

**Nastavno-naučnom veću Stomatološkog fakulteta
Univerziteta u Beogradu**

Na redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu održanoj 28.02.2017. godine, imenovana je Komisija u sastavu:

Prof. dr Aleksa Marković, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Jelena Milašin, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Doc. dr Maja Miletić, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Doc. dr Katarina Beljić-Ivanović, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Tanja Jovanović, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu,

za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom **DETEKCIJA I GENOTIPIZACIJA HUMANOG CITOMEGALOVIRUSA I EPŠTAJN-BAR VIRUSA U HRONIČNIM PERIAPIKALNIM LEZIJAMA**

Kandidat: dr Aleksandar Jakovljević

Mentor: Doc. dr Miroslav Andrić

Komentor: Prof. dr Aleksandra Knežević

Imenovana Komisija je proučila doktorsku disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Aleksandra Jakovljevića pod nazivom **DETEKCIJA I GENOTIPIZACIJA HUMANOG CITOMEGALOVIRUSA I EPŠTAJN-BAR VIRUSA U HRONIČNIM PERIAPIKALNIM LEZIJAMA** napisana je na 136 strana, uz prikaz 31 tabele, 6 grafikona i 255 referenci iz savremene, značajne naučne literature. Disertacija sadrži: sažetak na srpskom i engleskom jeziku, uvod, naučnu osnovu problema sa hipotezama, ciljeve istraživanja, materijal i metode, rezultate, diskusiju, zaključke i literaturu.

U **Uvodu** je najpre izvršena definicija, klasifikacija i epidemiologija hroničnih periapikalnih lezija. Potom je ukazano na vrste etioloških faktora koje mogu dovesti do nekroze pulpnog tkiva i posledičnog nastanka akutnog i hroničnog zapaljenja u apeksnom parodontijumu. Sa posebnom pažnjom je objašnjena uloga mikroorganizama, pre svega bakterija i njihovih faktora virulencije koji se smatraju osnovnim uzočnicima nastanka periapikalnih lezija. Pored toga, prikazan je i savremeni koncept patogeneze periapikalnih lezija. Imajući u vidu da su prethodna istraživanja ukazala na potencijalnu ulogu pojedinih virusa iz porodice *Herpesviridae* u patogenezi periapikalnih lezija predstavljene su osnovne karakteristike navedene porodice virusa, kao i specifične karakteristike HCMV i EBV. Takođe, sistematski su prikazana dosadašnja istraživanja i ukazano je na najznačajnije rezultate na polju uloge herpesvirusa u patogenezi hroničnih periapikalnih lezija. Iako različiti genotipovi HCMV i EBV imaju uticaj na ispoljavanje kliničke slike pojedinih oboljenja, ukazano je na nedostatak istraživanja na polju uloge različitih genotipova HCMV i EBV u patogenezi periapikalnih lezija. Uzimajući u obzir značaj proinflammatoryh citokina u procesu razgradnje alveolarnog koštanog tkiva prikazane su opšte karakteristike citokina, kao i specifične karakteristike TNF- α , IL-1 β i IL-6. U poslednjem delu ovog poglavlja prikazan je pregled istraživanja koja su izučavala vezu između proinflammatoryh citokina i herpesvirusa u patogenezi hroničnih periapikalnih lezija.

Ciljevi istraživanja su precizno definisani: Utvrditi učestalost prisustva i broj genskih kopija HCMV i EBV u uzorcima tkiva hroničnih periapikalnih lezija; Utvrditi učestalost prisustva i broj genskih kopija HCMV i EBV u uzorcima zdravog tkiva zubne pulpe intaktnih donjih trećih molara; Uporediti odnos kliničkog, radiološkog i patohistološkog nalaza pacijenata eksperimentalne grupe sa prisustvom i brojem genskih kopija HCMV i EBV; Utvrditi prisustvo različitih genotipova HCMV i EBV u tkivima eksperimentalne i kontrolne grupe ispitanika;

Odrediti koncentraciju proinflammatoryh citokina (TNF- α , IL-1 β i IL-6) u uzorcima tkiva eksperimentalne i kontrolne grupe ispitanika; Ustanoviti da li postoji korelacija između koncentracije proinflammatoryh citokina (TNF- α , IL-1 β i IL-6) i prisustva i broja genskih kopija HCMV i EBV u uzorcima hroničnih periapikalnih lezija.

U poglavlju **Materijal i metod** za ovu kliničko-laboratorijsku studiju preseka dati su jasno definisani kriterijumi za uključivanje i isključivanje pacijenata sa hroničnim periapikalnim lezijama čiji su uzorci tkiva sačinjavali eksperimentalnu grupu istraživanja, kao i pacijenata kod kojih je indikovano hirurško vađenje umnjaka čiji su uzorci zdravog pulpnog tkiva sačinjavali kontrolnu grupu istraživanja. U delu ovog poglavlja koji se odnosi na klinički deo istraživanja detaljno je prikazan postupak uzimanja anamneze, kliničkog i radiološkog pregleda, kao i postupak prikupljanja uzoraka obe grupe istraživanja. Pored toga, u okviru laboratorijskog dela jasno i pregledno su prikazani postupci izolacije DNK, detekcije, genotipizacije i određivanja broja genskih kopija HCMV i EBV upotrebom *nested* PCR, *real-time* PCR i RFLP metoda. Takođe, jasno i pregledno je prikazan postupak određivanja koncentracije proinflammatoryh citokina (TNF- α , IL-1 β i IL-6) u uzorcima hroničnih periapikalnih lezija i zdravog pulpnog tkiva upotrebom ELISA metode. U statističkoj obradi podataka navedeni su svi racionalno upotrebljeni statistički testovi.

Rezultati su prikazani u 6 poglavlja. U prvom poglavlju prikazane su demografske karakteristike pacijenata obe grupe ispitivanja. Takođe, prikazana je distribucija pacijenata eksperimentalne grupe u odnosu na kliničke, radiološke i patohistološke karakteristike hroničnih periapikalnih lezija. U drugom poglavlju, prikazani su rezultati sekvenciranja *nested* PCR HCMV i EBV pozitivnih uzoraka. Treće, četvrto i peto poglavlje sadrži prikaz rezultata učestalosti detekcije, genotipizacije i broja genskih kopija HCMV i EBV virusa u hroničnim periapikalnim lezijama i zdravom pulpnom tkivu. S tim u vezi, u navedenim poglavljima komparativno je prikazana učestalost detekcije, genotipizacije i broja genskih kopija HCMV i EBV između hroničnih periapikalnih lezija i zdravog pulpnog tkiva, kao i između hroničnih periapikalnih lezija sa različitim kliničkim, radiološkim i patohistološkim karakteristikama. U šestom poglavlju prikazane su izmerene vrednosti proinflammatoryh citokina (TNF- α , IL-1 β i IL-6) u tkivima hroničnih periapikalnih lezija i zdravom pulpnom tkivu. Takođe, komparativno su prikazane

vrednosti TNF- α , IL-1 β i IL-6 između hroničnih periapikalnih lezija sa različitim kliničkim, radiološkim i patohistološkim karakteristikama, kao i u HCMV i EBV pozitivnim i negativnim uzorcima periapikalnih lezija. U poslednjem delu ovog poglavlja prikazana je korelacija između izmerenih vrednosti TNF- α , IL-1 β i IL-6 i broja genskih kopija HCMV i EBV u periapikalnim lezijama.

U **Diskusiji** su naučnom analizom dobijenih rezultata objašnjeni značajnija učestalost detekcije i povećan broj genskih kopija HCMV i EBV, te učestalije prisustvo genotipova HCMV gB-II i EBV-1 u hroničnim periapikalnim lezijama u odnosu na zdravo pulpno tkivo. Takođe, objašnjen je i nalaz povećanih koncentracija IL-1 β i IL-6 u tkivu periapikalnih lezija u odnosu na kontrolno pulpno tkivo, kao i između simptomatskih i asimptomatskih periapikalnih lezija. Istovremeno, dobijeni rezultati su upoređeni sa nalazima dosadašnjih savremenih istraživanja u ovoj oblasti.

Na osnovu iznetih i diskutovanih rezultata uobličeni su **Zaključci** koji predstavljaju jasne odgovore na postavljene ciljeve.

Korišćena **Literatura** sadrži spisak od 255 referenci iz savremene i značajne naučne literature koje su adekvatno citirane u radu.

B. Kratak opis postignutih rezultata

HCMV i EBV bili su statistički značajnije detektovani u uzorcima hroničnih periapikalnih lezija u odnosu na zdravo pulpno tkivo. Analiza rezultata pokazala je značajno veću učestalost detekcije EBV koji je bio prisutan u dve trećine uzorka, u odnosu na HCMV, koji je bio detektovan u polovini ispitivanih uzoraka hroničnih periapikalnih lezija. S druge strane, statistička analiza nije pokazala postojanje značajne razlike u detekciji HCMV i EBV između simptomatskih i asimptomatskih, velikih i malih periapikalnih lezija, te periapikalnih granuloma i radikularnih cisti.

Analiza detekcije genotipova EBV pokazala je prisustvo oba genotipa EBV u ispitivanom uzorku. EBV-1 je bio statistički značajno češće detektovan u EBV *nested PCR* pozitivnim uzorcima periapikalnih lezija (u 74 od 76 uzoraka) u odnosu na EBV-2 (u 6 od 76 uzoraka). S druge strane, u ispitivanom uzorku od moguća 4 genotipa HCMV bila su detektovana samo 2 genotipa, i to gB-

I i gB-II. Analiza rezultata pokazala je da je HCMV genotip gB-II bio značajno češće detektovan u odnosu na gB-I u ispitivanom uzorku. I u slučaju učestalosti detekcije različitih genotipova EBV i HCMV nije postojala značajna razlika između periapikalnih lezija sa različitim kliničkim, radiološkim i patohistološkim karakteristikama.

Analiza broja genskih kopija EBV pokazala je da je povećan broj genskih kopija EBV bio prisutan u 12 od 76 *nested PCR* pozitivnih uzoraka periapikalnih lezija (15.8%). Prosečan broj kopija EBV iznosio je 6.3×10^5 po ml, dok je standardna devijacija iznosila $\pm 1.1 \times 10^6$ kopija/ml. Broj genskih kopija HCMV bio je povećan u svega 4 od 54 *nested PCR* pozitivna uzorka periapikalnih lezija (7.4%). Broj detektovanih HCMV kopija varirao je u opsegu 1×10^3 do 5.4×10^6 po ml. Prosečan broj kopija HCMV iznosio je 1.4×10^6 po ml, dok je standardna devijacija iznosila $\pm 2.7 \times 10^6$ kopija/ml.

Analiza dobijenih vrednosti proinflamatornih citokina pokazala je da su vrednosti IL-1 β i IL-6 bile statistički značajno veće u periapikalnim lezijama u odnosu na kontrolno pulpno tkivo. Takođe, vrednosti IL-1 β i IL-6 bile su značajno veće u simptomatskim u odnosu na asimptomatske periapikalne lezije. Pored toga, vrednosti IL-1 β bile su značajno veće u velikim u odnosu na male periapikalne lezije i u radikularnim cistama u odnosu na periapikalne granulome. Statistička analiza je pokazala da nije bilo razlike u vrednostima proinflamatornih citokina između EBV i HCMV pozitivnih i negativnih periapikalnih lezija. Takođe, nije uočena značajna korelacija između povećanog broja genskih kopija EBV i HCMV i nivoa proinflamatornih citokina u ispitivanom uzorku.

C. Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Mnogobrojna dosadašnja istraživanja ispitivala su prisustvo herpesvirusa u tkivima hroničnih periapikalnih lezija. Do sada, Andrić i saradnici su 2007. godine sprovedi jedino istraživanje na našoj populaciji u okviru kojeg je ispitivano prisustvo HCMV u tkivima odontogenih cisti, uključujući i radikularne ciste, kao predstavnike hroničnih periapikalnih lezija. Analiza učestalosti HCMV pokazala je da je HCMV bio prisutan u 18 od 33 uzorka radikularnih cisti (54.5 %) i u 6 od 10 uzoraka odontogenih keratocističnih tumora (60 %) (Andric i sar. 2007).

U okviru ove doktorske disertacije, po prvi put, ispitivano je prisustvo oba herpesvirusa, HCMV i EBV u 100 uzoraka periapikalnih lezija i 25 uzoraka kontrolnog pulpnog tkiva naše populacije. Dobijeni rezultati istraživanja su u skladu sa ranije publikovanim studijama koje su pokazale da su herpesvirusi češće detektovani u tkivima periapikalnih lezija u odnosu na zdravo kontrolno tkivo (Li i sar. 2009, Hernadi i sar. 2013). Tako su Li i saradnici pokazali da je EBV bio značajno učestaliji u tkivima periapikalnih lezija (22 od 53 uzorka, 44%) u odnosu na kontrolno pulpno tkivo gde virus nije bio detektovan (Li i sar. 2009). Takođe, Hernadi i saradnici su 2013. godine pokazali statistički značajno veću zastupljenosti EBV u periapikalnim lezijama (44 od 58 uzoraka, 76%) u odnosu na zdravo gingivalno tkivo gde je virus detektovan u svega 2 uzorka (Hernadi i sar. 2013).

Dalje, analiza rezultata doktorske disertacije ukazuje na nepostojanje značajne razlike u detekciji HCMV i EBV između hroničnih periapikalnih lezija sa različitim kliničkim, radiološkim i patohistološkim karakteristikama. Dobijeni rezultati su u skladu sa sveobuhvatnom analizom učestalosti prisustva HCMV i EBV između simptomatskih i asimptomatskih periapikalnih lezija sprovedenoj u sistematskom pregledu i meta-analizi Jakovljevića i Andrića iz 2014. godine (Jakovljević i Andrić, 2014). Međutim, pojedina istraživanja su ukazala na postojanje značajnih razlika u detekciji herpesvirusa između simptomatskih i asimptomatskih, malih i velikih periapikalnih lezija, te periapikalnih granuloma i raduklarnih cisti (Sabeti i sar. 2003, Sunde i sar. 2008, Li i sar. 2009, Hernadi i sar. 2013). Oprečni rezultati između sprovedenih istraživanja objašnjavaju se primenom različitih metodoloških procedura u procesu dokazivanja prisustva herpes virusa, kao i različitom geografskom distribucijom herpes virusa u svetu (Slots 2005, Hernadi i sar. 2013).

Kvantitativna analiza herpesvirusa do sada je sprovedena samo u 4 studije na relativno malom broju uzoraka tkiva periapikalnih lezija (ukupno 110) (Sunde i sar. 2008, Sabeti i sar. 2012, Verdugo i sar. 2015, Makino i sar 2015). Rezultati sprovedenih istraživanja ukazuju na evidentne razlike u broju genskih kopija EBV i HCMV u periapikalnim lezijama između pomenutih studija. Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da je od 76 EBV *nested PCR* pozitivnih uzoraka samo 12 uzoraka imalo povećan broj genskih kopija (prosečna vrednost i standardna devijacija, $6.3 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^6$ kopija/ml). U slučaju 54 HCMV *nested PCR* pozitivna uzorka samo su 4 bila sa povećanim brojem genskih kopija (prosečna vrednost i standardna devijacija, $1.4 \times 10^6 \pm 2.7 \times 10^6$

kopija/ml). Dobijeni rezultati ukazuju da je u malom broju uzoraka studije bila prisutna aktivna herpesvirusna infekcija što je u skladu sa rezultatima analize broja kopija herpesvirusa u različitim oboljenjima parodonticijuma (Botero i sar. 2008).

Prethodna istraživanja su pokazala da genetička varijabilnost herpesvirusa može uticati na ishod odnosa virusa sa imunskim odgovorom domaćina (Lawrence i sar. 2007, Puchhammer-Stöckl i Görzer 2006). Kako je većina prethodnih studija pokazala da su HCMV i EBV najčešće detektovani herpesvirusi u uzorcima periapikalnih lezija, interesantno je bilo ispitati učestalost pojedinih genotipova HCMV i EBV u navedenih uzorcima. Dodatni značaj predstavlja i činjenica da se dosadašnja istraživanja nisu bavila ispitivanjem učestalost detekcije genotipova HCMV i EBV u periapikalnim lezijama. Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da su genotipovi EBV-1 i gB-II najučestaliji u uzorcima periapikalnih lezija što je u skladu sa rezultatima učestalosti genotipova HCMV i EBV u uzorcima hroničnog parodontitisa (Wu i sar. 2007), peri-implantitisa i mukozitisa (Jankovic i sar. 2011).

Analiza vrednosti proinflammatoryh citokina ukazuje da su koncentracije IL-1 β i IL-6 bile statistički značajno veće u uzorcima tkiva hroničnih periapikalnih lezija u odnosu na kontrolno pulpno tkivo. Takođe, pokazano je da su vrednosti IL-1 β i IL-6 bile značajno veće u grupi simptomatskih u odnosu na asimptomatske periapikalne lezije, kao i da su vrednosti IL-1 β bile značajno veće u velikim u odnosu na male periapikalne lezije, kao i u radikularnim cistama u odnosu na periapikalne granulome. Dobijeni rezultati upućuju da se periapikalne lezije sa izraženom kliničkom slikom karakterišu povećanom produkcijom proinflammatoryh citokina (IL-1 β , IL-6), što je u skladu sa ranijim istraživanjima Gazivode i saradnika (2009) i Martinha i saradnika (2012).

Prisustvo herpesvirusa u uzorcima tkiva periapikalnih lezija ne predstavlja direktan dokaz o doprinosu virusa u patogenezi ovih lezija. Zbog toga je ova doktorska disertacija imala za cilj da analizira povezanost prisustva herpesvirusa i nivoa proinflammatoryh citokina u ispitivanom uzorku. Naime, ranija istraživanja su pokazala da primarna infekcija EBV i HCMV doprinosi povećanju produkcije proinflammatoryh citokina na mestu zapaljenja (Imanishi 2000, Melchjorsen i sar. 2003, Mogensen i Paludan 2001). Tako se infekcija HCMV povezivala sa povećanom produkcijom IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , i IFN- γ (Carlquist i sar. 1999, Peterson i sar. 1992), dok su nivoi IL-1 β , IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α , i IFN- γ bili povećani u toku EBV infekcije

(Contreras i Slots 1996, Lotz i sar. 1996). Dodatno, Slots je smatrao da herpesvirusi mogu doprineti patogenezi periapikalnih lezija povećanjem nivoa proinflammatoryh citokina na mestu zapaljenja (Slots i sar. 2003). Analiza dobijenih rezultata ukazuje na nepostojanje statistički značajne korelacije između detektovanog broja kopija HCMV i EBV i izmerenih vrednosti proinflammatoryh citokina u uzrocima hroničnih periapikalnih lezija što se objašnjava prisustvom aktivne herpesvirusne infekcije u malom broju uzoraka.

D. Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Jakovljevic A, Andric M, Knezevic A, Soldatovic I, Nikolic N, Karalic D, Milasin J. Human Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus Genotypes in Apical Periodontitis Lesions. J Endod. 2015 Nov;41(11):1847-51.

Jakovljevic A, Knezevic A, Karalic D, Soldatovic I, Popovic B, Milasin J, Andric M. Pro-inflammatory cytokine levels in human apical periodontitis: Correlation with clinical and histological findings. Aust Endod J. 2015 Aug;41(2):72-7.

E. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija **DETEKCIJA I GENOTIPIZACIJA HUMANOG CITOMEGALOVIRUSA I EPŠTAJN-BAR VIRUSA U HRONIČNIM PERIAPIKALNIM LEZIJAMA** dr Aleksandra Jakovljevića predstavlja značajan i originalni naučni doprinos u analizi uticaja herpes virusnih infekcija u etiopatogenezi hroničnih periapikalnih lezija. Rezultati istraživanja jasno ukazuju na veću učestalost detekcije HCMV i EBV u hroničnim periapikalnim lezijama u odnosu na zdravo pulpno tkivo, kao i značajno učestalije prisustvo HCMV gB-II i EBV-1 geonotipova u odnosu na druge ispitivane genotipove navedenih virusa u tkivima periapikalnih lezija. Dodatno, jasno su prikazani rezultati povećanih vrednosti proinflammatoryh citokina (IL-1 β i IL-6) u periapikalnim lezijama u odnosu na zdravo pulpno tkivo, kao i u periapikalnim lezijama sa različitim kliničkim, radiološkim i patohistološkim karakteristikama. Doktorska disertacija dr Aleksandra Jakovljevića urađena je prema svim principima naučnog istraživanja sa precizno postavljenim ciljevima, originalnim naučnim doprinosom, savremenom metodologijom rada,

adekvatno prikazanim i prodiskutovanim rezultatima i jasno uobličenim zaključcima. Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu objavljene radove iz oblasti doktorske disertacije, Komisija predlaže Nastavno-Naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Aleksandra Jakovljevića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora stomatoloških nauka.

U Beogradu, __.03.2017. godine

Članovi Komisije:

Prof. dr Aleksa Marković,
Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Jelena Milašin,
Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Doc. dr Maja Miletić,
Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Doc. dr Katarina Beljić-Ivanović,
Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Tanja Jovanović,
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu