

Биолошки факултет  
Број захтева: 33/21-1  
Датум: 30.1.2015.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

### ЗАХТЕВ

#### за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији за кандидата на докторским студијама

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 162/11-пречишћени текст, 167/12, 172/13 и 178/14), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији:

КАНДИДАТ: **Дренка И. Тривановић**

студент докторских студија на студијском програму Биологија, Имунобиологија  
пријавио је докторску дисертацију под називом:  
**„Изолација, карактеризација и функционална својства хуманих матичних ћелија  
масног ткива“**

из научне области: Биолошке науке.

Универзитет је дана 26.09.2013. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-4216/2-13 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

**„Изолација, карактеризација и функционална својства хуманих матичних ћелија  
масног ткива“**

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 09.10.2014. год, одлуком Факултета под бр. 15/663-09.10.2014. год. у саставу:

	Име и презиме члана комисије	звање	научна област	Установа у којој је запослен
1.	др Милена Катарановски	редовни професор	физиологија животиња и човека	Универзитет у Београду- Биолошки факултет
2.	др Диана Бугарски	научни саветник	експериментална хематологија и имунологија	Универзитет у Београду - Институт за медицинска истраживања
3.	др Александра Јауковић	научни сарадник	експериментална хематологија и имунологија	Универзитет у Београду - Институт за медицинска истраживања

**Напомена:** уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

**Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 30. јануара 2015. године.**

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

**Прилог: 1. Реферат комисије са предлогом.**

**2. Акт Наставно-научног већа факултета о усвајању реферата**

**3. Примедбе дате у току стављања реферата на увид у јавности, уколико је таквих примедби било.**

**4. Електронска верзија.**



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

33/21-30.1.2015.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 1. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета, Наставно-научно веће Факултета, на IV редовној седници одржаној 30.1.2015. године, донело је

**О Д Л У К У**

Прихвата се Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

**Дренке И. Тривановић**, под називом:  
**„Изолација, карактеризација и функционална својства хуманих матичних ћелија масног ткива“**

Универзитет је дана 26.09.2013. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-4216/2-13 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

**Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:**

**Б1. Радови у часописима међународног значаја:**

**1. Drenka Trivanović**, Slavko Mojsilović, Vesna Ilić, Jelena Krstić, Aleksandra Jauković, Ivana Okić-Đorđević, Juan Francisco Santibanez, Gordana Jovčić, Diana Bugarski. Immunomodulatory capacity of human mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue, dental pulp, peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly. *Centr Eur J Immunol* **2013**; 38 (4): 421-429. (M23)

**2. Drenka Trivanovic**, Srdjan Nikolic, Jelena Krstic, Aleksandra Jaukovic, Slavko Mojsilovic, Vesna Ilic, Ivana Okic-Djordjevic, Juan Francisco Santibanez, Gordana Jovic and Diana Bugarski. Characteristics of human adipose mesenchymal stem cells isolated from healthy and cancer affected people and their interactions with human breast cancer cell line MCF-7 in vitro. *Cell Biol Int* **2014**; 254-265. (M23)

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

Доставити:

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

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

На I редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној **09.10.2014.** године, прихваћен је извештај ментора др Диане Бугарски о урађеној докторској дисертацији Дренке И. Тривановић, истраживача сарадника у Институту за медицинска истраживања Универзитета у Београду, под насловом „**Изолација, карактеризација и функционална својства хуманих матичних ћелија масног ткива**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

1. проф. др Милена Катарановски, редовни професор и научни саветник, Биолошки факултет, Универзитет у Београду
2. др Диана Бугарски, научни саветник, Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду
3. др Александра Јауковић, 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 Дренке И. Тривановић, под називом **“Изолација, карактеризација и функционална својства хуманих матичних ћелија масног ткива”** својом темом, циљевима, методолошким приступом, добијеним резултатима и њиховим тумачењем, представља оригинални истраживачки допринос разумевању биологије хуманих матичних ћелија масног ткива.

Докторска дисертација Дренке Тривановић урађена је у Лабораторији за експерименталну хематологију и матичне ћелије, Института за медицинска

истраживања, Универзитета у Београду. Докторска дисертација под наведеним насловом написана је на 143 стране и садржи следећа поглавља: Увод (35 страна), Циљеви (3 стране), Материјал и методе (24 стране), Резултати (44 стране), Дискусија (15 страна), Закључци (3 стране) и Литература (19 страна). Дисертација укључује 24 слике, 26 графикона и 4 табеле. У прегледу литературе наведено је 280 библиографских јединица.

### **Анализа докторске дисертације:**

**УВОД** садржи 7 целина које дају комплетну слику о значајности истраживања матичних ћелија и њиховим функционалним карактеристикама. Посебна пажња је посвећена историјату истраживања матичних ћелија, њиховом открићу, својствима и потенцијалној примени у регенеративној медицини и ткивном инжењерингу. Наглашене су разлике међу првооткривеним хематопоезским матичним ћелијама, ембрионалним матичним ћелијама и мезенхимским матичним ћелијама (ММЋ). Такође је истакнуто да ММЋ могу бити изоловане како из адултних тако и неонаталних ткива, као и да их једноставна могућност изолације чини добрим потенцијалним кандидатима за примену у терапијске сврхе. Поред описаног регенеративног потенцијала мезенхимских матичних ћелија и њихове способности диференцијације у ћелије ткива мезодермалног, ектодермалног и ендодермалног порекла, значајно својство ових ћелија је њихов модулаторни капацитет у односу на имунске ћелије, што је од посебног интереса за њихову потенцијалну примену при трансплантацији ћелија и органа. Експресија површинских антигена, али и других молекула који имају улогу у модулацији имунског одговора од стране ММЋ је још увек недовољно испитана и описана у литератури, иако се посебно наглашава утицај фактора инфламаторне микросредине на функције ММЋ. Описана је и значајна улога ММЋ у свим процесима укљученим у опоравак оштећеног ткива, међу којима су: супресија имунског одговора, неоангиогенеза и диференцијација матичних ћелија присутних у ткиву. Истакнута је и способност ММЋ да мигрирају ка повређеним ткивима, у којима учествују у свим процесима регенерације и ремоделовања ткива, што је довело у везу ММЋ и развој туморског ткива. У склопу описа интеракција ММЋ и туморских ћелија, објашњена је значајност инфламаторних фактора туморске микросредине на однос ММЋ и туморских ћелија чије су последице на развој тумора у литератури различито описане и

објашњене, и чији механизми нису довољно разјашњени. У последњој целини, описано је масно ткиво као погодан извор адултних ММЋ, због своје широке распрострањености у организму и доступности, што упућује да ове ћелије могу да буду добра замена за ММЋ костне сржи. Посебна пажња је посвећена подацима који постоје о улози ММЋ масног ткива (АТ-ММЋ) у регулацији имунског одговора, као и интеракцијама ММЋ са туморским ћелијама. С обзиром да је масно ткиво и најзаступљеније ткиво дојке, при чему инфламаторна туморска микросредина значајно утиче на интеракције присутних АТ-ММЋ са ћелијама тумора дојке, и последични раст и метастазу туморског ткива, детаљно су представљени доступни подаци из литературе о ћелијским и хуморалним факторима присутним у туморској микросредини.

У складу са постојећим сазнањима, али и проблематиком у овој области, постављени су јасно дефинисани следећи **ЦИЉЕВИ** истраживања ове дисертације:

- Изолација и карактеризација АТ-ММЋ
- Испитивање имуномодулаторних функција АТ-ММЋ
- Одређивање утицаја АТ-ММЋ на туморске ћелије на моделу туморске ћелијске линије аденокарцинома дојке (MCF-7)

Опис експерименталног дизајна, целокупног материјала, као и примењених метода приказан је у поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**. Детаљно су објашњени поступци изолације АТ-ММЋ, као и примењене методе у циљу њихове карактеризације, уз одређивање протеинске и генске експресије молекула укључених у њихове функције. Дато је објашњење начина одређивања имуномодулаторног деловања АТ-ММЋ, уз коришћење BrdU и МТТ теста за процену пролиферације мононуклеарних ћелија периферне крви. У циљу одређивања утицаја АТ-ММЋ на туморске ћелије примењене су технике: МТТ тест, цитохемијска и имуноцитохемијска бојења, зимографија, анализа ћелијских протеина методом Western blot и анализа генске експресије методом RT-PCR. Резултати су анализирани у програму GraphPad Prism 5. За одрђивање вероватноће значајности разлике између два узорка коришћен је Student t-test. Статистички значајном је сматрана вероватноћа мања од 0,05.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ**, у три целине систематично и детаљно су описани сви добијени резултати, који су приказани у 12 слика и 26 графикана. У оквиру прве целине

приказане су основне карактеристике АТ-ММЋ изолованих из три типа масног ткива: масног ткива здравог донора (нАТ-ММЋ), масног ткива које није било у окружењу дијагностификованог тумора (тАТ-ММЋ) и масног ткива у непосредном окружењу туморског ткива дојке (тдАТ-ММЋ). Показано је да су сва три типа АТ-ММЋ испољавала морфологију и клоногени капацитет карактеристичан за ММЋ, те да међу њима није било разлика. Резултати су показали и да су сва три типа АТ-ММЋ испољавала сличан имунофенотип, показујући експресију CD маркера карактеристичних за ММЋ (CD44, CD90, CD105 и CD73), као и одсуство хематопоетских маркера, док је експресија CD34 била варијабилна. Показано је и да су АТ-ММЋ експримирале унутарћелијске протеине мезенихмских ћелија: Vimentin,  $\alpha$ -SMA и STRO-1, док нису испољавале маркере ембрионалних матичних ћелија. Даља карактеризација потврдила је мултипотентни потенцијал диференцијације изолованих АТ-ММЋ, односно способност остеогенезе, адипогенезе, хондрогенезе и миогенезе свих изолованих АТ-ММЋ.

У другом делу, резултати испитивања имуномодулаторног деловања АТ-ММЋ показали су различит утицај директних ћелијских контаката и солубилних фактора (кондиционираних медијума) АТ-ММЋ на пролиферацију моноклеарне ћелије периферне крви (МНЋ). Показано је да су при директним ћелијским контактима, АТ-ММЋ благо стимулисале спонтану пролиферацију МНЋ, док су значајно инхибирале митогеном и алоантигеном стимулисану пролиферацију МНЋ. С друге стране, кондиционирани медијуми АТ-ММЋ нису утицали на спонтану и митогеном стимулисану пролиферацију МНЋ, док су значајно инхибирали алоантигеном стимулисану пролиферацију МНЋ. Испитивања генске експресије молекула укључених у имуномодулаторно деловање показала су да су сва три типа АТ-ММЋ експримирали иРНК за HLA-A, HLA-DR, IDO-1, COX2, IL-6 и TGF- $\beta$ . Инфламаторни цитокини IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , примењени самостално или у комбинацији, индуковали су повећање генске експресије испитиваних молекула потенцијално укључених у имуномодулаторно деловање ММЋ.

У трећем делу овог поглавља, приказан је утицај АТ-ММЋ и њихових кондиционираних медијума на пролиферацију туморских ћелија, на моделу туморске ћелијске линије аденокарцинома дојке, MCF-7. Показано је да су сва три типа АТ-ММЋ при директним, али и индиректним, ћелијским контактима стимулисале пролиферацију MCF-7 ћелија. Кондиционирани медијуми прикупљени након 24 часа су такође

стимулисали пролиферацију MCF-7 ћелија, за разлику од кондиционираних медијума прикупљених након 48 часова култивације AT-MM $\bar{H}$  који су инхибирани пролиферацију MCF-7 ћелија. Инхибиторни ефекат кондиционираних медијума прикупљених након 48 часова култивације AT-MM $\bar{H}$  потврђен је и у случају других туморских ћелијских линија, док је изостао на нормалним не-туморским ћелијама. Двојако деловање MM $\bar{H}$  на туморске ћелије је често описано и у литератури, тако да је у даљим истраживањима детаљније испитан стимулативни ефекат кондиционираних медијума тдAT-MM $\bar{H}$  које су претретиране са проинфламаторним цитокинима IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  на пролиферацију MCF-7 ћелија. Кондиционирани медијуми тдAT-MM $\bar{H}$  нису утицали на способност стварања колонија MCF-7 ћелија, док су саме тдAT-MM $\bar{H}$  стимулисале ову активност туморских ћелија. Поред тога, кондиционирани медијуми тдAT-MM $\bar{H}$  претретираних инфламаторним цитокинима, смањили су способност адхезије MCF-7 ћелија, док су са друге стране стимулисали миграцију туморских ћелија. Такође је показано да су кондиционирани медијуми стимулисали процес епитело-мезенхимске транзиције MCF-7 ћелија, редукцијом протеинске и генске експресије E-кадхерина, не мењајући интрацелуларну локализацију  $\beta$ -катенина, а повећавајући протеинску и генску експресију Vimentina код MCF-7 ћелија. Кондиционирани медијуми третираних тдAT-MM $\bar{H}$  стимулисали су и ензимску активност, протеинску и генску експресију урокиназа (uPA), док нису утицали на ензимску активност матриксних металопротеиназа 2 (MMP2), иако су стимулисали њихову протеинску и генску експресију код MCF-7 ћелија. У циљу одређивања механизма којим кондиционирани медијуми третираних тдAT-MM $\bar{H}$  остварује своје ефекте на MCF-7 ћелије, анализирано је и учешће TGF- $\beta$  у интеракцијама AT-MM $\bar{H}$  са туморским ћелијама коришћењем фармаколошког инхибитора TGF- $\beta$  I рецептора (ALK5). Показано је да је присуство овог инхибитора поништило остварене стимулишуће ефекте кондиционираних медијума третираних тдAT-MM $\bar{H}$  на миграцију туморских ћелија, уз смањење протеинске и генске експресије урокиназа код MCF-7 ћелија. Присуство инхибитора поништило је и стимулишући ефекат кондиционираних медијума третираних тдAT-MM $\bar{H}$  на процес епитело-мезенхимске транзиције MCF-7 ћелија, блокирањем редукције протеинске експресије E-кадхерина и повећања протеинске експресије Vimentina. Овакви резултати наводе на закључак да се остварени ефекти кондиционираних медијума третираних тдAT-MM $\bar{H}$  на миграцију и епитело-мезенхимску транзицију MCF-7 ћелија бар делимично остварују посредством молекула TGF- $\beta$ .



У поглављу **ДИСКУСИЈА**, кандидат је на свеобухватан и детаљан начин повезао резултате овог истраживања са резултатима сличних истраживања објављених у међународним научним часописима. С обзиром на бројне контроверзне податке који постоје у савременој литератури, а тичу се дате проблематике, кандидат је критички анализирао своје резултате и изнео закључке који објашњавају резултате ове докторске дисертације у контексту резултата других аутора који имају исти научни интерес. Резултати истраживања која су изведена по први пут и о којима не постоје доступни подаци у научној литератури, објашњени су на одговарајући начин.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ**, на јасан начин су сумирани подаци који у потпуности произилазе из добијених резултата и одговарају задатим циљевима. Наиме, резултати су показали да АТ-ММЋ пореклом из масног ткива како здравог, тако и пацијената са малигнитетима имају сличне морфолошке и клонogene карактеристике, испољавајући сличан и имунофентип и мултипотентни потенцијал диференцијације. Изоловане АТ-ММЋ показују способност модулације имунског одговора како посредством директних ћелијских контаката са имунским ћелијама, тако и посредством солубилних фактора, а ова способност АТ-ММЋ је зависна од (инфламаторних) услова микросредине. Такође је показано да АТ-ММЋ, као и њихови кондиционирани медијуми могу да стимулишу пролиферацију туморских ћелија МСF-7, при чему инфламаторни фактори микросредине повећавају овај ефекат, као и ефекат солубилних фактора продукованих од старен тдАТ-ММЋ на друге функције МСF-7 ћелија које су повезане са инвазивношћу туморских ћелија и стицањем метастатског потенцијала.

У поглављу **ЛИТЕРАТУРА**, наведено је 280 одговарајућих библиографских јединица.

**Радови и конгресна саопштења у којима су представљени резултати ове докторске дисертације:**

**Б1. Радови у часописима међународног значаја**

**1. Drenka Trivanović**, Slavko Mojsilović, Vesna Ilić, Jelena Krstić, Aleksandra Jauković, Ivana Okić-Đorđević, Juan Francisco Santibanez, Gordana Jovčić, Diana Bugarski. Immunomodulatory capacity of human mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue, dental pulp, peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly. *Centr Eur J Immunol* **2013**; 38 (4): 421-429. **M23**

**2. Drenka Trivanovic**, Srdjan Nikolic, Jelena Krstic, Aleksandra Jaukovic, Slavko Mojsilovic, Vesna Ilic, Ivana Okic-Djordjevic, Juan Francisco Santibanez, Gordana Jovicic and Diana Bugarski. Characteristics of human adipose mesenchymal stem cells isolated from healthy and cancer affected people and their interactions with human breast cancer cell line MCF-7 in vitro. *Cell Biol Int* **2014**; 254–265. **M23**

**Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја**

**1. Trivanović D**, Ilić V, Kocić J, Krstić A, Mojsilović S, Okić-Djordjević I, Santibanez J, Bugarski D and Jovčić G. The immunomodulatory activity of human mesenchymal stem cells is related to different tissue origin. *Front. Immunol* **2013**. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI). doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00274 **M34**

### **Мишљење и предлог Комисије:**

Докторска дисертација кандидаткиње дипл. биол. Дренке Тривановић, под називом "Изолација, карактеризација и функционална својства хуманих матичних ћелија масног ткива " по својој форми и садржају, добро написаном уводу, дефинисаним циљевима, као и одговарајућем експерименталном дизајну и методологији, из којих су проистекли јасно образложени оригинални резултати који су компетентно продискутовани и на основу којих су донесени добро формулисани закључци, испуњава све критеријуме добро написаног научног рада. Ова свестрано и савремено урађена студија, представља оригинални истраживачки допринос разумевању биологије хуманих матичних ћелија масног ткива.

На основу изложене анализе докторске дисертације, Комисија закључује да су постављени циљеви докторске дисертације успешно реализовани. Због свега изложеног, Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати извештај о урађеној докторској дисертацији дипл. биол. Дренке Тривановић, под насловом " Изолација, карактеризација и функционална својства хуманих матичних ћелија масног ткива", и овај рад узме као основ за јавну одбрану.

---

*Проф. др Милена Катарановски, редовни професор  
и научни саветник, Биолошки факултет,  
Универзитет у Београду)*

---

*др Диана Бугарски, научни саветник, Институт за  
медицинска истраживања, Универзитет у  
Београду)*

---

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

У Београду, 2014. године.