blot методе и применом одговарајућих фармаколошких инхибитора сигналних путева. Имуномодулаторна својства ПД-ММЋ испитивана су у тесту митогеном стимулисане пролиферације лимфоцита.

У поглављу **Резултати** кандидаткиња систематично и на детаљан начин представља резултате својих истраживања. Добијени резултати су приказани на 38 слика допуњених пратећим текстуалним објашњењима.

Везано за добијене резултате значајно је истаћи да су с обзиром на први постављени циљ ове дисертације, ПД-ММЋ успешно изоловане из ткива периодонцијума свих испитиваних донора и окарактерисане према критеријумима прописаним од стране Међународног друштва за ћелијску терапију. Када је реч о фенотипским маркерима које испољавају ПД-ММЋ, показано је да ове ћелије у високом проценту експримирају маркере карактеристичне за ММЋ (CD44, CD90, CD105, CD73 и CD29), уз одсуство експресије маркера хематопоеетских ћелија, док је анализом на протеинском и генском нивоу потврђено да ПД-ММЋ

експримирају и маркере ембрионалних матичних ћелија, укључујући Nanog, Sox-2, SSEA-4 и Oct-4. Поред тога, утврђено је да ПД-ММЋ експримирају рецептор за IL-17 и на протеинском и на генском нивоу.

Наредни део истраживања односио се на испитивање утицаја и механизма деловања IL-17 на функционална својства ПД-ММЋ. Што се тиче ефеката IL-17 на пролиферацију ПД-ММЋ, резултати ове докторске дисертације су показали да овај цитокин доводи до благог смањења пролиферације ПД-ММЋ након 24 часа инкубације. С обзиром на до сада познат стимулаторни утицај IL-17 на пролиферацију мишићних и хуманих ММЋ костне сржи, добијени резултати сугеришу на специфичности ПД-ММЋ које могу бити повезане и са њиховим неуроектодермалним пореклом. Резултати добијени испитивањем ефеката IL-17 на клоногени потенцијал ПД-ММЋ су показали да овај цитокин повећава учесталост колонија сличних фибробластима. У резултатима докторске дисертације Иване Окић Ђорђевић по први пут је показано смањење миграције ПД-ММЋ под утицајем IL-17. Такође, по први пут је указано и на инхибиторни ефекат IL-17 на остеогену диференцијацију хуманих ПД-ММЋ с обзиром да је присуство IL-17 довело како до смањене акумулације калцијума, тако и до смањене активности алкалне фосфатазе у култури ПД-ММЋ. Такође је утврђено да IL-17 индукује смањење експресије гена маркера остеогене диференцијације: за алкалну фосфатазу (ALP) и остеокалцин (Ocn). Резултати су такође показали да се инхибиторни ефекат IL-17 на остеогену диференцијацију ПД-ММЋ остварује путем активације ERK1,2 и JNK MAPK сигналних путева. С обзиром на до сада показано стимулаторно дејство овог цитокина на остеогену диференцијацију хуманих ММЋ костне сржи може се претпоставити да локална микросредина, као и ткивно порекло ММЋ могу имати утицај на природу испољеног дејства IL-17 на диференцијацију ПД-ММЋ.

У следећем сегменту истраживања у контексту разумевања механизма деловања IL-17 у развоју и прогресији пародонтопатије испитивана је способност IL-17 да модулише експресију ензима укључених у разградњу компоненти екстраћелијског матрикса, матриксних металопротеиназа (ММР) и урокиназног активатора плазминогена (uPA) у ПД-ММЋ. Литературни подаци о утицају IL-17 на експресију ММР и uPA у ћелијама ткива периодонцијума су веома ретки, а

резултати истраживања у оквиру ове докторске дисертације су по први пут показали да IL-17 индукује повећање ензимске активности и експресије протеина и гена за MMP-2 и uPA у ПД-ММЋ активацијом ERK1,2 MAPK сигналног пута.

У последњем сегменту истраживања у оквиру ове докторске дисертације испитиван је утицај IL-17 на имуномодулаторна својства ПД-ММЋ при чему је утврђено да ПД-ММЋ слично ММЋ изолованим из костне сржи инхибирају митогеном стимулисану пролиферацију мононуклеарних ћелија периферне крви. Добијени резултати су такође показали да IL-17 нема утицаја на имуносупресорска својства ПД-ММЋ. Анализом генске експресије молекула повезаних са имуномодулаторним деловањем ПД-ММЋ утврђено је да IL-17 нема утицаја на експресију HLA (од енгл. *Human leukocyte antigen*) -A, док доводи до смањења генске експресије HLA-G у ПД-ММЋ. Такође је показано да IL-17 индукује повећање генске експресије HLA-DR у ПД-ММЋ али да нема утицаја на површинску експресију овог молекула. Уз то, показан је стимулаторни ефекат IL-17 на експресију гена за IDO-1 (од енгл. *Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1*) и IL-6 у ПД-ММЋ. Према добијеним резултатима, IL-17 сам не мења имуносупресорско дејство ММЋ на пролиферацију Т лимфоцита али има потенцијал да индукује експресију имуномодулаторних молекула. Из свега наведеног може се претпоставити да би IL-17 у другим околностима (пр. заједно са другим факторима) могао модулисати имуномодулаторна својства ПД-ММЋ, али овај исказ захтева потврду у будућим истраживањима.

Добијени подаци испитивања утицаја IL-17 на функционална својства ПД-ММЋ указују на потенцијалне механизме деловања IL-17 у развоју пародонтопатије и истичу комплексност биологије ММЋ и њихових интеракција са факторима микросредине постављајући основу за будућа истраживања у циљу проналажења нових модалитета лечења овог широко распрострањеног инфламаторног обољења.

У поглављу **Дискусија** кандидаткиња је критички анализирила своје резултате које је на детаљан и свеобухватан начин повезала са резултатима сличних истраживања објављеним у међународним научним часописима. На основу тога, кандидаткиња је изнела закључке и хипотезе које објашњавају резултате ове

докторске дисертације у контексту података који постоје у савременој литератури, а тичу се сличне проблематике. Такође, резултати истраживања непознати научној литератури и показани по први пут анализирани су и објашњени на одговарајући начин.

У поглављу **Закључци** јасно су сумирани закључци изведени на основу резултата добијених у овом раду:

- Успешно су изоловане и окарактерисане (према предложеним критеријумима Међународног друштва за ћелијску терапију) хумане ПД-ММЋ
- IL-17 инхибира пролиферацију и миграцију ПД-ММЋ након 24h инкубације
- IL-17 инхибира остеогену диференцијацију а овај процес је посредован МАРК сигналним путевима
- IL-17 индукује повећану ензимску активност, протеинску и генску експресију MMP-2 и uPA у ПД-ММЋ активацијом МАРК.
- IL-17 нема утицаја на способност ПД-ММЋ да инхибирају пролиферацију митогеном стимулираних Т лимфоцита али има потенцијал да индукује експресију имуномодулаторних молекула.

У поглављу **Литература** наведено је 279 библиографских јединица. Приказане научне публикације су у складу са областима које су од значаја за урађену докторску дисертацију и адекватно и на одговарајућим местима су цитиране у тексту докторске дисертације.

## Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

### Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Dorđević IO**, Kukolj T, Krstić J, Trivanović D, Obradović H, Santibañez JF, Mojsilović S, Ilić V, Bugarski D, Jauković A. *The inhibition of periodontal ligament stem cells osteogenic differentiation by IL-17 is mediated via MAPKs. Int J Biochem Cell Biol.* 2016 Feb;71:92-101.

**M21**

2. Trivanović D, Jauković A, Popović B, Krstić J, Mojsilović S, **Okić-Djordjević I**, Kukolj T, Obradović H, Santibanez JF, Bugarski D. *Mesenchymal stem cells of different origin: Comparative evaluation of proliferative capacity, telomere length and pluripotency marker expression. Life sciences* 2015, doi:10.1016/j.lfs.2015.09.019.

**M22**

3. Miletić M, Mojsilović S, **Okić Dorđević I**, Kukolj T, Jaković A, Santibanez JF, Jovčić G, Bugarski D. *Mesenchymal stem cells isolated from human periodontal ligament. Archives of Biological Sciences* 2014; 66 (1), 261-27. IF(2012) 0.791.

**M22**

### Б2. Радови у часописима домаћег значаја

1. **M**
2. **M**

### Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **M**
2. **M**

### Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **M**
2. **M**



## **Мишљење и предлог Комисије:**

На основу прегледа докторске дисертације Иване Н. Окић Ђорђевић под насловом „Ефекти интерлеукина-17 на функционална својства хуманих мезенхимских матичних ћелија периодонцијума“ Комисија је мишљења да овај рад представља оригиналан и значајан научни допринос у области имунобиологије и биологије ћелија и ткива. По свом садржају и форми, добро написаном уводном делу, јасно постављеним истраживачким циљевима, добро осмишљеној методологији, прецизно изнетим резултатима рада, разложној дискусији и добро формулисаним закључцима ова докторска дисертација испуњава све критеријуме добро написаног научног рада.

Свеобухватна истраживања ефеката и механизма деловања ИЛ-17 на различите функције мезенхимских матичних ћелија периодонцијума приказана у докторској дисертацији Иване Н. Окић Ђорђевић допринела су разумевању разноврсности деловања овог цитокина у специфичној микросредини ткива периодонцијума. Добијени резултати истичу комплексност биологије мезенхимских матичних ћелија и њихових интеракција са факторима из окружења. Концепт дисертације је јасан, а методолошки приступ у складу са истраживањима из области ћелијске биологије и имунобиологије. Значају докторске дисертације доприносе резултати пионирских истраживања утицаја ИЛ-17 на остеогену диференцијацију ПД-ММЋ, као и експресију ензима који активно учествују у разградњи екстраћелијског матрикса ткива периодонцијума.

На основу свега изложеног, као и чињенице да је кандидаткиња Ивана Н. Окић Ђорђевић испунила све формалне услове за одбрану докторске дисертације под насловом „ *Ефекти интерлеукина-17 на функционална својства хуманих мезенхимских матичних ћелија периодонцијума*“, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да усвоји извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације Иване Н. Окић Ђорђевић.

**КОМИСИЈА:**

---

др Александра Јауковић, виши научни  
сарадник, Институт за медицинска  
истраживања,  
Универзитет у Београду

---

Проф. др Биљана Божић, ванредни професор,  
Биолошки факултет,  
Универзитет у Београду

---

др Јелена Крстић, научни сарадник,  
Институт за медицинска истраживања,  
Универзитет у Београду

У Београду, 01.09.2016. године.

