

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Izveštaj o ispunjenosti uslova i ocena opravdanosti predloga teme za izradu doktorske disertacije

„Ispitivanje dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme *in vitro* na bakterije i mezenhimalne matične ćelije“

Kandidat: Dr. Maja Miletić mr sci stom

Odlukom Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu od **22. 12. 2011.** godine imenovana je Komisija za ocenu podobnosti prijavljene doktorske disertacije “ **Ispitivanje dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme *in vitro* na bakterije i mezenhimalne matične ćelije**” kandidata dr. Maje Miletić, u sastavu:

1. Doc. dr Ivana Dakić
2. Prof. dr Milorad Letić
3. Prof. dr Pavle Milenković, prof. u penziji

Mentor: Prof. dr Dragana Vuković

Komentor: Naučni savetnik dr Diana Bugarski

Na osnovu analize priložene dokumentacije u vezi sa temom predložene doktorske disertacije, nakon razgovora sa kandidatom, a prema kriterijumima za procenu podobnosti teme, članovi Komisije podnose Naučnom veću Medicinskog fakulteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A. Podaci o kandidatu:

Maja Miletić je rođena 04.08.1970.godine u Beogradu. Na Stomatološkom fakultetu diplomirala je 1996.godine sa prosečnom ocenom 8,86 i stekla zvanje doktora stomatologije. Magistarsku tezu pod nazivom „Značaj ispitivanja anti alfa-fodrinских antitela i IL-17 u serumu bolesnika sa primarnim Sjögrenovim sindromom“ odbranila je 2005. godine na Stomatološkom fakultetu. Na Stomatološkom fakultetu na predmetu Patološka fiziologija zaposlena je od 1997.godine, a u zvanje asistenta izabrana 2008.godine. Autor i koautor 2 rada u celini (M21) i 8 radova saopštenih na međunarodnim skupovima i štampanih u izvodu. Saradnik na projektu TR23016: „Primena plazma igle u medicinskim i biološkim istraživanjima i brza i pouzdana detekcija volatilnih supstanci humanog i biljnog porekla“ i III41011: „Primena niskotemperaturnih plazmi u biomedicini, zaštite čovekove okoline i nanotehnologijama“ Ministarstva za prosvetu i nauku.

B. Spisak publikovanih radova kandidata objavljenih u celini

1. Lazović S, Puač N, Miletić M, Maletić D, Malović G, Bugarski D, Mojsilović S, Milenković P, Petrović Z. The effect of a plasma needle on bacteria in planktonic samples and on peripheral blood mesenchymal stem cells. *New J Phys* 2010; 12: 083037.
2. Miletić M, Stojanović R, Pajić O, Bugarski D, Mojsilović S, Cokić V, Milenković P. Serum interleukin-17 and nitric oxide concentrations in patients with primary Sjögren's syndrome. *Ind J Med Research* (in press)

C. OBRAZLOŽENJE TEME:

1. NAUČNA OBLAST:

MEDICINA (Patološka fiziologija)

2. PREDMET RADA:

Istraživanja u okviru doktorske disertacije se odnose na ispitivanje mogućnosti primene niskotemperaturne atmosferske plazme stvorene modifikovanom plazma iglom za *in vivo* dezinfekciju i antimikrobnu terapiju. Za ovakvu potencijalnu primenu neophodno je da izvor niskotemperaturne atmosferske plazme omogućava lokalizovano i kontrolisano dejstvo, kao i da se definišu uslovi pod kojim plazma deluje antimikrobno bez oštećenja zdravog tkiva. Ispitivaće se antimikrobno dejstvo niskotemperaturne atmosferske plazme u zavisnosti od radnih parametara *in vitro* na bakterije *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* u suspenzijama različite koncentracije. Pored toga, ispitaće se uticaj u zavisnosti od radnih parametara na formiranje i formiran biofilm bakterija meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus mutans*. Po prvi put u svetu će biti ispitivan uticaj niskotemperaturne atmosferske plazme na preživljavanje i adhezivnost humanih mezenhimalnih matičnih ćelija poreklom iz periferne krvi i periodoncijuma.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA:

1. Ispitati dejstvo niskotemperaturne atmosferske plazme u zavisnosti od snage, protoka helijuma i dužine izlaganja na bakterije *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* u suspenzijama različitih koncentracija.
2. Ispitati dejstvo niskotemperaturne atmosferske plazme u zavisnosti od snage, protoka helijuma i dužine izlaganja na razvoj biofilma i formirani biofilm bakterija meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus mutans*.
3. Ispitati dejstvo niskotemperaturne atmosferske plazme u zavisnosti od snage, protoka helijuma i dužine izlaganja na preživljavanje i sposobnost adherentnosti humanih mezenhimalnih matičnih ćelija poreklom iz periferne krvi i periodoncijuma.

4. METODE ISTRAŽIVANJA:

Plazma igla

Za ispitivanje dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme na bakterije u suspenziji, biofilm bakterija i humane mezenhimalne matične ćelije koristiće se plazma igla koja je konstruisana u Laboratoriji za gasnu elektroniku Instituta za Fiziku u Beogradu. Ovaj model plazma igle sastoji se od centralne elektrode izgrađene od volframa debljine 0.5 mm koja je prekrivena keramičkom cevi i smeštena u staklenoj cevi prečnika 6 mm. Helijum protiče između keramičke i staklene cevi, a plazma se stvara na vrhu elektrode. Svi uzorci uključeni u ovo ispitivanje biće izloženi dejstvu plazma igle u Laboratoriji za gasnu elektroniku Instituta za Fiziku u Beogradu. Za ispitivanje dejstva plazma igle na bakterije u suspenziji, biofilm bakterija i humane mezenhimalne matične ćelije biće primenjene tri različite snage plazme (1.6 W, 0.9 W, 0.15 W), dva protoka helijuma (0.5 slm[standardnih litara u minuti], 1 slm) i različita vremena izlaganja. Za svako pojedinačno ispitivanje biće korišćene dve kontrole. Prvu će činiti uzorci koji neće biti tretirani, a drugu uzorci koji će biti izloženi samo protoku helijuma, ali ne i plazmi.

Suspenzije bakterija

Suspenzije bakterija biće pripremane u Laboratoriji za mikrobiologiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu. U radu će biti korišćeni referentni sojevi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 i *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Početne koncentracije bakterija će se određivati spektrofotometrijski tako da optička gustina odgovara 1.5×10^8 CFU/ml. Od ove početne suspenzije biće pravljena razblaženja 1:10, 1:100 i 1:1000. Po 0,2 ml tako pripremljenih suspenzija bakterija biće razliveno u ploče za mikrotitraciju sa 96 otvora. Nakon izlaganja suspenzija bakterija dejstvu niskotemperaturne atmosferske plazme, po 0,05 ml suspenzije biće uzeto iz svakog bunara i kultivisano na odgovarajuću čvrstu podlogu. Nakon inkubacije od 20 h na 37°C, vijabilnost bakterija biće procenjena na osnovu broja formiranih kolonija. Sva ispitivanja biće ponovljena dva puta.

Biofilm

Kvantifikacija biofilma će biti izvedena na Odeljenju za bakteriologiju Instituta za mikrobiologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu prema protokolu koju je opisao Stepanović S. sa sar. U radu će biti korišćen referentni soj *Streptococcus mutans* ATCC 25175 i klinički soj MRSA izolovan iz hirurške rane. U pitanju je soj za koji je fenotipskim i genotipskim metodama dokazano da je snažan produktor biofilma. U svakom eksperimentu biće pripremano po dve ploče za mikrotitraciju sa 96 otvora u koje će biti razliveno po 180 µl odgovarajuće tečne podloge i inokulisano po 20 µl pripremljene suspenzije bakterija, čija će se koncentracija određivati spektrofotometrijski. Opseg koncentracija koji će biti korišćen je 10^4 - 10^6 CFU/ml. Da bi se ispitao efekat na formiranje biofilma, jedna ploča će biti izložena dejstvu plazme odmah nakon inokulacije, a zatim biti inkubirana 24h na 37°C. Druga ploča će nakon inokulacije bakterija biti inkubirana 24h na 37°C, a tek zatim izložena dejstvu plazme da bi se utvrdio efekat na formiran biofilm. Sva ispitivanja biće rađena u triplicatu i ponovljena dva puta.

Humane mezenhimalne matične ćelije iz periferne krvi i periodoncijuma

Po dobijanju dozvole etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu, biološki materijal (krv, ekstrahovani umnjaci) će biti prikupljan uz saglasnost dobrovoljaca i pacijenata, obaveštenih o svrsi prikupljanja materijala za eksperimentalni rad. Humane mezenhimalne ćelije biće izolovane od mononuklearnih ćelija periferne krvi (hPB-MSC; human peripheral blood mesenchymal stem cells) na Institutu za medicinska istraživanja u Beogradu, prema preporučenom protokolu. Humane mezenhimalne matične ćelije iz periodoncijuma (PDL-MSC; periodontal ligament mesenchymal stem cells) će, na osnovu pretrage dostupne literature, prvi put biti izolovane kod nas. Karakterizacija ćelija biće izvršena prema Kriterijumima Komiteta za MSC Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju. Ćelije će biti postavljene u ploče sa više bunara (24 ili 96 bunara) i nakon inkubacije od 48 h biće izložene dejstvu plazme pod istim uslovima kao i bakterije. Vijabilnost i adhezivnost hPB-MSC i PDL-MSC nakon izlaganja plazmom, testiraće se pomoću MTT ogleda, odnosno, adhezionim testom.

5. AKTUELNOST PROBLEMATIKE U SVETU:

Jedinstvene hemijske karakteristike plazme i naučno razumevanje plazma fenomena predstavile su osnov za razvoj plazma tehnologije koja je našla primenu u različitim oblastima, prvenstveno industrije. Novo aktuelno polje izučavanja, pred kojim su postavljeni veliki zahtevi i očekivanja je primena plazma tehnologije u oblastima medicine i biologije. Za ovakvu primenu posebno su interesantne neravnotežne odnosno niskotemperaturne plazme, jer iako ispoljavaju visoku reaktivnost, one deluju samo površinski i ne izazivaju termička oštećenja. Pored toga, kod ovih plazmi moguće je precizno kontrolisati sastav i plazmahemijske procese u zavisnosti od željenog efekta. Ovakve karakteristike su otvorile širok spektar potencijalnih primena, prvenstveno kada se radi o tretmanu termalno neotpornih materijala i različitih bioloških sistema. Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazali su da se niskotemperaturne plazme mogu primenjivati u oblastima modifikacije biomaterijala i sterilizaciji koja je ustanovljena kao alternativa standardnim metodama. Međutim, pored nedvosmisleno dokazane efikasnosti primene niskotemperaturnih plazmi u *in vitro* i *ex vivo* uslovima, danas se posebna pažnja posvećuje istraživanjima vezanim za mogućnost primene ovih plazmi *in vivo*. Za primenu niskotemperaturne plazme *in vivo* neophodno je da se plazma stvara na atmosferskom pritisku sa temperaturom gasa koja je približna sobnoj. Pored toga, postizanje efikasnog i bezbednog tretmana plazmom, zahteva preciznu optimizaciju uslova pod kojima se plazma primenjuje. Poslednjih godina razvijeni su različiti izvori niskotemperaturnih atmosferskih plazmi koje odgovaraju *in vivo* primeni u biomedicini. E. Stoffels i sar. su 2002. godine razvili "mikroplazmu", takozvanu plazma iglu, koja je bila osnov za konstrukciju modifikovane plazma igle u Laboratoriji za gasnu elektroniku Instituta za Fiziku u Beogradu. Dimenzije i konstrukcija ovog modela omogućavaju laku dostupnost mestu tretmana i lokalizovano dejstvo. S obzirom na veoma efikasno antimikrobno dejstvo niskotemperaturnih atmosferskih plazmi, jedna od mogućnosti za njihovu primenu je za *in vivo* dezinfekciju i antimikrobnu terapiju. Ovakav pristup je posebno važan zbog rastućeg problema rezistencije mikroorganizama, pre svega bakterija, na postojeće antimikrobne agense. Pored toga, niskotemperaturne atmosferske plazme zbog svojih osobina predstavljaju moguće rešenje i za terapiju infekcija izazvanim bakterijama koje rastu u vidu biofilma. Smatra se da u približno 65% slučajeva humanih bakterijskih infekcija nastaju ovakve zajednice bakterijskih ćelija, pri čemu je produkcija biofilma posebno značajna za nastanak infekcija posredovanih stranim telima. Bakterije roda *Staphylococcus* su tipičan primer izazivača ovakvih infekcija usled njihove sposobnosti produkcije biofilma. Bakterije koje rastu u vidu biofilma pokazuju različite fenotipske osobine u odnosu na bakterije iste vrste koji rastu planktonski, a od ključnog značaja je izrazita rezistencija biofilma na antimikrobnu terapiju. Stoga je ispitivanje novih mogućnosti za antimikrobno delovanje na bakterije u biofilmu danas veoma aktuelno. Rast bakterija u vidu biofilma je značajan i u stomatologiji. Biofilm dentalnog plaka sadrži različite vrste bakterija, pri čemu je najvažnija *Streptococcus mutans*, a ima značajnu ulogu u nastanku dentalnog karijesa i periodontalne bolesti. Pored ispitivanja različitih aspekata antimikrobnog delovanja niskotemperaturnih atmosferskih plazmi, neophodno je i definisanje uslova pod kojima plazma ispoljava baktericidni efekat, ali uz istovremeno očuvanje zdravog tkiva. *In vitro* eksperimenti na različitim ćelijskim modelima su pokazali da niskotemperaturna atmosferska plazma može imati modulatorne efekte na adheziju i proliferaciju ćelija, kao i da može izazvati nekrozu i apoptozu. Imajući sve navedeno u vidu, ključni preduslov za mogućnost praktične primene niskotemperaturnih atmosferskih plazmi za *in vivo* dezinfekciju i antimikrobnu terapiju jeste prepoznavanje izvora ovih plazmi odgovarajućih karakteristika. Sumirano, najvažnije karakteristike su fizička konstrukcija koja omogućava lokalizovano i kontrolisano dejstvo i stvaranje plazme snažnog antimikrobnog delovanja bez oštećenja zdravog tkiva. Modifikovani model plazma igle razvijen u Laboratoriji za gasnu elektroniku Instituta za Fiziku u Beogradu zadovoljava konstrukcijski zahtev, a preliminarna ispitivanja delovanja na bakterije i mezenhimalne matične ćelije izolovane iz periferne krvi pokazala su da ima veliki potencijal za *in vivo* antimikrobno delovanje.

6. OČEKIVANI REZULTATI:

Sprovedeno istraživanje bi ukazalo na optimalne uslove pod kojim niskotemperaturna atmosferska plazma stvorena modifikovanom plazma iglom ostvaruje baktericidni efekat na bakterije u suspenziji i biofilm bakterija od značaja za medicinu i stomatologiju. U okviru ovog istraživanja će prvi put biti ispitivana interakcija niskotemperaturne atmosferske plazme sa normalnim mezenhimalnim matičnim ćelijama izolovanim iz periferne krvi i periodoncijuma, na osnovu čega bi se mogao predvideti uticaj na adhezivnost i preživljavanje ćelija u kulturi. Utvrđivanje optimalnih uslova pod kojim niskotemperaturna atmosferska plazma stvorena modifikovanom plazma iglom deluje antimikrobno, a bez štetnog delovanja na mezenhimalne matične ćelije, omogućilo bi tehnološki razvoj relativnog jednostavnog i efikasnog tretmana za lokalizovane, terapijski dostupne procese u medicini i stomatologiji.

D. ZAKLJUČAK (obrazloženje opravdanosti teme)

Na osnovu analize priložene dokumentacije, članovi komisije smatraju da je predložena tema doktorske disertacije “ Ispitivanje dejstva niskotemperaturne atmosferske plazme *in vitro* na bakterije i mezenhimalne matične ćelije” kandidata dr Maje Miletić značajna i aktuelna i da u potpunosti ispunjava uslove za originalan naučni doprinos u istraživanjima koja se odnose na primenu savremene plazma tehnologije za *in vivo* dezinfekciju i antimikrobnu terapiju. Ispitivanje novih pristupa je veoma važno s obzirom na rastući problem rezistencije mikroorganizama na postojeće antimikrobne agense kao i izrazitu rezistenciju bakterija koje rastu u vidu biofilma na antimikrobnu terapiju. Preduslov za mogućnost praktične primene niskotemperaturnih atmosferskih plazmi za *in vivo* dezinfekciju i antimikrobnu terapiju je, ne samo prepoznavanje izvora ovih plazmi odgovarajućih karakteristika, već i definisanje uslova pod kojim niskotemperaturna plazma ostvaruje baktericidni efekat ali uz istovremeno očuvanje zdravog tkiva. Ovim istraživanjem bi se utvrdili optimalni uslovi pod kojim niskotemperaturna atmosferska plazma stvorena modifikovanom plazma iglom deluje antimikrobno, a bez štetnog delovanja na mezenhimalne matične ćelije, čime bi se stvorili uslovi za tehnološki razvoj i primenu savremene plazma tehnologije kao novog terapijskog postupka u medicini i stomatologiji.

Dosadašnji stručni i naučni rad kandidata dr Maje Miletić, ali i mentora, Prof. dr Dragane Vuković i komentora N. sav. dr Diane Bugarski, kao i aktuelnost predložene teme, predstavljaju realnu osnovu da će istraživanje biti izvršeno kompetentno i na savremen način.

Stoga, na osnovu celokupne analize priloženog materijala, Komisija jednoglasno zaključuje da su, pored zakonskih, ispunjeni i svi ostali formalni uslovi i na osnovu toga predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta da kandidatu dr Maji Miletić odobri izradu doktorske disertacije sa predloženom temom.

Komisija:

Beograd, 20. 02. 2012. godine

1. Doc. dr Ivana Dakić

2. Prof. dr Milorad Letić

3. Prof. dr Pavle Milenković

