

Биолошки факултет
Број захтева: 15/327-1
Датум: 13.06.2014.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 46. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду («Гласник Универзитета», број 131/06), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата: **Јелене М. Живковић, дипломираног биолога.**

КАНДИДАТ: **Јелена М. Живковић**

пријавио је докторску дисертацију под називом:

„Модулаторни ефекат макрофага на остеогени процес у ектопичном *in vivo* моделу и у *in vitro* условима“.

из научне области: Биолошке науке.

Универзитет је дана 26.12.2013. године, својим актом под бр. 02 Број: 61206-6271/2-13 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата која је гласила:

„Модулаторни ефекат макрофага на остеогени процес у ектопичном *in vivo* моделу и у различитим условима *in vitro*“

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата: **Јелене М. Живковић**, образована је на VII редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду-Биолошког факултета, одржаној 09.05.2014. год, одлуком Факултета под бр. 15/291-09.05.2014. год. у саставу:

Име и презиме члана Комисије	Звање	Научна област
1) Др Стево Најман	Редовни професор, Универзитет у Нишу- Медицински факултет	Биологија
2) Др Маја Чакић-Милошевић	Доцент, Универзитет у Београду- Биолошки факултет	Биологија ћелија и ткива
3) Др Јелена Живанов-Чурлис	Ванредни професор, Универзитет у Нишу- Медицински факултет	Биологија

Наставно-научно веће Биолошког факултета Универзитета у Београду прихватило је извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата: Јелене М. Живковић, на VIII редовној седници одржаној 13. јуна 2014. године.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

Прилог: 1. Извештај Комисије са предлогом.

2. Акт Наставно-научног већа факултета о усвајању извештаја

3. Потврда о раду



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

15/327-13.06.2014.

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 VIII редовној седници одржаној 13.06.2014. године, донело је

О Д Л У К У

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

Јелене М. Живковић, под називом:

„Модулаторни ефекат макрофага на остеогени процес у ектопичном *in vivo* моделу и у различитим условима *in vitro*“.

Универзитет је дана 26.12.2013. године, својим актом под бр. 02 Број: 61206-6271/2-13 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја: М-23

1. **Živković J**, Najman S, Vukelić M, Stojanović S, Aleksić M, Stanisavljević M, Najdanović J. Osteogenic effect of inflammatory macrophages loaded onto mineral bone substitute in subcutaneous implants. Arch Biol Sci. 2015; 67
2. **Janićijević J**, Najman S, Ignjatović N, Savić V, Kocić J, Vasiljević P, Vukelić M, Uskoković D. Nanomaterijal kalcijum-fosfat/poli-dl-laktid-ko-glikolid kao potencijalna tkivna matrica u osteoreparaciji pomoću kostne srži na modelu subkutane implantacije. Hem Ind. 2008; 62(3):205-210

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 VII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 09.05.2014. године, прихваћен је извештај ментора др Стеве Најмана, редовног професора Медицинског факултета Универзитета у Нишу и др Маје Чакић-Милошевић, доцента Биолошког факултета Универзитета у Београду о урађеној докторској дисертацији Јелене М. Живковић (рођене Јанићијевић), асистента на Медицинском факултету Универзитета у Нишу, под насловом „**Модулаторни ефекат макрофага на остеогени процес у ектопичном *in vivo* моделу и у различитим условима *in vitro***“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

1. др Стево Најман, редовни професор, Медицински факултет, Универзитет у Нишу,
2. др Маја Чакић-Милошевић, доцент, Биолошки факултет, Универзитет у Београду,
3. др Јелена Живанов-Чурлис, ванредни професор, Медицински факултет, Универзитет у Нишу.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију Кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Јелене М. Живковић под насловом „**Модулаторни ефекат макрофага на остеогени процес у ектопичном *in vivo* моделу и у различитим условима *in vitro***” написана је на 163 стране текста и садржи 50 слика и 6 графикона. Текст се састоји од 7 поглавља и то: Увод (20 страна), Предмет и циљ истраживања (1

страна), Материјал и методи (17 страна), Резултати (71 страна), Дискусија (30 страна), Закључци (3 стране) и Литература (21 страна).

Експериментални део ове докторске дисертације урађен је у Одељењу за ћелијско и ткивно инжењерство и другим одељењима и лабораторијама Научноистраживачког центра за биомедицину, као и лабораторијама Института за биологију и хуману генетику Медицинског факултета Универзитета у Нишу. Истраживања рађена у оквиру ове докторске дисертације су део пројекта ИИИ41017 који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

АНАЛИЗА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Поглавље **Увод** садржи шест главних потпоглавља чији су наслови по реду: *Проблем истраживања, Коштано ткиво, Веза између скелетног и имунског система, Макрофаги, Коштани дефекти и Приступи решавању проблема великих коштаных дефеката- улога регенеративне медицине и ткивног инжењерства.* У потпоглављу *Проблем истраживања* је дефинисано коштаног ткиво као изузетно динамично уз навођење да је релативно честа појава да повреде, болести и наследне малформације доведу до оштећења овог ткива. Акцент је бачен пре свега на велике дефекте коштаног ткива који не могу спонтано да зарасту. Указано је на потенцијалну примену макрофага у комбинацији са биоматеријалима и крвним угрушком у третману оваквих коштаных дефеката. Истакнуто је да су данас многа истраживања на пољу регенеративне медицине окренута ка макрофагима, као ћелијама које координирају процесе везане за репарацију оштећења коштаног ткива. Уколико би се пронашли механизми управљања овим ћелијама, то би имало велики значај за дефинисање одговарајућих третмана у циљу бржег оздрављења коштаног ткива након повреде. У потпоглављу *Коштано ткиво* су описане главне хистолошке карактеристике коштаног ткива и дат је преглед основних карактеристика ћелија коштаног ткива: остеобласта, остеокласта и ћелија које облажу коштаног ткиво. При томе је описана морфологија и функција ових ћелија, као и ток њихове диференцијације са освртом на главне факторе који усмеравају овај процес. У оквиру овог потпоглавља је дат и преглед основних компоненти ванћелијског матрикса коштаног ткива. У потпоглављу *Веза између скелетног и имунског система* акценат је бачен на функционалну повезаност макрофага и ћелија коштаног ткива у процесима формирања коштаног ткива, његовој регенерацији и репарацији. Истакнута је и важност контроле

инфламаторног процеса током зарастања. У потпоглављу *Макрофаги* дат је преглед основних морфолошких и функционалних карактеристика макрофага и тока њихове диференцијације. Нарочита пажња посвећена је различитим типовима макрофага према класификацији на основу њихових функционалних карактеристика. У потпоглављу *Коштани дефекти* указано је на проблем савремене цивилизације због пораста инциденце фрактура кости. Дат је детаљан преглед свих процеса који се одвијају током зарастања коштаног дефеката, а који су класификовани у фазу инфламације, обнове и ремоделирања. Нарочита пажња је посвећена различитим цитокинима и факторима раста који суделују у овим процесима и макрофагима као ћелијама које синтетишу већину ових фактора. У потпоглављу *Приступ и решавање проблема великих коштаног дефеката- улога регенеративне медицине и ткивног инжењерства* дат је пре свега осврт на употребу биоматеријала у процесима репарације и регенерације дефеката коштаног ткива.

У поглављу **Предмет и циљеви истраживања** као предмет истраживања ове докторске дисертације је дефинисано испитивање модулаторног ефекта различито третираних макрофага на ектопични остеогени процес *in vivo*, као и деловање макрофага различитог порекла и после различитих третмана на *in vitro* диференцијацију преостабластних ћелија.

Сходно предмету истраживања су дефинисани следећи циљеви:

1. Испитивање утицаја различито третираних макрофага, примењених као компоненте имплантата на остеогенезу *in vivo*, где су као њихов носач служиле грануле минералног матрикса кости (ММК) помешане са крвним угрушком. У ту сврху коришћен је модел индуковане ектопичне остеогенезе у субкутаном имплантима мишу. Импланти су се међусобно разликовали по начину третмана макрофага које садрже уз два типа контролних имплантата формираних од ММК и крвног угрушка и формираних само од ММК. Коришћени су перитонеални макрофаги миша после елицитације перитонеума тигликолатом или без елицитације. Неелицитирани резидентни макрофаги су третираны дексаметозоном или једном од две различите концентрације ЛПС-а или су коришћени нетретираны. Екстракција имплантата је рађена после 1, 2, 4 и 8 недеља.
2. Испитивање секретних производа макрофага различитог порекла и третираных на различите начине на диференцијацију преостабластних ћелија линије МС3Т3-Е1. У ту сврху су МС3Т3-Е1 ћелије култивисане у кондиционираном медијуму макрофага уз присуство остеогених фактора. Као негативна контрола су служиле

преостеобластне ћелије у стандардном медијуму, а као позитивна преостеобластне ћелије које су расле у остеогеном медијуму. Испитивани су кондиционирани медијуми макрофага мишје ћелијске линије RAW 264.7 после третмана дексаметазоном или једном од две различите дозе ЛПС-а.

У оквиру поглавља **Материјал и методи** детаљно је приказана коришћена експериментална методологија. Истраживање је изведено на сингеним мишевима Balb/c соја, мушког пола, старости 10-12 недеља. Импланти су формиран од носача за ћелије и макрофага. Носачи су имали и функцију скафолда који се користе у инжењерству ткива кости. То су били минерални матрикс кости (ММК) и крвни угрушак. Импланти су се међусобно разликовали по унетим перитонеалним макрофагима (ПМ). Контролни импланти нису садржавали макрофаге, већ само носаче. Импланти из различитих група су формиран од: носача + резидентних (нестимулисаних) ПМ; носача + тиогликолатом елицитираних ПМ; носача + ПМ третираних липополисахаридом у концентрацији 5 ng/ml; носача + ПМ третираних липополисахаридом у концентрацији 500 ng/ml; носача + ПМ третираних 5 x 10⁻⁶ М дексаметазоном; носача ММК + крвног угрушка; носача ММК + физиолошког раствора. Мишеви су насумично подељени у 7 експерименталних група на основу типа импланта, са 24 животиње по групи. Свакој животињи је субкутано интерскапуларно било имплантирано по 4 импланта истог типа. Импланти су екстраховани 1, 2, 4 и 8 недеља након имплантације.

Методe анализе импланата обухватале су хистохемијску и имунохистохемијску анализу. Хистохемијска анализа извршена је на ткивним пресецима бојеним техникама хематоксилин-еозин, трихромним бојењем по *Masson*-у и толуидин-плавим бојењем. Такође, на ткивним пресецима је имунохистохемијски детектовано присуство протеина остеопонтина и остеокалцина, специфичних за остеогенезу.

Експериментални рад у различитим *in vitro* условима подразумевао је прелиминарна истраживања на ПМ, истраживања на моноцитно-макрофагној ћелијској линији RAW 264.7 мишје леукемије и истраживања остеогене диференцијације преостеобластне ћелијске линије MC3T3-E1.

У оквиру прелиминарних истраживања урађена је анализа резидентних и тиогликолатом елицитираних ПМ, а затим и резидентних ПМ третираних са 1, 10 и 100 ng/ml липополисахарида на морфолошком и функционалном нивоу. Морфологија ћелија је анализирана након 24 h култивације под инвертним светлосним микроскопом, затим су сакупљени кондиционирани медијуми који су коришћени у есеју

цитотоксичности МТТ тестом, а испитивана је и продукција реактивних једињења кисеоника од стране ових ћелија семиквантитативним микроскопским NBT тестом.

У другом делу *in vitro* истраживања RAW 264.7 макрофаги су третирани липополисахаридом у концентрацијама 1 ng/ml или 100 ng/ml, дексаметазоном у концентрацији 10^{-6} M, или су култивисани у DMEM медијуму. Ћелије су третиране у трајању од 4 h наведеним концентрацијама липополисахарида, дексаметазоном или су култивисане у стандардном медијуму (DMEM). Затим су медијуми замењени свежим стандардним медијумом у коме су ћелије култивисане још 20 h. Након истека овог периода анализирана је ћелијска морфологија и цитотоксичност кондиционираних медијума МТТ тестом.

Експерименти остеогене диференцијације подразумевали су третман преостеобластних MC3T3-E1 ћелија кондиционираним медијумима RAW 264.7 макрофага из третмана спроведених у другом делу *in vitro* истраживања, којима су додати остеогени фактори (аскорбинска киселина и β -глицерофосфат). Контролне групе су биле MC3T3-E1 ћелије култивисане у остеогеном медијуму или стандардном медијуму DMEM. Пре експеримента са остеогеном диференцијацијом ћелија, урађен је МТТ тест пролиферације MC3T3-E1 ћелија гајених у 100%, 50% и 25% кондиционираним медијумима, на основу чега су за остеогену диференцијацију MC3T3-E1 ћелија изабрани 100% и 25% кондиционирани медијуми. Степен остеогене диференцијације одређиван је бојењем *Von Kossa* и имуноцитохемијским бојењима на остеопонтин и остеокалцин.

Резултати докторске дисертације су подељени у два велика дела: *Резултати in vivo истраживања* и *Резултати in vitro истраживања*. *Резултати in vivo истраживања* су систематизовани у четири групе на основу четири термина екстракције импланата. За сваку групу импланата су представљени резултати хистоморфолошке и имунохистохемијске анализе у виду микрографија. Сви типови импланата показали су хемотаксично деловање на различите типове ћелија. У каснијим терминима посматрања добар ангиогени и остеогени ефекат показали су импланти са резидентним ПМ, као и импланти са макрофагима третираним дексаметазоном. У имплантима са макрофагима третираним са 500 ng/ml липополисахарида остеогени процес је супримиран.

Резултати in vitro истраживања су систематизовани у три групе. У првом делу су представљени резултати морфолошке и функционалне анализе резидентних и тиогликолатом елицитираних ПМ, на основу којих су тиогликолатом елицитирани ПМ

сврстани у групу инфламаторних макрофага. У другој групи су приказани резултати морфолошке и функционалне анализе резидентних ПМ третираних различитим концентрацијама липополисахарида. Ови резултати су показали да деловање липополисахарида на резидентне ПМ зависи од његове концентрације. У трећој групи су показани резултати из третмана RAW 264.7 макрофага липополисахаридом и дексаметазоном, као и кондиционираних медијума ових ћелија на остеогену диференцијацију преостеобластних MC3T3-E1 ћелија у култури. Кондиционирани медијуми дексаметазоном третираних и нетретираних макрофага имали су повољан ефекат на брзину остеогене диференцијације MC3T3-E1 ћелија, што је потврђено бојењем *Von Kossa* и имуноцитохемијским бојењима. Кондиционирани медијуми макрофага третираних липополисахаридом у концентрацији 100 ng/ml имали су негативан ефекат на брзину остеогене диференцијације MC3T3-E1 ћелија.

У првом делу **Дискусије** добијених резултата дискутовано је о модулаторном ефекту макрофага на динамику остеогеног процеса у субкутаном имплантима. У том смислу је извршена компарација процеса ресорпције и ангиогенезе, компарирана је везивно-ткивна архитектура и имуноекспресија остеогених маркера, као и остеогени потенцијал свих типова импланата из свих опсервационих термина. У другом делу **Дискусије** извршена је анализа повезаности функционалног стања макрофага и остеолепарторног процеса на моделима *in vitro*. Најпре су међусобно упоређене морфолошке и функционалне карактеристике резидентних и тиогликолатом елицитираних ПМ. Затим је анализиран утицај различитих концентрација липополисахарида на морфолошке и функционалне карактеристике резидентних ПМ. Такође је дискутован утицај липополисахарида и дексаметазона на секретну активност макрофага и утицај њихових кондиционираних медијума на остеогену диференцијацију преостеобласта у култури. На крају овог поглавља су представљена интегрална разматрања *in vivo* и *in vitro* сопствених и других истраживања са могућим научним и практичним импликацијама резултата дисертације. Истакнуто је да је мало литературних података о улози макрофага у процесима остеогенезе и репарације кости. С обзиром на ову чињеницу, већина добијених резултата представља оригиналан научни допринос области истраживања регенеративне медицине и ткивног инжењерства коштаног ткива.

У поглављу **Закључци** за део дисертације који се односи на *in vivo* експерименте аутор истиче да:

- Процес ресорпције минералног матрикса кости импланата у испитиваном ектопичном *in vivo* моделу је присутан у свим испитиваним периодима током 8 недеља експеримента, али да је најизраженији у имплантима са макрофагима третираним липополисахаридом у концентрацији 500 ng/ml.
- Степен ангиогеног процеса се разликује у зависности од претходног третмана макрофага од којих је састављен имплант, да је ангиогени процес врло изражен током свих 8 недеља експеримента ако су унети макрофаги нестимулисани, тиогликолатом елицитирани, третиранли липополисахаридом у концентрацији 5 ng/ml или третиранли дексаметазоном, а да најслабију ангиогену активност након 8 недеља од имплантације показују импланти састављени од самог минералног матрикса.
- Динамика промена везивно-ткивне архитектуре импланата зависи од типа импланта, при чему је две и четири недеље након имплантације густина ћелија у везивном ткиву знатно повећана у свим испитиваним типовима импланата, да се депоновање колагена у првој недељи након имплантације може уочити превасходно у периферним деловима импланата и везивној капсули, док се у осталим терминима уочава и у унутрашњости импланата, а да су највеће разлике у заступљености колагена уочене 8 недеља након имплантације и да у имплантима са макрофагима третираним липополисахаридом инфилтрација неутрофила постоји и после осам недеља од имплантације, што је нарочито изражено у имплантима са перитонеалним макрофагима третираним липополисахаридом у концентрацији 500 ng/ml.
- Остеогени процес има највећу активност у имплантима са нестимулисаним, а затим и дексаметазоном третираним перитонеалним макрофагима, да је супримиран у каснијим периодима у имплантима са макрофагима третираним са 500 ng/ml липополисахарида и да минерални матрикс кости нема способност да сам подржи ектопичан остеогени процес.

Најважнији закључци из дела дисертације који се односи на *in vitro* експерименте су да:

- Тиогликолатом елицитирани перитонеални макрофаги показују морфолошке и функционалне карактеристике инфламаторних макрофага, да липополисахарид доводи до морфолошких и функционалних промена резидентних перитонеалних макрофага на дозно зависан начин, да је диференцијација преостеобласта у остеобласте највише убрзана у кондиционираном медијуму RAW 264.7 макрофага

третираних дексаметазоном и да кондиционирани медијум RAW 264.7 макрофага третираних липополисахаридом у концентрацији 100 ng/ml успорава диференцијацију преостеобласта у остеобласте.

У поглављу **Литература** наведене су 244 релевантне библиографске јединице које су у складу са тематиком докторске дисертације и које доприносе тумачењу добијених резултата.

БИБЛИОГРАФИЈА

Радови и конгресна саопштења из уже научне области:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

М-23

1. **Živković J**, Najman S, Vukelić M, Stojanović S, Aleksić M, Stanisavljević M, Najdanović J. Osteogenic effect of inflammatory macrophages loaded onto mineral bone substitute in subcutaneous implants. Arch Biol Sci. 2015; 67
2. Vukelic M, Mitic Z, Miljkovic M, **Zivkovic J**, Ignjatovic N, Uskokovic D, Zivanov-Curlis J, Vasiljevic P, Najman S. Apatite formation on nanomaterial calcium phosphate/poly-DL-lactide-co-glycolide in simulated body fluid. J Appl Biomater Function Mater. 2012; 10(1):e43-48
3. **Janićijević J**, Najman S, Ignjatović N, Savić V, Kocić J, Vasiljević P, Vukelić M, Uskoković D. Nanomaterijal kalcijum-fosfat/poli-dl-laktid-ko-glikolid kao potencijalna tkivna matrica u osteoreparaciji pomoću kostne srži na modelu subkutane implantacije. Hem Ind. 2008; 62(3):205-210

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

М-52

1. Vukelić M, Mitić Ž, Miljković M, **Živković J**, Ignjatović N, Uskoković D, Vasiljević P, Petković M, Živanov-Ćurlis J, Najman S. Interaction of biomaterials containing calcium hydroxyapatite/poly-L-lactide with the simulated body fluid. Acta Medica Medianae. 2011; 50(4):35-39

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

М-34

1. **Janićijević J**, Najman S, Beljić N, Vukelić M, Ignjatović N, Uskoković D, Đorđević Lj, Vasiljević P. Osteogenic activity in a mice subcutaneous implant of porous hydroxyapatite/poly-L-lactide loaded with bone marrow cells. Ninth Annual Conference of the Yugoslav Materials Research Society YUCOMAT, Herceg Novi, Montenegro, The Book of Abstracts, 2007, p.181
2. Vukelić M, Mitić Ž, **Janićijević J**, Živanov-Čurlis J, Najman S. Fourier-transform IR spectroscopic study of biomaterials made of poly-L-lactide and poly(DL-lactide-co-glycolide). Sixth International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries, Sofia, Bulgaria, Book of Abstracts, 2008, p.444
3. Vukelić M, Kitić D, Pavlović D, Živanov-Čurlis J, **Živković J**, Najman S. Examination of different raspberry leaves (*Rubus idaeus* L.) methanol extracts on HeLa cells viability and proliferation. IV Congress of the Serbian Genetic Society, Tara, Srbija, Zbornik abstrakata, 2009, p.62
4. Ćirić M, Najman S, Bojanić V, Cekić S, Nešić M, Branković S, Najman S, Petrović S, **Živković J**. Neonatal programming: influence of monosodium glutamate on the growth of female in the peripubertal period. XLVIII Congress of Anthropological Society of Serbia-with international participation, Prolom banja, Srbija, Zbornik abstrakata, 2009, p.47
5. Najdanovic J, Stojanovic S, Zivkovic P, **Zivkovic J**, Vasiljevic P, Najman S. In vitro osteogenic differentiation and phenotypisation of mouse adipose tissue derived mesenchymal cells. IX International Congress of medical Sciences, Sofia, Bulgaria, Abstract Book, 2010, p.57
6. Vukelic M, Mitic Z, Miljkovic M, **Zivkovic J**, Vasiljevic P, Djordjevic Lj, Zivanov-Curlis J, Ignjatovic N, Uskokovic D, Najman S. Scanning electron microscopic analysis of HAP/PLLA biocomposite after interaction with simulated body fluid. IX International Congress of medical Sciences, Sofia, Bulgaria, Abstract Book, 2010, p.58
7. Dodic N, Najdanovic J, Vukelic M, **Zivkovic J**, Stojanovic S, Stanisavljevic M, Stojiljkovic M. The effect of the hydrogel poly(ethylene glycol) dimetacrylates on the

viability and proliferation. 6th International Pirogov scientific medical conference of students and young scientists, Moscow, Russia, Abstract Book, 2011, p.226

8. Vukelić M, Najman S, **Živković J**, Stanisavljević M, Cvetković V, Najdanović J, Živanov-Čurlis J. The role of peripheral blood cells in the induction of ectopic osteogenesis. Thirteenth Annual Conference of the Yugoslav Materials Research Society YUCOMAT, Herceg Novi, Montenegro, The Book of Abstracts, 2011, p.174
9. Stojanović S, Najman SJ, Najdanović J, **Živković J**, Najman SS, Ignjatović N, Uskoković D. Application of MTT viability test for biocompatibility examination of N-CP/DLPLG nanoparticles on cell cultures. Conference for Young Scientists, The Ninth Students Meeting, SM-2011 Processing and application of ceramics. Novi Sad, Serbia, Book of abstracts, 2011, p.66
10. Najman S, Stojanović S, Najdanović J, **Živković J**, Petrović D, Vučković I, Cvetković V, Sekulović Lj, Tričković-Vukić D, Vukelić M, Vasiljević P, Trajanović M. Adipose derived mesenchymal stem cells as a model for study of osteoinductive activity of bone substituting biomaterials. Fourteenth Annual Conference of the Yugoslav Materials Research Society YUCOMAT, Herceg Novi, Montenegro, The Book of Abstracts, 2012, p.126
11. Najman S, Najdanović J, Petrović D, Vučković I, **Živković J**, Stojanović S, Cvetković V, M. Vukelić, Sekulović Lj, Djindjić B. Osteo-regenerative potential of adipose tissue derived mesenchymal stem cells. XXXII Balkan Medical Week, Nis, Serbia, Book of Abstracts, 2012
12. Najman S, Petrović D, Vučković I, **Živković J**, Stojanović S, Uskoković D. Osteogenic potential of freshly isolated cells of adipose-derived mesenchymal fraction applied with nanoparticles. Fifteenth Annual Conference of the Yugoslav Materials Research Society YUCOMAT, Herceg Novi, Montenegro, The Book of Abstracts, 2013, p.45

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

M-64

1. Veselinović M, Najdanović J, Kocić J, Stojanojević M, Vasiljević P, **Janićijević J**, Ignjatović N, Uskoković D, Najman S. Efekat nanomaterijala N-CP/DLPLG na rast HeLa

ćelija u kulturi. Sedma konferencija mladih istraživača-nauka i inženjerstvo novih materijala, Beograd, Srbija, Zbornik abstrakata, 2008, str.22

2. Vukelić M, Mitić Ž, Miljković M, **Živković J**, Vasiljević P, Živanov-Ćurlis J, Ignjatović N, Uskoković D, Najman S. Interakcija nanomaterijala kalcijum-fosfata/poli-dl-laktida-ko-glikolida (N-CP/PLGA) i simulisane telesne tečnosti. Osmo konferencija mladih istraživača-nauka i inženjerstvo novih materijala, Beograd, Srbija, Zbornik abstrakata, 2009, str. 20
3. **Živković J**, Stojanović S, Najdanović J, Tričković-Vukić D, Stanisavljević M, Vukelić M, Rajković J, Cvetković V, Živanov-Ćurlis J, Najman S. Procena produkcije slobodnih radikala kiseonika u peritonealnim makrofagima miša semikvantitativnim mikroskopskim NBT testom. Drugi kongres Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju- Život sa slobodnim radikalima: Hemija, Biologija, Medicina, Niš, Srbija, Knjiga sažetaka, 2013, str. 62

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

M-23

3. **Živković J**, Najman S, Vukelić M, Stojanović S, Aleksić M, Stanisavljević M, Najdanović J. Osteogenic effect of inflammatory macrophages loaded onto mineral bone substitute in subcutaneous implants. Arch Biol Sci. 2015; 67
4. **Janićijević J**, Najman S, Ignjatović N, Savić V, Kocić J, Vasiljević P, Vukelić M, Uskoković D. Nanomaterijal kalcijum-fosfat/poli-dl-laktid-ko-glikolid kao potencijalna tkivna matrica u osteoreparaciji pomoću kostne srži na modelu subkutane implantacije. Hem Ind. 2008; 62(3):205-210

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

M-34

1. **Janićijević J**, Najman S, Beljić N, Vukelić M, Ignjatović N, Uskoković D, Đorđević Lj, Vasiljević P. Osteogenic activity in a mice subcutaneous implant of porous

- hydroxyapatite/poly-L-lactide loaded with bone marrow cells. Ninth Annual Conference of the Yugoslav Materials Research Society YUCOMAT, Herceg Novi, Montenegro, The Book of Abstracts, 2007, p.181
2. Vukelić M, Mitić Ž, **Janićijević J**, Živanov-Čurlis J, Najman S. Fourier-transform IR spectroscopic study of biomaterials made of poly-L-lactide and poly(DL-lactide-co-glicolide). Sixth International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries, Sofia, Bulgaria, Book of Abstracts, 2008, p.444
 3. Najdanovic J, Stojanovic S, Zivkovic P, **Zivkovic J**, Vasiljevic P, Najman S. In vitro osteogenic differentiation and phenotypisation of mouse adipose tissue derived mesenchymal cells. IX International Congress of medical Sciences, Sofia, Bulgaria, Abstract Book, 2010, p.57
 4. Vukelic M, Mitic Z, Miljkovic M, **Zivkovic J**, Vasiljevic P, Djordjevic Lj, Zivanov-Curlis J, Ignjatovic N, Uskokovic D, Najman S. Scanning electron microscopic analysis of HAP/PLLA biocomposite after interaction with simulated body fluid. IX International Congress of medical Sciences, Sofia, Bulgaria, Abstract Book, 2010, p.58
 5. Vukelić M, Najman S, **Živković J**, Stanisavljević M, Cvetković V, Najdanović J, Živanov-Čurlis J. The role of peripheral blood cells in the induction of ectopic osteogenesis. Thirteenth Annual Conference of the Yugoslav Materials Research Society YUCOMAT, Herceg Novi, Montenegro, The Book of Abstracts, 2011, p.174
 6. Stojanović S, Najman SJ, Najdanović J, **Živković J**, Najman SS, Ignjatović N, Uskoković D. Application of MTT viability test for biocompatibility examination of N-CP/DLPLG nanoparticles on cell cultures. Conference for Young Scientists, The Ninth Students Meeting, SM-2011 Processing and application of ceramics. Novi Sad, Serbia, Book of abstracts, 2011, p.66
 7. Najman S, Stojanović S, Najdanović J, **Živković J**, Petrović D, Vučković I, Cvetković V, Sekulović Lj, Tričković-Vukić D, Vukelić M, Vasiljević P, Trajanović M. Adipose derived mesenchymal stem cells as a model for study of osteoinductive activity of bone substituting biomaterials. Fourteenth Annual Conference of the Yugoslav Materials Research Society YUCOMAT, Herceg Novi, Montenegro, The Book of Abstracts, 2012, p.126
 8. Najman S, Najdanović J, Petrović D, Vučković I, **Živković J**, Stojanović S, Cvetković V, M. Vukelić, Sekulović Lj, Djindjić B. Osteo-regenerative potential of adipose tissue

derived mesenchymal stem cells. XXXII Balkan Medical Week, Nis, Serbia, Book of Abstracts, 2012

9. Najman S, Petrović D, Vučković I, **Živković J**, Stojanović S, Uskoković D. Osteogenic potential of freshly isolated cells of adipose-derived mesenchymal fraction applied with nanoparticles. Fifteenth Annual Conference of the Yugoslav Materials Research Society YUCOMAT, Herceg Novi, Montenegro, The Book of Abstracts, 2013, p.45

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

M-64

1. Veselinović M, Najdanović J, Kocić J, Stojanojević M, Vasiljević P, **Janićijević J**, Ignjatović N, Uskoković D, Najman S. Efekat nanomaterijala N-CP/DLPLG na rast HeLa ćelija u kulturi. Sedma konferencija mladih istraživača-nauka i inženjerstvo novih materijala, Beograd, Srbija, Zbornik abstrakata, 2008, str.22
2. Vukelić M, Mitić Ž, Miljković M, **Živković J**, Vasiljević P, Živanov-Čurlis J, Ignjatović N, Uskoković D, Najman S. Interakcija nanomaterijala kalcijum-fosfata/poli-dl-laktida-ko-glikolida (N-CP/PLGA) i simulisane telesne tečnosti. Osmo konferencija mladih istraživača-nauka i inženjerstvo novih materijala, Beograd, Srbija, Zbornik abstrakata, 2009, str. 20
3. **Živković J**, Stojanović S, Najdanović J, Tričković-Vukić D, Stanisavljević M, Vukelić M, Rajković J, Cvetković V, Živanov-Čurlis J, Najman S. Procena produkcije slobodnih radikala kiseonika u peritonealnim makrofagima miša semikvantitativnim mikroskopskim NBT testom. Drugi kongres Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju- Život sa slobodnim radikalima: Hemija, Biologija, Medicina, Niš, Srbija, Knjiga sažetaka, 2013, str. 62

МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Докторска дисертација Јелене М. Живковић под насловом „**Модулаторни ефекат макрофага на остеогени процес у ектопичном *in vivo* моделу и у различитим условима *in vitro***“ бави се питањем како преко макрофага као посредника може да се утиче на остеогени процес у циљу оптимизације репараторног процеса коштаног ткива након повреде. Макрофаги су ћелије које врло рано мигрирају до места повреде коштаног ткива и својим деловањем на друге ћелије и екстраћелијски матрикс, директно или секрецијом различитих фактора, битно утичу на коначан исход зарастања коштаног дефеката. Ова дисертација је урађена на хипотези да се утврђивањем начина контроле активности макрофага у репарацији кости може одредити одговарајући третман у циљу бржег и потпунијег оздрављења коштаног ткива након повреде.

У овој докторској дисертацији Кандидаткиња испитује утицај нестимулисаних и на различите начине стимулисаних макрофага на остеогени процес *in vivo* и у различитим условима *in vitro*. У оквиру *in vivo* експеримената Кандидаткиња је на моделу ектопичне остеогенезе поредила импланте које су чинили минерални матрикс кости (ММК), крвни угрушак и макрофаги, при чему су импланти били дизајнирани тако да се разликују по начину третмана макрофага који су укључени у њихову структуру. Модел индуковане ектопичне остеогенезе је обезбедио анализу базичних интеракција компоненти импланта, без утицаја микросредине коштаног ткива. Такође, утицај макрофага различитог порекла и под различитим третманима, као и њихових секретних производа испитиван је се на моделу остеогенезе *in vitro*. Овај експериментални модел искључује утицаје осталих ћелија који постоје *in vivo*, а служио је за испитивање утицаја кондиционираних медијума макрофага на пролиферацију и диференцијацију преостеобластних ћелија у култури.

Резултати докторске дисертације кандидаткиње **Јелене М. Живковић** представљају значајан научни допринос у разумевању могућности како да се помоћу деловања на макрофаге управља процесима остеогенезе и репарације коштаног ткива. Научни значај експерименталних резултата које је Кандидаткиња приказала поткрепљује и чињеница да је мало литературних података о модулаторном ефекту макрофага на наведене процесе. Резултати из ове докторске дисертације потврђују да деловање на функционално стање макрофага може бити средство за усмеравање процеса остеогенезе, јер начин на који ће макрофаги деловати на остеогени процес

зависи пре свега од њиховог функционалног стања. Због тога је рационална контрола реакције макрофага значајна за креирање стратегија коштано-ткивног инжењерства и клиничког приступа остеорегенерацији. На овај начин проширују се могућности циљаног деловања на побољшање процеса обнављања коштаног ткива после повреде, што може бити од посебног значаја у ткивном инжењерству и клиничкој пракси.

Имајући у виду научну вредност и потенцијални практични значај резултата, Комисија са посебним задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати извештај о урађеној докторској дисертацији кандидаткиње **Јелене М. Живковић** под насловом „**Модулаторни ефекат макрофага на остеогени процес у ектопичном *in vivo* моделу и у различитим условима *in vitro***“ и овај рад узме као основ за јавну одбрану и стицање звања доктора биолошких наука.

КОМИСИЈА:

У Београду, 27.05.2014. године.

др Стево Најман, редовни професор,
Медицински факултет, Универзитет у
Нишу

др Маја Чакић-Милошевић, доцент,
Биолошки факултет, Универзитет у
Београду

др Јелена Живанов-Чурлис, ванредни
професор, Медицински факултет,
Универзитет у Нишу