

Биолошки факултет
Број захтева: 15/219-1
Датум: 06.04.2012.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на предлог теме докторске дисертације

Молимо да, сходно члану 46. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду («Гласник Универзитета», број 131/06), дате сагласност на предлог теме докторске дисертације:

„Утицај N-ацетил-L-цистеина *in vitro* на пролиферацију и диференцијацију матичних ћелија зубне пулпе млечних зуба деце“.

НАУЧНА ОБЛАСТ: Биологија, Молекуларна биологија.

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног родитеља и презиме кандидата:

Јасмина Д. Дебељак Мартачић

2. Назив и седиште факултета на коме је стекао високо образовање:

Биолошки факултет, Универзитет у Београду.

3. Година дипломирања: 2004.

4. Назив магистарске тезе кандидата: /

5. Назив факултета на коме је магистарска теза одбрањена: /

6. Година одбране магистарске тезе: /.

7. Година и назив факултета на коме је кандидат уписао докторске студије:

2006- Биолошки факултет, докторски програм/модул: Молекуларна биологија.

Обавештамо Вас да је Наставно- научно веће Биолошког факултета Универзитета у Београду, на VI редовној седници одржаној 06.04.2012. год. размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић- Вукчевић

Прилог:

1. Предлог теме докторске дисертације са образложењем.

2. Акт надлежног тела факултета о подобности теме за израду докторске дисертације.

3. Подаци о ментору.

4. Одлука Етичког комитета Медицинског факултета Универзитета у Нишу.



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

15/219-06.04.2012.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 12. Статута Биолошког факултета Универзитета у Београду, Наставно-научно веће Факултета, на VI редовној седници одржаној 06.04.2012. године, донело је

О Д Л У К У

Прихвата се Извештај Комисије за оцену испуњености услова и научне заснованости теме докторске дисертације кандидата:

Јасмине Д. Дебељак Мартачић, дипломираног биолога, студента докторских студија, студијског програма: Молекуларна биологија, под насловом:

„Утицај N-ацетил-L-цистеина *in vitro* на пролиферацију и диференцијацију матичних ћелија зубне пулпе млечних зуба деце“.

За менторе се именују:

1. Др Милица Ковачевић Филиповић, ванредни професор Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду;
2. Др Гордана Матић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић- Вукчевић

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- ментору;
- Стручној служби Факултета.

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

за кандидата: **Јасмину Дебељак Мартачић**

А: Име и презиме ментора: **др Милица Ковачевић Филиповић**

Звање: **ванредни професор Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. **Kovacevic-Filipovic M**, Petakov M, Hermitte F, Debeissat C, Krstic A, Jovcic G, Bugarski D, Lafarge X, Milenkovic P, Praloran V, Ivanovic Z. Interleukin-6 (IL-6) and low O-2 concentration (1%) synergize to improve the maintenance of hematopoietic stem cells (Pre-CSF). *J Cell Physiol* 2007; 212 (1):68-75.
2. Ivanovic Z, **Kovacevic-Filipovic M**, Jeanne M, Ardilouze L, Bertot A, Szyporta M, Hermitte F, Lafarge X, Duchez P, Vlaski M, Milpied N, Pavlovic M, Praloran V, Boiron JM. CD34+ cells obtained from "good mobilizers" are more activated and exhibit lower ex vivo expansion efficiency than their counterparts from "poor mobilizers". *Transfusion* 2010; 50 (1):120-127.
3. Jeanne M, **Kovacevic-Filipovic M**, Szyporta M, Vlaski M, Hermitte F, Lafarge X, Duchez P, Boiron JM, Praloran V, Ivanovic Z. Low-oxygen and high-carbon-dioxide atmosphere improves the conservation of hematopoietic progenitors in hypothermia. *Transfusion* 2009; 49 (8):1738-1746.
4. **Kovačević Filipović M**, Okić I, Petričević T, Mojsilović S, Krstić A, Jovčić G, Bugarski D, Milenković P, Petakov M, Radovanović A, Božić T, Ivanović Z. Cultivation of hamster bone marrow haematopoietic stem and progenitor cells. *Acta Vet-Beograd* 2010; 60(1):3-14.
5. Liu JM, Lawrence F, **Kovačević M**, Bignon J, Papadimitriou E, Lallemand JY, Katsoris P, Potier P, Fromes Y, Wdzieczak-Bakala J. 2003. The tetrapeptide AcSDKP, an inhibitor of primitive hematopoietic cell proliferation, induces angiogenesis in vitro and in vivo. *Blood*. Apr 15;101(8):3014-20

Б: Име и презиме ментора: **др Гордана Матић**

Звање: **редовни професор Биолошког факултета, Универзитета у Београду**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Djordjevic Jelena D, Djordjevic Ana, Adzic Miroslav, Elakovic Ivana, **Matic Gordana M**, Radojcic Marija B (2011) Fluoxetine affects antioxidant system and promotes apoptotic signaling in Wistar rat liver, *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY*, vol. 659, br. 1, str. 61-66
2. Perisic Tatjana, Sreckovic Miodrag, **Matic Gordana M** (2008) Possible Role Of A Hydrogen Peroxide-Mediated Mechanism In Glucocorticoid Receptor Functional

Alterations Associated With Moderate Asthma, ARCHIVES OF BIOLOGICAL SCIENCES, vol. 60, br. 4, str. 531-539

3. Perisic Tatjana, Sreckovic Miodrag, Matic Gordana M (2007) An imbalance in antioxidant enzymes and stress proteins in childhood asthma, CLINICAL BIOCHEMISTRY, vol. 40, br. 15, str. 1168-1171
4. Dundjerski Jadranka, Brkljacic Jelena M, Elakovic Ivana, Manitsevic Sanja, Matic Gordana M (2006) Mercury influences rat liver tyrosine aminotransferase activity and induction by dexamethasone, JOURNAL OF APPLIED TOXICOLOGY, vol. 26, br. 2, str. 187-190
5. Cvoro Aleksandra, Korac Aleksandra B, Matic Gordana M (2003) Immunocytochemical study of the glucocorticoid receptor in rat liver nuclei after hyperthermic stress, CELL BIOLOGY INTERNATIONAL, vol. 27, br. 5, str. 403-4

Заокружити одговарајућу опцију (А, Б, В, или Г):

А) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији техничко-технолошких, природно-математичких и медицинских наука ментор треба да има најмање три рада са SCI, SSCI, AHCI или SCIE листе, као и Math-Net.Ru листе.

Б) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији друштвено-хуманистичких наука ментор треба да има најмање три рада са релеватне листе научних часописа (Релевантна листа научних часописа обухвата SCI, SSCI, AHCI и SCIE листе, као и ERIH листу, листу часописа које је Министарство за науку класификовало као M24 и додатну листу часописа, коју ће на предлог Универзитета донети Национални савет за високо образовање. Посебно се вреднују и монографије које Министарство науке класификује као M11, M12, M13, M14, M41, и M51.)

В) У случају израде докторске дисертације према ранијим прописима за кандидате који су стекли академски маистра наука ментор треба да има пет радова (референци) које га, по оцени Већа научних области, квалификују за ментора односне дисертације.

Г) У случају да у ужој научној области нема квалификованих наставника, приложити одлуку Већа докторских студија о именовању редовног професора за ментора.

Декан Биолошког факултета

Датум: 06.04.2012.

Проф. др Јелена Кнежевић- Вукчевић

НАСТАВНО–НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На II редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду одржаној 4.11.2011. године, одређени смо у Комисију за оцену испуњености услова и научне заснованости предложене теме за израду докторске дисертације Јасмине Д. Дебељак Мартачић, под насловом: “Утицај N-ацетил-L-цистеина *in vitro* на пролиферацију и диференцијацију матичних ћелија зубне пулпе млечних зуба деце”.

На основу поднете документације и увида у досадашњи рад Јасмине Дебељак Мартачић, Комисија подноси Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду следећи:

ИЗВЕШТАЈ

А. Биографија:

Општи подаци:

Име, средње слово и презиме: Јасмина Д. Дебељак Мартачић

Датум и место рођења: 27.09.1976. Краљево, Србија

Образовање:

2006- Докторске студије Молекуларна биологија

2004. Дипломирани биолог

Запослење:

2007. Истраживач сарадник, Центар изврсности у области истраживања исхране и метаболизма, Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду

Курсеви:

2009 EuroFIR E-learning Demo Workshop. 3rd International EuroFIR Congress. Беч, Аустрија,

2009 Capacity development: NCDNCEE and EURRECA training 11-12th November, Београд, Србија,

2009 Basefood Food Indexing Training Course, 9-11th November, Београд Србија

Пројекти:

Национални пројекти:

2011-2014, Биолошки механизми, нутритивни унос и статус полинезасићених масних киселина и фолата: унапређење исхране у Србији (МНТРС 41030).

2006-2010, Развој нових терапијских поступака у превенцији и лечењу болести јетре-улога и механизам деловања полинезасићених масних киселина (МНТРС 145071)

2011-2015, Интегрална студија идентификације регионалних генетских фактора ризика и фактора ризика животне средине за масовне незаразне болести хумане популације у Србији (МНТРС 41028)

Међународни пројекти:

2006-2009, European Food Information Resource network (EuroFIR)

2006-2009 BaseFood (Sustainable exploitation of bioactive components from the Black Sea Area traditional foods)

Чланство у научним друштвима:

Друштво физиолога Србије

Српско друштво за митохондријалну и слободно-радикалску физиологију

Страни језици:

Енглески и руски

Посебне активности и награде:

Радови и конгресна саопштења из уже научне области

Б. Библиографија:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Gurinovic, M., Witthoft, CM., Tepsic, J., Ranic, M., Hulshof, PJM., Hollman, PC., J Porubska, J., Gohar, A., Debeljak-Martacic, J., Petrovic-Oggiano, G., Novakovic, R., Glibetic, M., and Oshaug, A. Capacity development in food composition database management and nutritional research and education in Central and Eastern European, Middle Eastern and North African countries, *European Journal of Clinical Nutrition* (2010) 64: S134–S138
2. Popović T, Borožan S, Arsić A, Martačić JD, Vučić V, Trbović A, Mandić L, Glibetiћ M. Fish oil supplementation improved liver phospholipids fatty acid composition and parameters of oxidative stress in male wistar rats. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2011 Aug 29. doi: 10.1111/j.1439-0396.2011.01216.x
3. Glibetic, M., Kadvan, A., Tepsic, J., Martacic, J. D., Djekic-Ivankovic, M., & Gurinovic, M., Management of Food Composition Database harmonized with EuroFIR criteria using a web application, *Journal of Food Composition and Analysis*. 2010.doi:10.1016/j.jfca.2010.09.002
4. Popović T, Borožan S, Arsić A, Debeljak-Martačić J, Vučić V, de Luka S, Milovanović I, A. Trbovic, Glibetiћ M . Effects of n-3 supplementation on plasma and liver phospholipid fatty acid profile in aged Wistar rats, *Croatica Chemica Acta* 2011; 1: 73–79.
5. Tepsic V., Pavlović M., Ristic-Medic D., Ristic V., Lekić N., Tepšić J., Debeljak-Martacic J., Milicevic M., Glibetic M. Influence of dietary fats on serum phospholipid fatty acid composition its relation in obesity in animals. *Acta Veterinaria* 2008; 58: 33-41.
6. Takić M., Ristić-Medić D., Mandić Lj., Glibetiћ M., Arsić A., Debeljak-Martačić J., Petrović-Oggiano G. N-3 polyunsaturated acids in erythrocyte phospholipids are associated with insulin sensitivity in obese patients on a typical Serbian diet.

Archives of Biological Sciences 2009; 61: 37-43.

7. Petrovic-Oggiano G., Damjanov V., Vucic V., Debeljak-Martacic J., Pavlovic M., Glibetic M. Effects Of Three Types Of Physical Activity On Reduction Of Metabolic Parameters Involved In Cardiovascular Risk . Archives of Biological Sciences 2009; 61: 367-374.
8. Cvetkovic Z., Cvetkovic B., Petrovic M., Ranic M., Debeljak-Martacic J., Vucic V., Glibetic M. Lipid profile as a prognostic factor in cancer patients. Journal of B.U.O.N. 2009;14: 501-506.
9. Kovačević Filipović M, Stevanović J, Stevanov Pavlović M, Debeljak Martačić J, Knežević M, Mijačević Z, Božić T. Acute phase protein response in cows with *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis, Acta Veterinaria (Beograd), 2010; 60: 205-216.
10. Djekic-Ivankovic M, Savikin K, Zdunic G, Debeljak-Martacic J, Tepsic J, Popovic T, Vucic V, Konic-Ristic A, Glibetic M. The effects of a new plant mixture on lipid levels in patients with metabolic syndrome, Arch Biol Sci 2010; 62: 403-405.

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

1. Markovic D, Milenkovic A, Koliakos G, Kostidous E, Karadzic I, Debeljak Martacic J, Jokanovic V, Peric T, Petrovic B, Arsenijevic N, Kanjevac T. Potential preservation of dental pulp stem cells. Balkan Journal of Stomatology, 2010; 14: 4-7

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Pavlovic M., Glibetic M., Witthöft M. C., Tepsic J., Popovic T., Debeljak Martacic J., Porubska J., Ribarova F., Finglas P. Food Composition Data Base Status in non-EuroFIR countries in Central and Eastern Europe (CEE). 2nd International EuroFIR Congress, Granada, Spain. Abstract book pp 61.
2. Popovic T., Debeljak-Martacic J., Tepsic J., Kujundzic S., Konic-Ristic A., Glibetic M. Analytical analysis of traditional foods: Filling the gap in Serbian FCDB Information 3rd International EuroFIR Congress, European Food Composition Data for Better Diet, Nutrition and Food Quality 8-10 September 2009, University of Vienna, Austria 2009. Book of abstracts pp 193.
3. Petrovic-Oggiano G., Damjanov V., Vucic V., Debeljak-Martacic J., Gurinovic M., Glibetic M. The effect on three types of physical activity on the reduction of metabolic parameters involved in cardiovascular risk. 19th International Congress of nutrition, october 4-9, 2009 Bangkok Thailand. Book of abstracts pp 600.
4. Kovacevic Filipovic M., Debeljak Martacic J., Petakov M, Markovic D, Milenkovic A., Karadzic I, Mitrovic O., Vignjevic S., Drndarevic N., Micic M., Glibetic M., Todorovic V. Isolation and characterisation of dental pulp stem cells. Congress "Autour de la cellule souche" Bordeaux, 17-19 Mars 2010.

5. Rasic-Milutinovic Z, Perunicic-Pekovic G, Popovic T, Arsic A, Debeljak-Martacic J, and Glibetic M . Effect of long-chain polyunsaturated fatty acids on renal function in type two diabetic patients. 15th International Congress of metabolism and nutrition in renal diseases, Lozana 25-28 May 2010.

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. Vučić, V., Popović, T., Ranić, M., Arandjelović, A., Ristić-Medić, D., Debeljak-Martačić, J., Petrović-Oggiano, G., Bulajić, P., Miličić, M, Glibetiћ, M. Profil masnih kiselina fosfolipida seruma kod pacijenata sa hepatocelularnim karcinomom jetre – pilot studija. XLVII Kancerološka nedelja, Beograd, Srbija, 18.- 20. novembar, Zbornik sažetaka, 55 str., 2010.
2. Djekic-Ivankovic M., Savikin K., Zdunic G., Debeljak-Martacic J., Tepsic J., Popovic T., Vucic V., Glibetic M. Effects of a new plant mixture HG5 on glucose and lipid level in patients with metabolic syndrome. Second congress of physiological sciences of Serbia with international participation, Kragujevac, septembar 2009. Book of abstracts pp 101
3. Popovic T., Arsic A., Borozan S., Debeljak-Martacic J., Vucic V., Tepsic J., de Luka S., Milovanovic I., Glibetic M. Effects of omega-3 supplementation on plasma phospholipid fatty acids profile and oxidative stress parameters in aged Wistar rats. Second congress of physiological sciences of Serbia with international participation, Kragujevac, septembar 2009. Book of abstracts pp 187a

В. Тема докторске дисертације:

Наслов дисертације:

Утицај N-ацетил-L-цистеина *in vitro* на пролиферацију и диференцијацију матичних ћелија зубне пулпе млечних зуба деце

Полазне основе:

Ћелијска терапија и регенеративна медицина су термини који су у последњих десетак година муњеви то освојили и повезали фундаментална истраживања адолтних мезенхималних матичних ћелија (ММЋ) и могућности њихове клиничке примене. Алогена или аутолога примена ММЋ у терапијске сврхе има за циљ 1. да имуномодулацијом подстакне и помогне одбрамене механизме самог организма и 2. да омогући регенерацију оштећеног ткива формирањем новог функционалног ткива (и/или смањи ожиљно ткиво). Терапијски потенцијал ММЋ лежи у чињеници да су мултипотентне, да имају велики пролиферативни потенцијал и могућност самообнове. *In vivo*, матичне ћелије учествују у обнављању и репарацији ткива, али њихова максимална активација у тешким патолошким условима се не дешава. Због тога је *ex vivo* манипулација матичним ћелијама један од начина да се њихов велики регенеративни и имуномодулаторни капацитет искористи у терапијске сврхе.

Досадашњим истраживањима је показано да практично сва ткива одраслих организама поседују популацију мезенхималних матичних ћелија (ММЋ). Као ткива најбогатија ММЋ у постнаталном периоду се убрајају костна срж, масно ткиво, синовијална мембрана и различита ткива у вези са развојем зуба.

Зубна пулпа млечних зуба је ткиво које је лако доступно за колекцију с обзиром да је експозиција зуба природан процес, а сам зуб (са припадајућом пулпом) је сврстан у

медицински отпадни материјал. Међутим, пре десет година је показано да се из пулпе млечних зуба могу изоловати две популације ММЋ: матичне ћелије пулпе експелираних млечних зуба (SHED – *stem cells from human exfoliated deciduous teeth*) и незреле матичне ћелије зубне пулпе (IDPSC - *immature dental pulp stem cells*). Потенцијалан регенеративни капацитет SHED и IDPSC важан за обнову дентина је показан на *in vivo* моделу када је по трансплантацији ових ћелија дошло до формирања комплексног ткива грађеног од минерализованог матрикса и тубула оивичених одонтобластима и фиброзног ткива које је садржало крвне судове, што је заправо структура по грађи слична комплексу дентин / зубна пулпа. Осим тога, показано је да SHED и IDPSC могу да се диференцирају у остеобласте, хондроците, адипоците, нервне ћелије и миобласте.

Терапијски потенцијал ММЋ изолованих из постнаталних ткива (без обзира на ткиво из ког су изоловане) је ограничен њиховим малим бројем и чињеницом да током њихове *ex vivo* експанзије долази до промена које могу негативно утицати на њихов потенцијал за диференцијацију и после примене *in vivo*, регенерацију ткива. У те промене се убраја губитак мултипотентних (примитивних) клонова ћелија и старење ћелија које може бити повезано са губитком антиоксидативне заштите, и оштећењем свих ћелијских структура. Због тога, истраживања која се спроводе на различитим матичним ћелијама *ex vivo*, као крајњи циљ имају дефинисање оних *ex vivo* услова који ће истовремено обезбедити брзо умножавање и добијање великог броја вијабилних ћелија чији потенцијал за диференцијацију неће бити смањен.

Култивација ћелија у *in vitro* условима се најчешће изводи у атмосфери која садржи физиолошку концентрацију CO₂ (5%) и изузетно високу концентрацију кисеоника која не постоји у ткивима, већ одговара атмосферским условима (20%). Претпоставља се да физиолошки релевантна микросредина ММЋ има проценат кисеоника између 2% и 7%. То значи да 20% O₂ чини микросредину презасићену кисеоником. Кисеоник као двоатомски молекул није превише реактиван, али је супстрат за стварање слободних кисеоникових радикала (РОС) који могу бити извор оштећења различитих ћелијских структура. Један он начина да се превенира дејство РОС у *in vitro* условима је култивација ћелија на ниским концентрацијама O₂ или примена различитих антиоксиданаса.

Н-ацетил-L-цистеин (NAC) је антиоксидант који се већ користи као терапијски молекул у медицини, али се често примењује у *in vitro* биолошким системима. Садржи тиолне (SH-) групе и прекурсор је глутатиона (GSH) који веома лако из редуковане прелази у оксидовану форму. Ефекат NAC-а је опсежно испитиван у *in vitro* условима, на различитим примарним ћелијским културама или имортализованим ћелијским линијама и у ограниченој мери на ММЋ. Описан пожељан ефекат NAC-а на ММЋ је стимулација пролиферације и побољшање преживљавања ММЋ по трансплантацији и стога позитиван терапијски ефекат. Међутим, исте концентрације NAC-а, на различитим типовима ћелија немају исте ефекте и NAC може довести до инхибиције пролиферације као и смањеног вијабилитета ћелија. На молекуларном нивоу, NAC може изазивати ефекат мењањем редокс статуса SH- група на сигналним молекулима (мењањем активности транскрипционих фактора).

Предмет докторске дисертације:

NAC је антиоксидант који има потенцијално значајан ефекат на терапијску примену ММЋ. Подаци наведени у литератури показују да ефекат NAC, у зависности од дозе и типа ћелије на коју делује, може бити потпуно различит, укључујући ефекте од смањеног вијабилитета ћелија до стимулације пролиферације. У литератури нема података о дејству различитих концентрација NAC на основне функционалне особине матичних ћелија зубне пулпе млечних зуба, нити о његовом дејству на антиоксидативну заштиту ових ћелија.

Имајући то у виду, као предмет ове докторске дисертације је дефинисано испитивање утицаја различитих концентрација NAC на пролиферативни потенцијал и

потенцијал за диференцијацију у мултиклоналним културама мезенхималних матичних ћелија изолованих из зубне пулпе млечних зуба деце. Да би се ближе описао ефекат различитих концентрација NAC-а, током третирања ММЋ, биће праћене и промене имунофенотипа изолованих ћелија као и промене активности ензима антиоксидативне заштите.

Научни циљ докторске дисертације:

Имајући у виду горе наведени предмет истраживања, циљеви ове дисертације су да се током вишеструке субкултивације (у пасажи 4, 6 и 8) мултиклоналних култура матичних ћелија зубне пулпе млечних зуба у *in vitro* условима утврди утицај различитих концентрација NAC на:

1. вијабилитет и проценат апоптотичних ћелија
2. пролиферативни потенцијал ћелија и њихово време удвајања у култури
3. релативну брзину уласка ћелија у активан ћелијски циклус
4. очување примитивности, односно могућност формирања CFU-F (*colony forming unit – fibroblast*)
5. експресију позитивних и одсуство негативних маркера MSC (CD14, CD34, CD29, CD44, CD79, CD106, CD146, Col1A, Col3A)
6. активност ензима алдехид-деhidрогеназе (ALDH 1.1) који представља један од маркера примитивних матичних ћелија који до сада није испитан на матичним ћелијама изолованим из зубне пулпе млечних зуба
7. очување мултипотентности, односно могућност диференцијације у ћелије коштаног, хрскавичавог и масног ткива
8. активност ензима антиоксидативне заштите и степен оксидативног оштећења интрацелуларних протеина и липида
9. присуство β -галактозидазе као маркера старења ћелија

Материјал и методе:

Узимање узорака, изолација и експанзија матичних ћелија

После ексфолијације млечних зуба (3 инцизива и 3 молара), матичне ћелије зубне пулпе ће бити изоловане методом прерастања из ткивних експланта. Пресејавање и умножавање ћелија до осме пасаже ће се вршити стандарном процедуром уз коришћење 10% телећег серума у DMEM-у (*Dulbecco Modified Eagles Medium*). У четвртој, шестој и осмој пасажи, ћелије ће бити подељене и третиране са три концентрације NAC: 0,1mmol/L, 1mmol/L и 2 mmol/L. Културе без NAC-а ће служити као контроле. У свакој од наведених пасажа ће после четвородневног третмана NAC-ом бити одређен број вијабилних ћелија уз помоћ трипан плавог, а у паралелним културама мале густине ћелија ће бити одређен број CFU-F. На основу добијеног броја ћелија биће одређен пролиферативни потенцијал матичних ћелија и њихово време удвајања у култури.

Испитивање имунофенотипа, ћелијског циклуса и процента ћелија у апоптози

У наведеним пасажама ћелије ће бити подељене у 4 описане групе (контрола и три третмана са концентрацијама: 0,1mmol/L, 1mmol/L и 2 mmol/L NAC-а) посредством имуноцитохемије и проточне цитометрије биће одређена експресија CD14, CD34, CD29, CD44, CD79, CD106, CD146, Col3A, Col1A. Проточном цитометријом ће такође бити одређена активност изоформе (1.1) ензима алдехид-деhidрогеназе за кога је показано да се налази у примитивним популацијама матичних ћелија.

После 6 сати од апликације NAC у културе, применом пропидијум-јодида биће одређен проценат ћелија у појединим фазама ћелијског циклуса (G0/G1, S, G2M).

После 24 сата од апликације NAC у културе, комбинованом применом пропидијум-јодида и анексина V, биће утврђен проценат вијабилних ћелија, и оних које се налазе у фази ране и касне апоптозе.

Испитивање потенцијала за диференцијацију матичних ћелија

У свим наведеним групама и временима субкултивације, ћелије ће бити третиране специфичним комерцијалним медијума за диференцијацију у коштану, хрскавичаву и масно ткиво уз додатак наведених количина NAC-а.

После 7 и 14 дана култивације ћелија у медијуму за остеогенезу применом имуноцитохемије, у ћелијама ће бити испитано присуство остепонтина и остеокалцина. Осим тога, у медијуму (или у ћелијском лизату) ће бити одређена активност алкалне фосфатазе (највећа активност 9. до 12. дана). После 20 дана култивације уз помоћ Ализарин-црвеног ће бити утврђено присуство калцијума депонованог у екстрацелуларни матрикс формиран у културама. Спектрофотометријом ће бити квантификован интензитет боје солубилизованог Ализарин-црвеног, односно биће квантификован потенцијал испитиваних ћелија ка остеогенези.

После 20 дана инкубације ћелија у медијуму за адипогенезу, бојењем Oil Red O методом, биће показане масне капљице у ћелијама које су се диференцирале у адипоците, док ће квантификација адипогенезе бити одређена солубилизацијом обојених масних капљица и спектрофотометријским одређивањем интензитета настале боје.

После 20 дана инкубације ћелија у медијуму за хондрогенезу, половина формираних микропелета ће бити фиксирана, укалупљена и стандардно процесуирана за хистохемијско испитивање уз помоћ Алциан-плавог који боји гликозаминогликане (ГАГ) екстрацелуларног матрикса хрскавичавог ткива. Друга половина пелета ће бити разложена уз помоћ папаина и количина ГАГ ће бити квантификована спектрофотометријски после бојења са диметил-метиленско-плавим.

Испитивање антиоксидативне заштите и присуства оксидативног стреса

Ћелије ће бити лизирани уз помоћ пуфера за лизу ћелија који садржи инхибиторе протеиназа. После центрифугирања ћелијски супернатант ће бити залеђен на -80°C до даљих анализа. Антиоксидативни статус ћелија и присуство оксидативног стреса биће утврђено одређивањем: а) активности супероксид-дисмутазе (SOD) и одређивањем њених активних изоензимских облика, б) активности каталазе (CAT) и ц) активности глутатион-пероксидазе и односа GSH/GSSG. Квантификација липидне пероксидације ће бити утврђена спектрофотометријски одређивањем малондиалдехида (MDA), а оксидативно оштећење протеина одређивањем броја карбонилних група. Осим тога, електрофоретски ће бити одређен однос појединих изоензимских форми лактат-дехидрогеназе (LDH₁ до LDH₅). Активности ензима ће бити изражене по концентрацији протеина (која ће бити одређена спектрофотометријски Брадфордовом методом).

Испитивање присуства β-галактозидазе

Присуство β-галактозидазе која се налази у ћелијама које испољавају знаке старења (престанак деоба, губитак могућности за диференцијацију) ће бити одређено уз помоћ цитохемије. Наиме, током инкубације ћелија β-галактозидаза разлаже додати супстрат X-gal у нерастворљиви плави преципитат.

Најважнији литературни подаци који подржавају тему:

1. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. 2003. SHED: Stem cells from human exfoliated decidual teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 5807-12.
2. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, Caplan AI, Cerruti HF. 2006. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*. 184: 105-16.
3. Izigov, N, Farzam N, and Savion N. 2011. S-allylmercapto-N-acetylcysteine up-regulates cellular glutathione and protects vascular endothelial cells from oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med*. 50: 1131-9.
4. Orciani M, Gorbi S, Benedetti M, Di Benedetto G, Mattioli-Belmonte M, Regoli F, Di Primio R. 2010. Oxidative stress defense in human-skin-derived mesenchymal stem cells versus human keratinocytes: Different mechanisms of protection and cell selection. *Free Radical Biology and Medicine* 49: 830-838.
5. Grosicka-Maciąg E, Kurpios-Piec D, Grzela T, Czczot H, Skrzycki M, Szumiło M, Rahden-Staroń I. 2010. Protective effect of N-acetyl-L-cysteine against disulfiram-induced oxidative stress and apoptosis in V79 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 248: 210-216.
6. Song H, Cha MJ, Song BW, Kim IK, Chang W, Lim S, Choi EJ, Ham O, Lee SY, Chung N, Jang Y and Hwang KC. 2010. Reactive Oxygen Species Inhibit Adhesion of Mesenchymal Stem Cells Implanted into Ischemic Myocardium via Interference of Focal Adhesion Complex. *Stem Cells*. 28: 555–563.
7. Parasassi, T, Brunelli, R, Costa G, De Spirito, M, Krasnowska, E, Lundeberg, T, Pittaluga, E, Ursini, F. 2010. Thiol Redox Transitions in Cell Signaling: a Lesson from N-Acetylcysteine. *TheScientificWorldJOURNAL*. 10: 1192-1202.
8. Paranjpe A, Sung EC, Cacalano NA, Hume WR, Jewett A. 2008. N-acetyl Cysteine Protects Pulp Cells from Resin Toxins in vivo. *Journal of Dental Research* 87: 537-541.
9. Kovacević-Filipović M, Petakov M, Hermitte F, Debeissat C, Krstić A, Jovčić G, Bugarski D, Lafarge X, Milenković P, Praloran V, Ivanović Z. 2007. Interleukin-6 (IL-6) and low O₂ concentration (1%) synergize to improve the maintenance of hematopoietic stem cells (Pre-CSF). *J Cell Physiol* 212:68-75
10. Tomic S, Djokic J, Vasilijic S, Vucevic D, Todorovic V, Supic G, Colic M. 2011. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from dental pulp and dental follicle are susceptible to activation by toll-like receptor agonists. *Stem Cells Dev*.20:695-708

Г. Закључак и предлог:

На основу приложене пријаве и увида у актуелну литературу која се односи на ову област истраживања, Комисија закључује да је тема докторске дисертације научно заснована и да ће допринети добијању нових информација о дејству N-ацетил-L-цистеина на одржање пролиферативног потенцијала и потенцијала за диференцијацију мезенхималних матичних ћелија изолованих из зубне пулпе деце током процеса њихове *ex vivo* експанзије. Осим тога, резултати овог рада би требало да на свеобухватан начин покажу како се мења антиоксидативни статус мезенхималних матичних ћелија током субкултивације и да ли N-ацетил-L-цистеин има истоветна дејства на ћелије различите старости у култури што је важно са становишта евентуалне примене овог молекула приликом потенцијалне терапијске *ex vivo* експанзије ових ћелија. И поред интензивног рада и велике наде које се полажу у терапијски потенцијал ембрионалних матичних ћелија и индукованих плурипотентних матичних ћелија, матиче ћелије изоловане из постнаталних ткива и употребљене за терапију у облику аутологе трансплантације и даље представљају извор ћелија који са собом носи најмањи ризик од штетних последица трансплантације ћелија. Како је пулпа млечних зуба деце ткиво које се одбацује као медицински отпад, не постоје етичке препреке како за реализацију истраживања тако и за потенцијално складиштење и клиничку примену изолованих ћелија. Због тога је ова тема актуелна и може да допринесе како познавању биологије матичних ћелија, тако и проучавању њиховог терапијског потенцијала. Планирани експерименти у потпуности су у сагласности са постављеним циљевима и питањима на које ова дисертација треба да одговори. Узимајући у обзир досадашњи научно истраживачки рад кандидаткиње у овој области, Комисија сматра да ће истраживања предвиђена у овој докторској дисертацији бити једнако квалитетна и допринети развоју науке, посебно у области биологије матичних ћелија, те из тих разлога, са великим задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри Јасмини Дебељак Мартачић, дипломираним биологу, израду докторске дисертације под насловом: “Утицај N-ацетил-L-цистеина *in vitro* на пролиферацију и диференцијацију матичних ћелија зубне пулпе млечних зуба деце”.

Београд, 21.03.2012. године

Комисија:

Др Гордана Матић, редовни професор
Биолошког факултета, Универзитета у Београду

Др Милица Ковачевић Филиповић, ванредни професор
Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду

Др Вера Тодоровић, редовни професор Стоматолошког факултета у Панчеву,
Универзитета Привредна академија у Новом Саду

