

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
STOMATOLOŠKOG FAKULTETA U BEOGRADU

Odlukom Nastavno-naučnog veća Stomatološkog fakulteta u Beogradu, donetom na redovnoj sednici održanoj 25.5.2021. godine, imenovani smo u komisiju za ocenu završene doktorske disertacije dr Jelene Simonović sa naslovom

**"IZOLACIJA, KARAKTERIZACIJA I UPOREDNA ANALIZA POTENCIJALA
ZA NEURODIFERENCIJACIJU MATIČNIH ĆELIJA POREKLOM IZ RAZLIČITIH
ZUBNIH TKIVA"**

Na osnovu priloženog materijala, komisija u sastavu: prof. dr Vesna Danilović i prof. dr Zoran Vulićević sa Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i prof. dr Pavle Anđus sa Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, podnosi Nastavno-naučnom veću sledeći

IZVEŠTAJ

Dr Jelena Simonović je rođena 14.08.1988. u Beogradu gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Oba nivoa školovanja završila je kao nosilac Vukove diplome. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2007. godine, a 2012. godine je diplomirala sa prosečnom ocenom 9,02.

Pripravnički staž je obavila na istom Fakultetu, nakon čega je položila državni ispit.

Upisala je doktorske studije na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2013. godine, u okviru kojih je položila sve ispite sa prosečnom ocenom 9,93.

Od januara 2014. godine je angažovana kao istraživač pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. 175075 "Genetička kontrola i molekularni mehanizmi u malignim, inflamatornim i razvojnim patologijama orofacijalne regije", a od 2017. godine je zaposlena na pomenutom projektu kao istraživač saradnik. Od školske 2014/2015, angažovana je kao saradnik u nastavi, a 2018. godine je izabrana za asistenta na

predmetu Opšta i oralna histologija i embriologija u okviru integrisanih akademskih studija Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Do sada je objavila 5 naučnih radova iz kategorije M20, imala je 13 saopštenja na međunarodni skupovima, jedno predavanje na međunarodnom kongresu za koje je nagrađena, i dva saopštenja na domaćim skupovima.

Nastavno-naučno Veće Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu je na sednici u školskoj održanoj 26.04.2016. godine usvojilo pozitivan izveštaj stručne komisije za ocenu predloga teme, i imenovalo prof. dr Jelenu Milašin za mentora ove doktorske disertacije.

Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija dr Jelene Simonović, s naslovom "Izolacija, karakterizacija i uporedna analiza potencijala za neurodiferencijaciju matičnih ćelija poreklom iz različitih zubnih tkiva", izložena je na 90 stranica u poglavljima SAŽETAK, ABSTRACT, UVOD, CILJEVI ISTRAŽIVANJA, MATERIJAL I METODE, REZULTATI, DISKUSIJA, ZAKLJUČCI i LITERATURA. Tekst je dokumentovan sa 42 slike, 7 grafikona i 6 tabela.

U **Uvodnom poglavlju**, dr Simonović ukazuje na značaj matičnih ćelija sa stanovišta razumevanja procesa regeneracije tkiva, regenerativne medicine i tkivnog inženjerstva. Objašnjava da matične ćelije predstavljaju nespecijalizovane ćelije koje imaju sposobnost samoobnavljanja i mogućnost diferenciranja u veći broj specijalizovanih ćelija, jasno opisuje kriterijume koje ćelije treba da ispune da bi se smatrale matičnim ćelijama, daje različite sisteme klasifikacije matičnih ćelija i navodi razlike i sličnosti između adultnih mezenhimalnih matičnih ćelija različitog porekla. Posebno se zadržava na opisu matičnih ćelija izolovanih iz brojnih tkiva orofacijalne regije kao što su matične ćelije iz pulpe stalnih i mlečnih zuba, periodoncijuma, apikalne papile, dentalnog folikula, zubnog zametka, gingive, i dr. Glavni fokus je na ćelijama apikalne papile, dentalnog folikula i pulpe impaktiranih trećih molara. Takođe ističe značaj njihovog ektomezenhimalnog porekla u neurodiferencijaciji, kao i potencijal za diferencijaciju u ćelije drugih tkiva.

Ukazano je i na važnu činjenicu da su ove ćelije lako dostupne, da imaju izuzetan potencijal diferencijacije i da predstavljaju jedan od trenutno najpodesnijih izvora mezenhimalnih matičnih ćelija. Poslednji deo uvoda posvećen je literaturnim podacima vezanim za pretkliničku i

kliničku upotrebu dentalnih matičnih ćelija, naglašavajući njihov veliki potencijal u regenerativnoj medicini na polju terapije neurodegenerativnih oboljenja i povreda kičmene moždine, mišićnih distrofija, infarkta miokarda, terapiji koštano-zglobnih oboljenja, dijabetesa, oboljenja jetre, kao i u regenerativnoj terapiji oralnih tkiva.

U poglavlju **Ciljevi istraživanja** taksativno su navedeni ciljevi kroz sedam jasno i precizno definisanih stavki, a to su optimizacija izolacije i kultivacije matičnih ćelija pulpe, apikalne papile i dentalnog folikula trećeg molara, fenotipska identifikacija i karakterizacija sva tri tipa mezenhimalnih matičnih ćelija primenom protočne citometrije i kvantitativnog PCR-a, određivanje klonogenog potencijala izolovanih ćelija i potencijala diferencijacije mezenhimalnih matičnih ćelija, kao i uporedna biohemijska analiza sva tri tipa matičnih ćelija primenom ramanske mikrospektroskopije, zatim neuroindukcija matičnih ćelija, sa i bez nanomaterijala i dokazivanje uspešnosti neuroindukcije.

Dr Simonović je obavila adekvatna istraživanja čiju metodologiju opisuje u poglavlju – **Materijal i metode**. Precizno se objašnjavaju selekcija i izbor trećih molara pogodnih za izolovanje matičnih ćelija pulpe, apikalne papile i folikula, a zatim se prikazuje metoda izolacije matičnih ćelija sva tri tkiva bez enzimske digestije („Growth explant“ metod) korišćen u ovom istraživanju. Autor detaljno prikazuje metodologiju korišćenu za kultivisanje ovih ćelija, pasažiranje, kao i uslove krioprezervacije i odmrzavanja. Za dokazivanje ekspresije mezenhimalnih markera i odsustvo ekspresije hematopoetskih, korišćena je metoda protočne citometrije. Posmatrana je ekspresije membranskih markera CD34, CD45, CD73, CD90 i CD105. Potencijal za diferencijaciju ispitivan je diferencijacijom uz pomoć komercijalnih kitova u osteogenu, hondroenu i adipogenu lozu, a uspešnost diferencijacije proveravana je adekvatnim bojenjem i invertnom mikroskopijom (Alizarin Red S - osteogena, Safranin O – hondrogena, Oil Red O - adipogena). Detaljno su objašnjeni postupci, izolacije RNK i DNK, reverzne transkripcije i Real Time PCR metode koje su korišćene radi utvrđivanja ekspresije markera matičnosti, osteogene, adipogene, hondrogene i neurogene diferencijacije, kao i utvrđivanje dužina telomere nakon većeg broja pasaža, kao i pre i nakon neurodiferencijacije. Dr Simonović detaljno opisuje i uslove pod kojima su ćelije sva tri tkiva posmatrane Ramanskom spektromikroskopijom. Poslednji deo ovog poglavlja posvećen je neuroindukciji matičnih ćelija izolovanih iz tri navedena tkiva, a zatim i uporednoj analizi protokola za neurodiferencijaciju, sa i bez nanomaterijala, kao i dokazivanju uspešnosti diferencijacije pomoću Real Time PCR metode,

imunocitohemije, a i potvrđivanjem promene njihove morfologije invertnom mikroskopijom, mikroskopijom atomskih sila i skening elektronskom mikroskopijom. Na kraju su opisani i uslovi transplantacije matičnih ćelija intratekalno u životinjske modele amiotrofične lateralne skleroze.

U poglavlju **Rezultati** navedeni su sistematično, dokumentovano i koncizno podaci do kojih je autor u svojim istraživanjima došao. Rezultati su prikazani kroz 7 grafikona, 32 slike, 1 tabelu. Pokazano je da su izolovane ćelije imale tipičnu morfologiju i visoku ekspresiju mezenhimalnih membranskih markera, uz odsustvo hematopoetskih. Adekvatnim bojenjem i invertnom mikroskopijom dokazana je uspešna diferencijacija u tri ćelijske loze. Ramanskom spektromikroskopijom pokazana je najveća nezrelost matičnih ćelija apikalne papile. Dokazan je potencijal matičnih ćelija apikalne papile, pulpe i folikula ka neurogenoj diferencijaciji, a Real Time PCR metodom potvrđena, je ekspresija neuralnih markera (beta III tubulin, NeuN, MAP2, ngn2) a najviša je bila u slučaju matičnih ćelija apikalne papile. S obzirom na rezultate Ramanske spektromikroskopije i poređenja tri tipa ćelija u kapacitetu neurodiferencijacije, odabrane su ćelije apikalne papile za nastavak istraživanja. Poredeći protokole neurodiferencijacije sa i bez nanomaterijala, najbolji rezultati ostvareni su u prisustvu grafenske disperzije. U delu rezultata koji se odnosio na transplantaciju humanih matičnih ćelija u ALS pacove, pokazano je naseljavanje ćelija u prednje robove kičmene moždine nakon aplikacije. Dat je i ilustrativni prikaz pojave simptoma i toka bolesti nakon aplikacije matičnih ćelija.

U **Diskusiji** disertacije, kandidatkinja je sistematično, stručno i jasno obrazložila dobijene rezultate i uporedila ih sa rezultatima drugih autora. Citirani literaturni podaci su kritički odabrani, aktuelni i doprinose u znatnoj meri rasvetljavanju problematike kojom se kandidatkinja bavi. Komentari sopstvenih rezultata autora su adekvatni, analitični i detaljni.

Zaključci daju odgovore na postavljene ciljeve, i jasno su i taksativno formulisani. Autor ističe da se matične ćelije pulpe, apikalne papile i folikula zuba mogu uspešno i lako izolovati, sva tri tipa ćelija su pokazale neophodne karakteristike kako bi se okarakterisale kao matične. Ramanskom spektromikroskopijom je pokazana najveća stopa matičnosti ćelija apikalne papile, dok su ćelije pulpe bile najzrelije. Matične ćelije sva tri zubna tkiva mogu se uspešno neuroindukovati, što je pokazano visokom ekspresijom markera nervnih ćelija. Neuroindukcija se može potpomoći upotrebom nanomaterijala, posebno se ističe pozitivan efekat grafenske

disperzije na neurodiferencijaciju. Dokazana je i migracija transplantiranih matičnih ćelija kranio-kaudalno u odnosu na mesto injektovanja i naseljavanja prednjih rogova kičmene moždine.

Uporedna analiza rezultata autora sa rezultatima iz literature

Rezultati ovog istraživanja su potvrdili do sada poznate osobine matičnih ćelija iz pulpe, apikalne papile i folikula zuba. Pokazano je da se ove ćelije uspešno i lako izoluju, da ekspimiraju visok nivo mezenhimalnih markera i lako se diferentuju u osteogenu, hondrogenu i adipogenu lozu, što je u skladu sa do sada objavljenim literaturnim podacima. Takođe je pokazan i njihov potencijal za neurogenu diferencijaciju, što je u skladu sa ektomezenhimalnim poreklom ovih ćelija. Originalnost istraživanja se ogleda u komparativnoj analizi tri vrste dentalnih matičnih ćelija primenom ramanske mikrospektroskopije i utvrđivanja da se one razlikuju po stepenu diferentovanosti, odnosno matičnosti. Ustanovljeno je da su “najmlađe”, što znači i najpotentnije u smislu kapaciteta diferencijacije, matične ćelije apikalne papile. Ovo istraživanje je takođe prvo koje je pokazalo superiornost procesa neurodiferencijacije ćelija apikalne papile u prisustvu nanomaterijala koji do sada nije korišćen u ove svrhe, a to je grafenska disperzija.

Poglavlje **Literatura** sadrži 200 bibliografskih jedinica citiranih iz relevantne literature.

Objavljeni rezultati koji čine deo teze

Autor je objavio dva rada koja čine sastavni deo doktorske disertacije

1. Simonovic J, Toljic B, Raskovic B, Jovanovic V, Lazarevic M, Milosevic M, Nikolic N, Panajotovic R, Milasin J (2019) Raman microspectroscopy: toward a better distinction and profiling of different populations of dental stem cells, CROATIAN MEDICAL JOURNAL, vol. 60, br. 2, str. 78-86 (**M22**)
2. Simonovic J, Toljic B, Nikolic N, Peric M, Vujin J, Panajotovic R, Gajic R, Bekyarova E, Cataldi A, Parpura V, Milasin J (2018) Differentiation of stem cells from apical papilla into neural lineage using graphene dispersion and single walled carbon nanotubes, JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART A, vol. 106, br. 10, str. 2653-2661 (**M21**)

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampano u izvodu koja čine sastavni deo doktorske disertacije:

1. Toljic B, **Simonovic J**, Vujin J, Gottipati M, Nikolic N, Milasin J. Nanomaterials and neurodifferentiation of dental stem cells, AARC – 2nd PhD Student's Conference, From food to health, August 28-30.2017, Trieste, Italy
2. **Simonovic J**, Toljic B, Nikolic N, Carkic J, Miljkovic D, Milasin J. Neurodifferentiation of dental stem cells from apical papilla using single wall carbon nano-tubes and liquid graphene, European Neuroscience Conference for Doctoral Students, 29. June – 1. July, 2016, Copenhagen, Denmark.
3. **Simonovic J**, Toljic B, Nikolic N, Carkic J, Miljkovic D, Milasin J. Comparison of different protocols for neurodifferentiation of dental stem cells from apical papilla, International Society for Developmental Neuroscience, May 11-14. 2016, Antibes – Juan les Pins, France.
4. **Simonovic J**, Toljic B, Milosevic M, Trisic D, Lazarevic M, Nikolic N, Carkic J, Miljkovic D, Milasin J. High expression of neural markers in stem cells from tooth apical papilla following induction, 11th Balkan Congress of Human Genetics, September 17-20. 2015, Belgrade, Serbia.
5. **Simonovic J**, Toljic B, Milosevic M, Trisic D, Lazarevic M, Carkic J, Tredici G, Damante G, Miljkovic D, Milasin J. Neurogenic potential of stem cells from tooth apical papilla, Glowbrain final conference, May 27-31. 2015, Zagreb, Croatia.

Saopštenja sa domaćih skupova štampano u izvodu koja čine sastavni deo doktorske disertacije:

1. **Simonović J**, Toljić B, Čarkić J, Lazarević M, Milošević M, Trišić D, Miljković Đ, Milašin J. Izolacija i karakterizacija matičnih ćelija iz apikalne papile impaktiranog umnjaka, Naučni skup povodom obeležavanja 67. godišnjice Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu "Dostignuća i stremljenja u stomatologiji", 17-19. jun 2015, Beograd, Srbija.

Zaključak

Doktorska disertacija dr Jelene Simonović predstavlja dobro dizajniranu studiju koja daje značajan doprinos u razumevanju potencijala matičnih ćelija zubnih tkiva u regenerativnoj terapiji nervnog i drugih tkiva. Komisija smatra da su ostvareni svi ciljevi postavljeni u prijavi

doktorske disertacije, rezultati su jasno predstavljeni i interpretirani, a diskusija je detaljna i sveobuhvatna. Velika vrednost ove doktorske disertacije su konkretne informacije o načinu izolacije, kultivacije, diferencijacije -posebno neurodiferencijacije, sa akcentom na upotrebu nove generacije nanomaterijala. Nakon uvida u dostavljeni tekst, komisija je jednoglasno ocenila da doktorska disertacija pod naslovom : "IZOLACIJA, KARAKTERIZACIJA I UPOREDNA ANALIZA POTENCIJALA ZA NEURODIFERENCIJACIJU MATIČNIH ĆELIJA POREKLOM IZ RAZLIČITIH ZUBNIH TKIVA " predstavlja originalno, samostalno i detaljno dokumentovano istraživanje.

Doktorska disertacija ispunjava sve kriterijume propisane Zakonom o Univerzitetu i statutima Univerziteta i Stomatološkog Fakulteta u Beogradu. Na osnovu iznetog, predlažemo Nastavno-naučnom Veću Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, da prihvati izveštaj i odredi datum javne odbrane ove doktorske disertacije.

U Beogradu, 28. maj 2021. godine

Prof. dr Vesna Danilović

Prof. dr Zoran Vulićević

Prof. dr Pavle Anđus