

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 13.05.2022. године, прихваћен је извештај ментора др Александре Јауковић, научног саветника, Института за медицинска истраживања-Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду, о урађеној докторској дисертацији **Ане М. Боројевић (рођено Стојановић)**, која је запослена као молекуларни биолог на Одељењу за трансплантацију костне сржи са лабораторијом за криобиологију“ Института за здравствену заштиту мајке и детета Србије „Др Вукан Чупић“, под насловом **„Карактеризација хуманих мезенхимских матичних ћелија пореклом из косне сржи и утицај витамина D3 на њихова функцијска својства“**, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Драгана Вујић, редовни професор, Универзитет у Београду-Медицински факултет, др Александра Кораћ, редовни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет и др Диана Бугарски, научни саветник, Универзитет у Београду-Институт за медицинска истраживања-Институт од националног значаја за Републику Србију. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију и Већу подноси следећи

### ИЗВЕШТАЈ

#### Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Ане М. Боројевић (рођено Стојановић)**, под насловом **„Карактеризација хуманих мезенхимских матичних ћелија пореклом из косне сржи и утицај витамина D3 на њихова функцијска својства“**, урађена је у сарадњи Института за здравствену заштиту мајке и детета Србије „Др Вукан Чупић“, Биолошког факултета Универзитета у Београду и Института за медицинска истраживања-Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду у оквиру пројекта под бројем 175062 Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије: „Регулаторни и модулаторни потенцијал адултних матичних ћелија“.

Докторска дисертација има 121 страну и подељена је у седам поглавља: Увод (31 страна), Циљеви рада (2 стране), Материјал и методи (19 страна), Резултати (27 страна), Дискусија (13 страна), Закључци (2 стране) и Литература (27 страна). Дисертација садржи 6 табела и 44 слике.

У дисертацији су цитиране 352 библиографске јединице и 10 интернет страница. Докторска дисертација садржи и 14 уводних страна и то: насловну страну на српском и енглеском језику, податке о ментору и члановима комисије, захвалницу, сажетак на српском и енглеском језику и садржај. На крају дисертације приложена су следећа документа: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу (4 стране).

#### Анализа докторске дисертације:

У овој докторској дисертацији испитиване су потенцијалне разлике у особинама и функцијама мезенхимских матичних ћелија изолованих из косне сржи (КС-ММТ) здравих давалаца, као и утицај витамина D3 у форми холекалциферола на функцијска својства КС-ММТ повезна са њиховим регенеративним потенцијалом. С обзиром да за стандардизацију процедура потенцијалне терапијске

примене КС-ММЋ главну препреку представља хетерогеност биолошких својстава ових ћелија која отежава прецизну процену њиховог регенеративног потенцијала, истраживања дисертације су обухватила ову проблематику. У дисертацији је такође испитиван капацитет витамина D3 да побољша регенеративни потенцијал КС-ММЋ, као и молекулски механизми који се налазе у основи његовог дејства, што може бити од великог значаја за дефинисање нових модалитета потенцијалне терапијске примене овог витамина за прекондиционирање КС-ММЋ у ћелијској терапији.

У поглављу **УВОД**, кандидаткиња је у оквиру седам целина дала детаљан приказ података из литературе који се односе на проблематику докторске дисертације, у складу са циљем и постављеним задацима. На почетку овог поглавља, кандидаткиња је изнела детаљан преглед најважнијих историјских података о открићу матичних ћелија и развоју истраживања у овој области. Описана је подела матичних ћелија на различите типове зависно од потенцијала диференцијације, а у наставку је дат приказ досадашњих сазнања о адултним (соматским) матичним ћелијама са посебним освртом на матичне ћелије хематопоезе и мезенхимске матичне ћелије (ММЋ). С обзиром на тему истраживања дисертације, кандидаткиња је детаљно описала проблематику карактеризације и дефинисања својстава ММЋ и посебно појаснила карактеристике ММЋ повезане са њиховим регенеративним потенцијалом. Детаљно је описана проблематика хетерогености својстава ММЋ и дат преглед литературних података о утицају нише косне сржи, узраста донора и дуготрајне култивације на хетерогеност ових ћелија. Посебно је дат преглед досадашњих испитивања КС-ММЋ у преклиничким и клиничким студијама, док је у наредном поглављу описан метаболизам витамина D3 и истакнуте функције овог витамина у контексту регулације функција ММЋ. У последњој целини описана је улога Sirtuin 1 (SIRT1) сигналног пута у регулацији регенеративног потенцијала ММЋ.

У поглављу **ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА** кандидаткиња је јасно дефинисала основне циљеве истраживања који укључују: прецизну упоредну карактеризацију ММЋ изолованих из косне сржи здравих давалаца; анализу утицаја витамина D3 у форми холекалциферола на регенеративни потенцијал КС-ММЋ; анализу сигналних путева укључених у модулацију својстава и функција КС-ММЋ под утицајем витамина D3. При томе, кандидаткиња за сваки од задатих циљева поставља специфичне задатке по фазама истраживања.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ** дати су подаци о коришћеном биолошком материјалу и реагенсима. Представљен је експериментални дизајн како би се боље објаснила поставка експерименталних задатака. Описани су методи изолације и култивације КС-ММЋ, као и примењени методи за имунофенотипизацију и испитивање функцијских својстава ћелија укључујући пролиферацију, метаболичку активност, ћелијски циклус, клоногени капацитет, ћелијско старење и диференцијацију. Поред тога, детаљно су описани методи детекције експресије протеина (проточном цитометријом и имуноцитохемијским обележавањем) и гена (RT-PCR, енг. real time-polymerase chain reaction). На крају, кандидаткиња представља и статистичке методе (*Student*-ов t-тест; GraphPad Prism програм) коришћене при обради добијених резултата.

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** организовано је у 4 целине, а у складу са постављеним циљевима. Кандидаткиња добијене експерименталне податке приказује јасно графички и илустративно, уз примену одговарајуће статистичке обраде.

У првом поглављу су представљени резултати који се односе на изоловање и култивацију КС-ММЋ, а који показују да су ћелије успешно изоловане из косне сржи свих давалаца. У наставку су представљени резултати који се односе на карактеризацију и упоредну анализу КС-ММЋ различитих давалаца. Добијени резултати показују да КС-ММЋ различитих давалаца испуњавају минималне критеријуме за дефинисање

ММЋ према Комитету за мезенхимске и ткивне матичне ћелије Међународног друштва за ћелијску терапију. Испитујући својства и функције КС-ММЋ различитих давалаца кандидаткиња не налази значајне разлике на нивоу морфологије, имунофенотипа, способности за диференцијацију у три ћелијске лозе (остеогену, адипогену и хондрогену), као ни у експресији и локализацији F-актина. Такође, резултати показују да КС-ММЋ различитих давалаца имају сличан степен вијабилности/метаболичке активности, пролиферативног капацитета, клоногеног потенцијала и ћелијског старења. Са друге стране, добијени резултати показују да у протеинској експресији маркера пролиферације Ki67 и регулатора ћелијског старења p53, као и испитиваних маркера плурипотентности (NANOG, SOX2 и OCT-4), постоје благе разлике код различитих давалаца, како у погледу интензитета експресије тако и у субћелијској локализацији испитивних протеина.

У наставку су представљени резултати анализа утицаја витамина D3 на функције и сигнализацију КС-ММЋ повезану са регенеративним потенцијалом. Добијени резултати су показали да витамин D3 делује стимулаторно на вијабилност и пролиферативни капацитет КС-ММЋ здравих давалаца, утичући на метаболичку активност ових ћелија, док утицај витамина D3 на клоногени капацитет КС-ММЋ није примећен. Такође, резултати су показали да третман витамином D3 током индукције диференцијације испољава стимулаторни ефекат на рану и касну остеогенезу КС-ММЋ, док са друге стране остварује инхибиторни ефекат на адипогенезу КС-ММЋ. Такође је утврђено да витамин D3 активира SIRT1 и FoxO3 сигналне молекуле у КС-ММЋ.

У последњој целини приказани су резултати анализа улоге SIRT1 сигнализације у деловању витамина D3 на функције КС-ММЋ повезане са регенеративним потенцијалом. Добијени резултати показују да је стимулаторни ефекат витамина D3 на пролиферативни капацитет КС-ММЋ анализиран праћењем метаболичке активности, експресије маркера пролиферације Ki67 и ћелијског циклуса, независан од SIRT1 сигнализације. Поред тога, показано је да витамин D3 стимулише конститутивну експресију сва три испитивана маркера плурипотентности (NANOG, SOX2 и OCT-4) у КС-ММЋ на протеинском и генском нивоу. При томе је установљено да витамин D3 стимулише експресију OCT-4 транскрипционог фактора независно од SIRT1 сигнализације, док се његов утицај на експресију NANOG и SOX2 остварује посредством активације овог сигналног пута. Такође је утврђено да третман витамином D3 редукује процес ћелијског старења КС-ММЋ смањујући број  $\beta$ -галактозидаза позитивних ћелија независно од SIRT1 сигнализације, иако није примећен значајан утицај на експресију регулатора ћелијског старења, протеина p53. Поред тога, резултати су показали да третман витамином D3 стимулише остеогену диференцијацију КС-ММЋ, као и експресију гена за остеогене маркере (*ALP*, *RUNX2*, *OCN*) путем активације SIRT1 сигналног пута, док инхибира адипогену диференцијацију КС-ММЋ независно од SIRT1 сигнализације. При томе, промене у генској експресији адипогених маркера (*Adiponektin*, *PPAR $\gamma$* ) нису уочене под испитиваним експерименталним условима.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** кандидаткиња критички разматра приказане резултате поредећи их са подацима других аутора. Дискусија је организована у складу са представљеним резултатима и даје одговоре на задатке постављене у циљевима. У првом делу су дискутовани резултати упоредне карактеризације ММЋ изолованих из косне сржи здравих давалаца који, у складу са литературним подацима других аутора, нису показали значајне разлике у погледу имунофенотипа, пролиферације, клоногеног капацитета и диференцијационог потенцијала КС-ММЋ давалаца различитог узраста. Поред тога, кандидаткиња дискутује резултате испитивања експресије маркера плурипотентности у КС-ММЋ различитих давалаца у светлу варијабилних резултата различитих истраживача истичући први пут показану конститутивну експресију сва три анализираних фактора плурипотентности (NANOG, SOX2 и OCT-4) у овој дисертацији, уз разлике у субћелијској локализацији ових молекула. У светлу показатеља финих разлика између КС-

ММЋ различитих давалаца, кандидаткиња такође дискутује показане варијације у субћелијској локализацији маркера пролиферације Ki67 доводећи их у везу са подацима из литературе о транслокацији овог протеина током различитих фаза ћелијског циклуса и регулацијом деградације изван једра. Такође су у том контексту детаљно дискутоване показане разлике у субћелијској локализацији p53 као регулатора ћелијског старења у КС-ММЋ различитих давалаца. На крају овог дела кандидаткиња дискутује значај процене варијабилности својства и функција КС-ММЋ за развој ћелијске терапије.

У наставку, кандидаткиња прелази на дискутовање показаног утицаја витамина D3 у форми холекалциферола на регенеративни потенцијал КС-ММЋ. У светлу варијабилних података из научне литературе о утицају витамина D3 на пролиферацију ММЋ, кандидаткиња дискутује одступања у стимулаторном ефекту холекалциферола на пролиферативни капацитет КС-ММЋ показаном у склопу ове дисертације и објашњава их различитим изворима ткива из којих су ММЋ изоловане, узрастом даваоца, као и различитим концентрацијама и/или формама витамина D3 које су коришћене у експериментима. Кандидаткиња даље дискутује по први пут показане резултате о стимулаторном деловању овог витамина у форми холекалциферола на остеогену диференцијацију КС-ММЋ поредећи их са истраживањима других аутора који су сличан ефекат показали за активне метаболите витамина D3 или холекалциферол интегрисан у склопу различитих форми бионосача. Такође се утврђен инхибиторни ефекат витамина D3 на адипогени потенцијал КС-ММЋ доводи у везу са показаном стимулацијом остеогенезе у контексту одржавања равнотеже између ова два правца диференцијације. Ана Боројевић даље дискутује показан инхибиторни ефекат овог витамина на ћелијско старење КС-ММЋ сличан резултатима других студија. Посебно детаљно је дискутован стимулаторни ефекат витамина D3 на експресију маркера плурипотентности (NANOG, SOX2 и OCT-4) у КС-ММЋ који је у склопу дисертације по први пут показан за ову форму витамина и разматран у контексту стимулаторног дејства овог витамина на пролиферацију КС-ММЋ.

С обзиром на показани утицај витамина D3 на функцијске карактеристике КС-ММЋ, дискутовани су и резултати које се односе на улогу SIRT1 сигнализације у модулацији својстава и функција КС-ММЋ повезаних са регенеративним потенцијалом под утицајем витамина D3. Кандидаткиња дискутује сагласност показаног стимулаторног дејства витамина D3 на експресију SIRT1 сигналног молекула у КС-ММЋ са сличним подацима из научне литературе, а посебно са оним који доводе у везу SIRT1 сигнализацију са ефектима метаболита витамина D3 на остеогену диференцијацију ових ћелија. Такође је детаљно дискутована први пут показана укљученост SIRT1 сигнализације у регулацију експресије маркера плурипотентности у КС-ММЋ под дејством витамина D3 у форми калциферола.

Наведене важне резултате о позитивном утицају витамина D3 у форми калциферола на регенеративни потенцијал КС-ММЋ, кандидаткиња дискутује у светлу досадашњих података који говоре у прилог експресији свих ензимских компоненти неопходних за метаболизам витамина D3 у ММЋ, што индиректно потврђују и резултати ове студије.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** кандидаткиња на јасан начин изводи закључке који у потпуности произлазе из добијених резултата и који дају одговоре на постављене циљеве ове докторске дисертације. Комисија их овде износи у уопштенијем облику. На почетку су изведени закључци упоредне карактеризације ММЋ изолованих из косне сржи здравих давалаца који говоре да КС-ММЋ различитих давалаца испољавају сличну морфологију, имунофенотип, клоногени капацитет, као и пролиферативни и диференцијациони потенцијал, док постоје разлике по питању интензитета и субћелијске локализације конститутивно експримираних маркера пролиферације, плурипотентности и регулатора ћелијског старења.

Закључци о показаном утицају витамина D3 у форми холекалциферола на регенеративни потенцијал КС-ММЋ наводе да витамин D3 подстиче пролиферацију, експресију маркера плурипотентности и остеогену диференцијацију ових ћелија, док редукује процес ћелијског старења и адипогенезу КС-ММЋ. У последњем сегменту представљени су закључци који се односе на укљученост SIRT1 сигнализације у модулатији својстава и функција КС-ММЋ под утицајем витамина D3 који истичу учешће овог сигналног пута у стимулаторном деловању витамина D3 на експресију маркера плурипотентности NANOG i SOX2, као и остеогену диференцијацију КС-ММЋ. Кандидаткиња поставља као главне закључке важност процене потенцијалних разлика регенеративног потенцијала КС-ММЋ за развој персонализоване медицине и дефинисање адекватног узорка за потенцијалну примену у ћелијској терапији. Поред тога, истиче се значај разумевања утицаја витамина D3 на функцијска својства КС-ММЋ у светлу дефинисања нових модалитета потенцијалне терапијске примене овог витамина као претретмана у протоколима трансплантације КС-ММЋ.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи списак 352 библиографске јединице и 10 интернет страница. Литературни извори су адекватно и на одговарајућим местима цитирани у тексту докторске дисертације.

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

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

1. **Borojević, A.**, Jauković, A., Kukulj, T., Mojsilović, S., Obradović, H., Trivanović, D., Živanović, M., Zečević, Ž., Simić, M., Gobeljić, B., Vujić, D., & Bugarski, D. (2022). Vitamin D3 Stimulates Proliferation Capacity, Expression of Pluripotency Markers, and Osteogenesis of Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal/Stem Cells, Partly Through SIRT1 Signaling. *Biomolecules*, 12(2), 323. <https://doi.org/10.3390/biom12020323> (M21)  
<https://www.mdpi.com/2218-273X/12/2/323/htm>
2. Kukulj, T., Lazarević, J., **Borojević, A.**, Ralević, U., Vujić, D., Jauković, A., Lazarević, N., & Bugarski, D. (2022). A Single-Sell Raman Spectroscopy Analysis of Bone Marrow Mesenchymal Stem/Stromal Cells to Identify Inter-Individual Diversity. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4915. (M21)  
<https://www.mdpi.com/1422-0067/23/9/4915/htm>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја:

1. T. Kukulj, J.J. Lazarević, **A. Borojević**, U. Ralević, S. Mojsilović, D. Vujić, A. Jauković, D. Bugarski. Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells from Five Donors Perceived by Raman Spectroscopy at a Single Cell Level. International Bioscience Conference IBSC 2021, Novi Sad, Serbia, Poster presentation.  
<https://ibsc2021.pmf.uns.ac.rs/wp-content/uploads/2021/11/Kukulj.pdf>

#### **Провера оригиналности докторске дисертације**

Докторска дисертација кандидаткиње **Ане М. Боројевић (рођено Стојановић)** послата је дана **06.05.2022.** на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана **06.05.2022.** Резултати електронске провере докторске дисертације показују да индекс

подударности износи 13%. Детаљним увидом у Извештај утврђено је да су појединачна подударња са једним извором у опсегу од 4%, једним извором од 3%, три извора у опсегу од 1%, док су остала подударња мања од 1%. Уочене подударности текста се односе на: поједине речи из описа метода, стандардне скраћенице и енглеске називе, библиографске податке о коришћеној литератури и њихово навођење у тексту, на афилијацију и звања чланова комисије, биографију кандидата, изјаву о ауторству, изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада, изјаву о коришћењу, као и коришћење кратких фраза уобичајених у српском језику, што све припада групи нужног подударња и у складу је са чланом 9. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду („Гласник Универзитета у Београду“ број 201/18).

Када се све изнето узме у обзир, Извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата **Ане М. Боројевић (рођено Стојановић)**, под насловом „**Карактеризација хуманих мезенхимских матичних ћелија пореклом из косне сржи и утицај витамина D3 на њихова функцијска својства**“, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

## Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација **Ане М. Боројевић (рођено Стојановић)**, под насловом „**Карактеризација хуманих мезенхимских матичних ћелија пореклом из косне сржи и утицај витамина D3 на њихова функцијска својства**“, представља студију из области изучавања матичних ћелија која је једна од најсавременијих и најинтригантнијих области ћелијске биологије. С обзиром на актуелно поље истраживања, ова дисертација на концизан и јасан начин пружа увид у најновија сазнања из области, а резултатима и произашлим закључцима отвара питања од значаја за потенцијалну клиничку примену КС-ММЋ, као и потенцијалну примену витамина D3 као фактора преко кондиционирања/претретмана у протоколима трансплантације КС-ММЋ.

Комисија је мишљења да докторска дисертација **Ане М. Боројевић (рођено Стојановић)** својом темом, постављеним циљевима, методолошким приступом, добијеним резултатима и њиховим тумачењем представља оригинални истраживачки допринос разумевању карактеризације КС-ММЋ здравих давалаца и утицаја витамина D3 на њихова функцијска својства. Ови резултати несумњиво пружају основу за даља истраживања ових ћелија, при чему кандидат критички истиче проблематику потенцијалне примене КС-ММЋ као главног циља изучавања матичних ћелија.

Познајући Ану Боројевић од почетка њене научне каријере, Комисија жели да истакне посвећеност и напредак кандидаткиње на свим аспектима научног рада, како на пољу експерименталних истраживања, тако и обраде и тумачења добијених резултата. Објављени научни радови из докторске дисертације и отворени нови истраживачки путеви потврђују квалитет и научни допринос постигнутих резултата кандидаткиње.

Имајући у виду све напред наведено, као и да су резултати истраживања у оквиру ове докторске дисертације објављени у врхунским међународним часописима M21 категорије, Комисија са посебним задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри **Ани М. Боројевић (рођено Стојановић)** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „**Карактеризација хуманих мезенхимских матичних ћелија пореклом из косне сржи и утицај витамина D3 на њихова функцијска својства**“.

## КОМИСИЈА:

---

др Драгана Вујић, редовни професор  
Универзитет у Београду-Медицински факултет

---

др Александра Кораћ, редовни професор  
Универзитет у Београду-Биолошки факултет,

---

др Диана Бугарски, научни саветник  
Универзитет у Београду-Институт за медицинска истраживања  
-Институт од националног значаја за Републику Србију

У Београду, 13.05.2022. године.