

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-746/21 од 20.07.2016. год, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **др мед. Сање Бојић** под називом:

“ Испитивање површинских маркера и оптимизација протокола за *ex vivo* експанзију лимбаних матичних ћелија ”GMP” степена квалитета“

На основу одлуке Већа за медицинске науке, формирана је комисија у саставу:

1. **Проф. др Миодраг Стојковић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, председник;
2. **Доц. др Дарко Боснаковски**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета „Гоце Делчев“ у Штипу, БЈР Македонија за ужу научну област Фармакогенетика и биотехнологија, члан;
3. **Доц. др Марија Миловановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат др мед. Сања Бојић испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Биографија кандидата

А. Лични подаци

Сања Бојић је рођена 15.12.1982. године у Нишу. Школске 2001/2002 године уписала је Медицински факултет Универзитета у Нишу, одсек медицина. Током основних студија била је стипендиста Републичке фондације за младе таленте и Града Ниша. У току студирања, школске 2005/2006 и 2006/2007 године учествовала је у настави као демонстратор на предмету Патологија. Дипломирала је 2008. године са просечном оценом 9,89. Након дипломирања обавила је лекарски стаж и положила стручни испит. Школске 2008/2009 године уписала је Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Хумана репродукција и развој. Током докторских студија била је стипендиста Министарства за науку и технолошки развој. Усмени докторски испит је положила са оценом 10. Од марта 2012. године је ради као сарадник у настави а затим и као асистент на предмету Хумана генетика на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Од октобра 2014. године до данас ради као истраживач на Институту за хуману генетику Универзитета у Њукаслу, Велика Британија. Говори енглески и немачки језик и познаје рад на рачунару.

Б. Научно-истраживачки рад

Кандидат, др мед. Сања Бојић се активно бави научно-истраживачким радом у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета медицинских наука у Крагујевцу и на Институту за хуману генетику Универзитета у Њукаслу, Велика Британија.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: “Испитивање површинских маркера и оптимизација протокола за *ex vivo* експанзију лимбаних матичних ћелија ”GMP” степена квалитета“

Предмет: Оптимизација процедуре *ex vivo* експанзије и транспорта LSC GMP степена квалитета за хуману трансплантацију и идентификација специфичног површинског маркера LSC.

Хипотезе: Не постоји разлика у пролиферацији, диференцијацији и дистрибуцији LSC између експантата култивисаних у новоформулисаном медијуму GMP ранга и експантата култивисаних у традиционалном медијуму.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, др мед. Сања Бојић, положила је усмени докторски испит са оценом 10 (десет). Објавила је рад у целини у часопису са SCI листе, у коме је она први аутор, чиме је испунила услов за пријаву докторске дисертације.

Bojic S. Volarevic V, Ljubic B, Stojkovic M. Dental stem cells-characteristics and potential. *Histol Histopathol.* 2014; 29(6):699-706. (M22)

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Присуство интакног лимбалног епитела неопходно је за одржавање интегритета и прозирности рожњаче. У пределу лимбуса се налази ниша тзв. лимбалних матичних ћелија (*енг. Limbal Stem Cells, LSC*) које пролиферишу и диференцирају се у ћелије епитела рожњаче и представљају извор корнеалних епителних ћелија током живота. Дефицијенција лимбалних матичних ћелија (*енг. Limbal Stem Cell Deficiency, LSCD*) резултира губитком цитоархитектуре рожњаче са последичном конјуктивализацијом рожњаче, појавом епителијалних дефеката и стварањем ожиљног ткива што је праћено хроничном инфламацијом, болом, фотосензитивношћу, губитком прозирности рожњаче и

поремећајем вида. Пацијенти са тоталном LSCD могу се успешно лечити аутологом трансплантацијом лимбалног ткива са здравог ока (унилатерални случајеви) или алогеном трансплантацијом лимбалног ткива добијеног од сродних и несродних донора или кадавера (билатерални случајеви). *Ex vivo* експанзија LSC као релативно нова техника захтева константну евалуацију и оптимизацију, између осталог и компоненти медијума за култивацију, у циљу минимизирања ризика по пацијента. Како терапијска употреба LSC мора бити у складу са принципима Добре произвођачке праксе (*енг. Good Manufacturing Practice, GMP*) ради обезбеђења квалитета и сигурности ћелијског продукта за трансплантацију, намеће се потреба да се састојци традиционалног медијума истраживачког степена квалитета замене компонентама GMP степена квалитета чиме би се омогућила продукција LSC GMP ранга. Осим култивације, на квалитет финалног ћелијског продукта утичу и услови транспорта почетног материјала (биопсија) као и услови транспорта и складиштења добијених лимбалних епителијалних мембрана који до сада нису прецизно дефинисани.

Због недостатка специфичних маркера идентификација и изолација LSC представљају компликован задатак. До сада није прецизно утврђен маркер LSC иако је током последњих година предложено неколико могућих маркера. Један од њих је p63, најпре идентификован као маркер матичних ћелија кератиноцита. Утврђивањем специфичног маркера потенцијално би се унапредио ткивни инжењеринг LSC и успешност трансплантације. Такав помак је ургентно потребан узимајући у обзир растући недостатак ткива рожњаче широм света.

2.5. Значај и циљ истраживања

Основни циљеви истраживања су оптимизација процедуре *ex vivo* експанзије и транспорта LSC GMP степена квалитета за хуману трансплантацију и идентификација површинског маркера карактеристичног за LSC.

У складу са основним циљевима поставили смо следеће експерименталне задатке:

- 1) Формулација медијума за *ex vivo* експанзију LSC GMP степена квалитета и процена његовог утицаја на пролиферацију, дистрибуцију и диференцијацију LSC
- 2) Оптимизација услова транспорта почетног материјала (биопсија)
- 3) Оптимизација услова транспорта финалног ћелијског продукта (лимбалних епителијалних мембрана)
- 4) Испитивање површинских маркера и утврђивање маркера карактеристичног за LSC.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

У досадашњим студијама за *ex vivo* експанзију LSC коришћен је традиционални медијум за култивацију истраживачког степена квалитета. Продукција LSC GMP ранга подразумева коришћење медијума GMP степена квалитета како би се обезбедио квалитет и сигурност ћелијског продукта за трансплантацију. Из тог разлога намеће се потреба за формулисањем новог медијума који ће у потпуности одговарати смерницама Добре прозвођачке праксе.

Иако је последњих година предложено неколико потенцијалних маркера, до сада није прецизно утврђен специфичан маркер LSC што отежава њихову идентификацију и изолацију.

Из наведених разлога ово истраживање ће бити усмерено ка формулацији медијума GMP степена квалитета и идентификацији маркера специфичног за LSC.

2.7. Методе истраживања

Донорско ткиво

Хумано лимбално ткиво добијаће се од остатака корнеосклералних прстенова након уклањања централног дела рожњаче за трансплантацију од *National Health Service Blood and Transplant (NHSBT) Cornea Transplantation Service*, очних банака из Бристола и Манчестера, Велика Британија. Хумане амнионске мембране (ХАМ) набављаће се у виду

појединачних јединица величине 3x3cm² на нитроцелулозном папиру од *NHSBT Tissue Service*. За употребу хуманог ткива у истраживачке сврхе биће обезбеђен информисани пристанак у сагласности са Хелсиншком декларацијом.

Култивација LSC

Традиционални медијум за култивацију правиће се по раније установљеној рецептури: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) са ниским садржајем глукозе и Ham's F12 медијум у односу 3:1, хумани серум 10%, penicillin/streptomycin 1%, хидрокортизон 0.4 µg/ml, инсулин 5µg/ml, тријодотиронин 1.4 ng/ml, аденин 24 µg/ml, колера токсин 8.4 ng/ml и епидермални фактор раста (*енг. epidermal growth factor*, EGF) 10 ng/ml. За припрему медијума GMP степена квалитета као замена за хидрокортизон биће коришћен Solu-Cortef[®] (hydrocortisone sodium succinate), Actrapid[®] (хумани инсулин продукован у *Saccharomyces cerevisiae*) као замена за инсулин истраживачког степена квалитета, Liothyronine (liothyronine sodium) као замена за тријодотиронин а Isoprenaline као замена за колера токсин заједно са with EGF-ом GMP ранга у количинама еквивалентним састојцима у традиционалном медијуму. GMP медијум ће садржати DMEM:Ham's F12 у односу 3:1, хумани серум 10%, penicillin/streptomycin 1%, Solu-Cortef[®] 0.4 µg/ml, Actrapid[®] 5µg/ml, Liothyronine 1.4ng/ml, Isoprenaline 2 µg/ml, adenine 24 µg/ml и GMP-grade EGF 10 ng/ml. Примена антибиотика биће обустављена 3. дана култивације, по GMP протоколу у складу са *Medicines and Healthcare products Regulatory Agency* (MHRA).

Индивидуални утицај компоненти медијума (Solu-Cortef[®], Actrapid[®], Liothyronine и Isoprenaline) биће процењиван култивацијом у медијуму са заменом само једног састојка у односу на традиционални епителијални медијум. Из тог разлога, додатно ће бити справљена још 4 комплетна медијума са заменом само једног састојка (Solu-Cortef[®], Actrapid[®], Liothyronine или Isoprenaline) у изолацији у односу на традиционални медијум како би се утврдио утицај појединачних састојка на пролиферацију, дистрибуцију и диференцијацију LSC.

Имајући у виду потребу студије дефинисане се следеће експерименталне групе:

E1: експлантати узгајани у комплетном традиционалном медијуму

E2: експланти узгајани у комплетном медијуму GMP степена квалитета

E3: експланти узгајани у медијуму са додатком Solu-Cortef®-а уместо хидрокотизона

E4: експланти узгајани у медијуму са додатком Actrapid®-а уместо инсулина истраживачког степена квалитета

E5: експланти узгајани у медијуму са додатком Liothyronine-а уместо тријодотиронина истраживачког степена квалитета

E6: експланти узгајани у медијуму са додатком Isoprenaline-а уместо токсина колере.

Култивација LSC вршиће се на два начина:

1. Методом експланата (за евалуацију новоформулисаног медијума и услова транспорта)
2. Методом суспензије (за испитивање површинских маркера).

Култивација LSC методом лимбалних експланата

За култивацију експланата као супстрат биће коришћене хумане амнионске мембране. Култивација ће се обављати по раније утврђеној процедури. Након отапања ХАМ на собној температури у ламинару, мембране се два пута испирају у 1% раствору penicillin/streptomycina у PBS-у а затим још једном у комплетном медијуму. Након прања мембрана се скалпелом скраћује на жељену величину а затим обавија око стерилног покровног стакалца величине 24x24 mm² са епителном страном окренутом навише. Ивице ХАМ се обавијају око стакалца а затим се заједно постављају на друго покровно стакалце исте величине како би се ХАМ фиксирала и онемогућило њено померање. Цела конструкција се затим ставља у одговарајући пластични суд за култивацију. Лимбални експланти ће се припремати од корнеосклералних прстенова чуваних у органској култури.

Вишак ткива прстена се уклања и оставља се појас од отприлике 2mm дебљине периферне рожњаче и 2mm суседне беоњаче који обухвата лимбус. Сваки прстен се затим исеца на сегменте величине 4 mm² и један од сегмената се пажљиво спушта у центар претходно припремљене ХАМ и лагано притиска неколико секунди како би се олакшала адхезија. Медијум за култивацију се додаје кап по кап како би експлант остао фиксиран за ХАМ. Медијум ће се мењати након три дана а затим сваког другог дана надаље. При свакој замени медијума вршиће се мониторинг раста. Лимбални експлантациони ће бити узгајани у GMP квалификованој лабораторији у инкубатору на 37 C° у атмосфери 5% CO₂. Када културе достигну 90% конfluence биће подељене на три зоне зависно од удаљености од експланта: зону А-унутрашњу, зону Б-средишњу и зону Ц-спољашњу зону, након чега ће ћелије бити одвојене од ХАМ трипсином. За сваку зону одређиваће се број и вијабилност ћелија а овако добијене ћелије користиће се за даља испитивања (*colony forming efficiency assay* и имунохистохемију). Исецање култивисаног изданка на зоне вршиће се ради процене дистрибуције LSC обзиром да је раније публикована студија показала опадање броја ћелија са карактеристикама матичних ћелија у изданку са удаљавањем од централног експланта.

Култивација LSC методом ћелијске суспензије

Цео корнеосклерални прстен се исеца на сегменте величине 2 mm² а затим се сегменти инкубирају у раствору диспазе II (2.4 U/ml) у току 1.5h, а након тога у 0.25% trypsin-0.02% EDTA у току 10 минута на 37 C° ради добијања једноћелијске суспензије. Као супстрат за култивацију користе се митотички инактивирани 3Т3 мишији ембрионални фибробласти, а ћелије добијене дисоцијацијом корнеосклералних прстенова се засејавају у густини од 15000 вијабилних ћелија/cm². За култивацију ће се користити традиционални епителни медијум а ћелије ће бити инкубирани на 37 C° у атмосфери 5% CO₂.

Валидација транспорта почетног материјала (биопсија)

Поредиће се краткотрајни транспорт (30 минута) са дуготрајним транспортом (24 сата) као и утицај различитих температура (+4°C и амбијенталне температуре транспорта) на пролиферацију, диференцијацију и дистрибуцију LSC.

Имајући у виду потребу студије дефинисане се следеће експерименталне групе:

E1: биопсије транспортоване у року од 30 минута на амбијенталној температури

E2: биопсије транспортоване у року од 30 минута на +4°C

E3: биопсије транспортоване у року од 24 сата на амбијенталној температури

E4: биопсије транспортоване у року од 24 сата на +4°C.

Биопсије ће бити култивисане на ХАМ и по постизању 90% конфлуенције обрађене на предходно описани начин. При свакој замени медијума вршиће се мониторинг раста. Након дисоцијације од ХАМ, добијене ћелије користиће се за даља испитивања (*colony forming efficiency assay* и имунохистохемију).

Валидација транспорта финалног ћелијског продукта (лимбалних епителијалних мембрана, ЛЕМ)

Експланте добијени од корнеосклералних прстенова биће култивисани на ХАМ на раније описан начин у традиционалном медијуму. Након достизања 90% конфлуенције испитиваће се утицај транспорта и складиштења добијених лимбалних епителијалних мембрана у току 24 сата, 4 дана и 7 дана. За 24 часовни транспорт ЛЕМ користиће се традиционални медијум за култивацију а за пролонгирани транспорт биће коришћен медијум за чување без додатка серума по раније публикованој рецептури Utheim-а и сарадника: Minimum Essential Medium са додатком 25 mM HEPES-а, 0.0071 M натријум бикарбоната и 50 µg/ml гентамицина.

Имајући у виду потребе студије дефинисане се следеће експерименталне групе:

E1: ЛЕМ складиштене 24 сата у традиционалном медијуму за култивацију

E2: ЛЕМ складиштене 4 дана у медијуму без серума по Utheim-у

E3: ЛЕМ складиштене 7 дана у медијуму без серума по Utheim-у

E4: као контролна група биће коришћене ЛЕМ обрађене одмах након достигања 90% конfluенције без складиштења.

Транспорт ће бити симулиран коришћењем шејкера у року од 1 сата након завршетка култивације а пре складиштења.

Биопсије ће бити култивисане на ХАМ и по постизању 90% конfluенције обрађене на предходно описани начин. При свакој замени медијума вршиће се мониторинг раста. Након дисоцијације од ХАМ, добијене ћелије користиће се за даља испитивања (*colony forming efficiency assay* и имунохистохемију).

Процена клоногенe способности култивисаних ћелија

Colony forming efficiency assay (CFE) је метода процене способности лимбалних епителијалних прогенитора да формирају колоније. Митотички инактивисани 3Т3 мишији ембрионални фибробласти у суспензији засејавају се у одговарајуће пластичне судове за култивацију (површине 9.6 cm²), предходно обложене 0.1% раствором желатина, у густини од 2.4 x10⁴ ћелија по cm². Ћелије се инкубирају преко ноћи како би се формирао слој ћелија хранилица. Следећег дана 500 вијабилних ћелија из лимбалне епителијалне културе од интереса засејава се на припремљене *feeder*-е заједно са 2 ml лимбалног епителијалног медијума. CFE се мери 12. дана култивације након фиксирања ћелија 3.7% формалдехидом и бојења 1% раствором Родамина Б. Колоније се броје под дисекционим микроскопом а CFE се израчунава по формули.

Цитоспин и имунохистохемија

Имунохистохемијом утврђиваће се експресија ΔNp63, изоформе p63, најчешће коришћеног маркера за идентификацију LSC као и експресија конексина 43 и цитокератина 3, маркера корнеалне диференцијације. Ћелије у суспензији лепе се на предметна стакла уз помоћ цитоспин центрифуге (Shandon Southern Instruments, Sewickley, PA, USA) ради постизања боље дистрибуције а затим фиксирају, пермеабилују и инкубирају са одговарајућим примарним антителима ΔNp63 (NBP2-29467, Novus, USA), CK3 (08691431, MP Biomedicals, USA) and Connexin 43 (C6219, Sigma-Aldrich, UK) преко ноћи на +4°C. Сутрадан, након испирања, ћелије се инкубирају са одговарајућим

секундарним антителима обележеним флуорохромом на собној температури у мраку у току 1 сата. Након испирања секундарног антитела на ћелије се ставља кап *Vectashield* медијума који садржи Hoechst у односу 1:1000 (Vector Laboratories, UK) а затим се покривају покровним стакалцем. Тако припремљени препарати биће фотографисани помоћу Zeiss Axio Imager флуоресцентног микроскопа (Carl Zeiss Microscopy, Germany).

Испитивање површинских маркера LSC

За испитивање површинских маркера користиће се ћелије култивисане методом суспензије. За почетну селекцију биће коришћен *LEGENDScreen™ Human Cell Screening (PE) Kit* који садржи 332 PE-конјугована моноклонална антитела на хумане површинске маркере. Антитела са експресијом већом од 20% биће узета у даље разматрање. Од њих ће надаље, уз помоћ литературе, бити одабрано 10 маркера чија ће се експресија пратити током различитих пасажа уз помоћ проточне цитометрије. Селекцијом уз помоћ проточне цитометрије одредиће се маркери кандидати чија ће експресија у ћелијама лимбуса затим бити потврђена имунофлуоресцентним бојењем криоисечака рожњаче. Након доказане експресије маркера у LSC, ћелије култивисане у суспензији биће сортиране на позитивну и негативну популацију, а сортиране ћелије биће коришћене за CFE есеј и qPCR.

За проточну цитометрију ћелије ће бити фиксирани 4% параформалдехидом и пермеабелизоване метанолом, након чега ће се обележавати анти-хуманим флуорохром-коњугованим антителима на ΔNp63 и потенцијалне површинске маркере. Анализа ће се вршити коришћењем BD FACSCanto™ II проточног цитометра. Површински маркери чија експресија опада током пасажа и евентуално нестаје биће узети у даље разматрање. Присуство проточном цитометријом селектованих маркера потврдићемо имунофлуоресцентним бојењем криоисечака рожњаче а затим ће се за потврђени маркер/маркере вршити сортирање ћелија на позитивну и негативну популацију. Сортирање ћелија обележених површинским маркером од интереса вршиће се помоћу BD FACSAria II сортера. Real-Time RT-PCR техником ће се испитати да ли постоји разлика између сортираних популација у експресији ΔNp63 и C/EBPδ, карактеристичних за матичне ћелије, као и цитокератина 12, карактеристичног за корнеалну диференцијацију, коришћењем LightCycler™ PCR машине (Roche, Switzerland). Осим тога упоређиваће се и клонотипна способност сортираних популација на раније описан начин.

Снага студије и величина узорка

Студијски узорак је израчунат узимајући алфа као 0.05 и снагу студије од 0.8 за One-way ANOVA тест, према статистичком програму *Minitab version 16*. На основу очекиване највеће разлике у испитиваним параметрима између експерименталних и контролних група (за површину кутивисаних изданака 13. дана култивације, SD=78.65), утврђен је број неопходних узорака и он износи 3 за сваку од група.

Врста студије

Експериментална студија на материјалу хуманог порекла *in vitro*.

Статистичка обрада података

Подаци ће бити приказани као Mean \pm SE. За анализу података користиће се параметријски или непараметријски тестови у односу на нормалност расподеле, која ће бити одређена *Kolmogorov-Smirnov* тестом. Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износиће $p < 0.05$, док ће статистички веома значајна разлика бити $p < 0.01$. За статистичку обраду свих података користиће се *Prism 6* пакет. *Microsoft Excel* ће се користити за креирање графикона и табела.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да ће култивација експланата у новоформулисани медијуму GMP ранга бити успешна и да неће бити разлике у пролиферацији, диференцијацији и дистрибуцији LSC у односу на експланте кутивисане у традиционалном медијуму. Коришћење медијума GMP ранга омогућило би продукцију LSC GMP степена квалитета, безбедних за хуману трансплантацију. Такође, биће утврђени најповољнији услови за транспорт биопсија и финалног ћелијског продукта. Осим тога, очекује се идентификација потенцијалног површинског маркера карактеристичног за LSC који би олакшао идентификацију и изолацију LSC и омогућио брзо утврђивање процента LSC у лимбалним епителијалним мембранама пре трансплантације.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Култивацијом LSC у новоформулисаном медијуму GMP ранга утврђиваће се његова ефикасност и евентуална разлика у пролиферацији, диференцијацији и дистрибуцији LSC у односу на традиционални медијум за култивацију. Поређењем различитих услова транспорта почетног материјала (биопсија) и финалног ћелијског продукта (лимбалних епителијалних мембрана) биће дефинисани најповољнији услови за њихов транспорт. Скринингом површинских маркера проточном цитометријом, имунофлуоресцентним бојењем и PCR-ом потенцијално ће се утврдити маркер специфичан за LSC.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације Комисија предлаже проф. др Мајлинду Лако, која је редовни професор Универзитета у Њукаслу за ужу научну област Матичне ћелије као и визитинг професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Проф. др Мајлинда Лако поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и испуњава услове за ментора докторских дисертација у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1 Компетентност ментора

Радови предложеног ментора који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Kolli S, Ahmad S, Meeny A, Mudhar H, **Lako M** and Figueiredo FC. Successful application of ex vivo expanded human autologous oral mucosal epithelium for the treatment of total bilateral limbal stem cell deficiency. *Stem Cells* 2014; 32:2135-46.

2. Osei-Bempong C, Figueiredo FC, **Lako M**. The limbal epithelium of the eye--a review of limbal stem cell biology, disease and treatment. *Bioessays* 2013; 35(3):211-9.
3. Baylis O, Figueiredo F, Henein C, **Lako M**, Ahmad S. 13 years of cultured limbal epithelial cell therapy: a review of the outcomes. *J Cell Biochem* 2011; 112(4):993-1002.
4. Kolli S, **Lako M**, Figueiredo F, Mudhar H, Ahmad S. Loss of corneal epithelial stem cell properties in outgrowths from human limbalexplants cultured on intact amniotic membrane. *Regen Med* 2008; 3(3):329-42.
5. Ahmad S, Figueiredo F, **Lako M**. Corneal epithelial stem cells: characterization, culture and transplantation. *Regen Med* 2006; 1(1):29-44.
6. Baylis O, Rooney P, Figueiredo FC, **Lako M** and Ahmad S. An investigation of donor and culture parameters which influence epithelial outgrowths from cultured human cadaveric limbal explants. *J Cell Physiol* 2013; 228:1025-30.
7. Kolli S, Ahmad S, **Lako M** and Figueiredo FC. Successful clinical implementation of corneal epithelial stem cell therapy for treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *Stem Cells* 2010; 28:597-610.
8. Ahmad S, Kolli S, Li DQ, de Paiva CS, Pryzborski S, Dimmick I, Armstrong L, Figueiredo FC and **Lako M**. A putative role for RHAMM/HMMR as a negative marker of stem cell containing population of human limbal epithelial cells. *Stem Cells* 2008; 26:1609-19.
9. Ahmad S, Stewart R, Yung S, Kolli S, Armstrong L, Stojkovic M, Figueiredo F, **Lako M**. Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial like cells by in vitro replication of the corneal epithelial stem cell niche. *Stem Cells* 2007; 25:1145-1154

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Хумана репродукција и развој; матичне ћелије.

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Миодраг Стојковић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, председник;
2. **Доц. др Дарко Боснаковски**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета „Гоце Делчев“ у Штипу, БЈР Македонија за ужу научну област Фармакогенетика и биотехнологија, члан;
3. **Доц. др Марија Миловановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.

Закључак и предлог комисије

На основу досадашњег научно-истраживачког рада и публикованих радова, др мед. Сања Бојић, испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.

Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.

Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др мед. Сање Бојић, под називом “**Испитивање површинских маркера и оптимизација протокола за *ex vivo* експанзију лимбаних матичних ћелија ”GMP” степена квалитета**“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. **Проф. др Миодраг Стојковић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, председник

4. **Доц. др Дарко Боснаковски**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета „Гоце Делчев“ у Штипу, БЈР Македонија за ужу научну област Фармакогенетика и биотехнологија, члан

5. **Доц. др Марија Миловановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.

У Крагујевцу, 24.08.2016. године