



ИЧСАИЦУЈЕ САГЛАДИЛ  
ДУ СВОЈСТВОВАНИ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ  
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ВЕЋУ ЗА ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКЕ НАУКЕ  
УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ

На седници Наставно-научног већа Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу одржаној 23.12.2020. године (број одлуке 620/XI-2) и на седници Већа за природно-математичке науке Универзитета у Крагујевцу одржаној 20.01.2021. године (број одлуке IV-01-18/7), формирана је Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата Стефана З. Благојевића и предложеног ментора за израду докторске дисертације под називом „Молекуларни механизми метастазе, експресија и биоинформатичка анализа микро РНК у бенигним и малигним туморима хуманих јајника“, у следећем саставу:

- 1) Др Наташа З. Ђорђевић, ванредни професор; **председник Комисије**  
Департман за биомедицинске науке, Државни универзитет у Новом Пазару  
Ужа научна област: Биологија;
- 2) Др Снежана Д. Марковић, доцент; **предложени ментор**  
Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу  
Ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија;
- 3) Др Марко Н. Живановић, научни сарадник; **члан Комисије**  
Институт за информационе технологије, Универзитет у Крагујевцу  
Научна област: Биологија; ужа научна област: Ћелијска и молекуларна биологија.

На основу података којима располажемо достављамо следећи

ИЗВЕШТАЈ

**1. Научни приступ проблему предложеног нацрта докторске дисертације и процена научног доприноса крајњег исхода рада.**

Према статистици за 2020. годину, објављеној од стране „World Health Organization, International Agency for Research on Cancer“ малигни тумор јајника је осми по учесталости код жена у свету са 313.959 пријављених случајева, док се у Србији налази на шестом месту са 967 пријављених случајева. Ризик за настанак малигног тумора јајника током 2020. године износио је 6,6 на 100.000 у свету док је у Србији 12,7 на 100.000, што га сврстава на пето место међу земљама света. Стопа смртности ове болести током 2020. године износила је 4,2 на 100.000 у свету и 6,8 на 100.000 жена у Србији. Малигни тумор јајника је један од најчешћих гинеколошких карцинома у свету, има највећу стопу смртности, а највећи ризик за настанак је присутан у источној и централној Европи. Према пореклу, тумори јајника се могу поделити на три главне



подгрупе: тумори јајника површинског епитела, тумори строме јајника, као и тумори јајника герминативних ћелија. Са аспекта инциденце и броја хистолошких типова које обухвата, најобимнија и најзначајнија је група епителних тумора јајника (карциноми јајника). На основу изнетих података, молекуларна биологија тумора јајника представља актуелно поље истраживања, при чему су развој ефикасних метода за рану детекцију, молекуларни механизми настанка, развоја и метастазе тумора јајника предмет интензивних истраживања од кључног значаја.

Формирање биобанки ткива бенигних и малигних тумора хуманих јајника омогућава трајно похрњивање и доступност материјала за истраживања, доступност података о свим испитивањима и резултатима уз очување поверљивости података пацијената. Изолацијом геномске ДНК и укупне РНК из узорака биобанке ткива тумора јајника, могуће је формирати биобанке генома, транскриптома и комплементарних ДНК јајника. Овакав приступ омогућава дугорочну доступност материјала за анализе и истраживања тумора јајника у циљу дефинисања тумор маркера, дијагностике и ефекта терапије.

Микро РНК (миРНК) су мали некодирајући РНК молекули, који функционишу као молекули водичи током утишавања информационих РНК (иРНК) молекула. Микро РНК су просечне дужине око 22 нуклеотида. Већина се преписује са генских секвенци ДНК у примарну миРНК (при-миРНК), након чега се обрађује у прекурсор миРНК (пре-миРНК) и на крају у зрелу миРНК. У већини случајева, миРНК се везује за 3' UTR (енгл. 3'-Untranslated Region) циљаних иРНК и утишавају њихову експресију, односно процес транслације (синтеза протеина). Примарне миРНК се преписују из својих гена, а затим обрађују у пре-миРНК (енгл. Syndrome Critical Region 8) и Drosha ензима који припада суперфамилији рибонуклеазе III. Drosha раздваја дуплекс при-миРНК која је у основи карактеристичне структуре укоснице. Једном када се генеришу пре-миРНК, оне се транспортују у цитоплазму комплексом експортин 5 (енгл. Exportin 5, XPO5) и RanGTP (енгл. GTP-binding nuclear protein Ran), а затим обрађују помоћу дајсер ендонуклеазе (енгл. Dicer RNase III endonuclease). Ова обрада укључује уклањање терминалне петље, након чега се ствара зрели миРНК дуплекс. Микро РНК су укључене у регулацију многих молекуларних процеса у ћелији, као што су развиће, деоба и диференцијација, апоптоза и одговор на стрес, док са друге стране, миРНК могу бити део етиологије и развоја многих болести, укључујући и малигне.

Микро РНК имају различите улоге у канцерогенези ћелија јајника. Велики број студија на хуманим карциномима сугерише да миРНК из miR-200 фамилије одржавају интегритет епителијалних ћелија супримирањем епително-мезенхимске транзиције инхибицијом мезенхимских транскрипционих фактора (енгл. ZEB1/ZEB2 (енгл. Zinc finger E-box-Binding homeobox), TGF-β (енгл. Transforming Growth Factor beta)). Висока експресија miR-210 индукована хипоксијом је константна, како у нормалним тако и у малигно трансформисаним ћелијама, што указује на кључну улогу miR-210 у ћелијској адаптацији на хипоксију. miR-126 је тумор супресор који смањује инвазију карцинома јајника, циљајући VEGF (енгл. Vascular Endothelial Growth Factor) и мењајући његову експресију. Због ових особина, miR-126 представља потенцијални биомаркер за клиничку прогнозу карцинома јајника, као и за његово лечење. miR-21 има улогу у канцерогенези, отпорности на лекове и у прогнози развоја тумора дојке и јајника. Дисрегулација miR-21 је повезана са пролиферацијом и миграцијом ћелија путем PTEN-а (енгл. Phosphatase and Tensin Homolog) који регулише унутарћелијски ниво PIP3 (енгл. phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate) и функционише као тумор супресор тако што негативно регулише PI3K-Akt (енгл. Phosphatidylinositol 3-Kinase; Protein Kinase B) сигнални пут.

Велики број истраживања се спроводи са циљем побољшања ефеката стандардних и развоја нових терапија малигних тумора јајника. Једна од стратегија развоја нових видова антитуморске терапије је испитивање и коришћење третмана билој порекла и хемијски синтетисаних комплекса са различитим механизмом деловања. *In vitro* тестирање антитуморског деловања биоактивних супстанци (стандардни и нови хемио- и фито-терапеутици) на имортализованим ћелијским линијама канцера, предуслов је у развоју, испитивању и дефинисању цитотоксичних и антиметастатских третмана који се потенцијално могу користити у терапији. Такође, овај ниво испитивања пружа додатне могућности за проучавање кључних молекуларних механизама који су укључени у процесе развоја и метастазе тумора јајника. Хемијски комплекси на бази



рутенијума су се показали као перспективни антитуморски и антиметастатски агенци са потенцијалном употребом на различитим туморима. Биоактивне супстанце изоловане из природних извора, попут биљака, садрже огроман потенцијал за добијање нових антитуморских лекова. Одређене миРНК имају тумор супресорна својства и експресија ових миРНК у неопластичним ткивима може имати терапеутски потенцијал. Микро РНК молекули, комерцијално доступни, трансфекцијом унутар ћелије могу довести до смањене експресије таргета, тј. иРНК које оне регулишу. Откривање нових миРНК и анализа циљних иРНК (таргета) за интерференцију, могућа је применом биоинформатичких софтвера који одређују потенцијална места везивања миРНК за одређену иРНК коју регулишу. Након овог корака неопходна је експериментална валидација китом за трансфекцију који је базиран на технологији липидних наночестица. Трансфекцијом се уноси синтетска миРНК од интереса, након чега се прате промене у експресији иРНК коју регулише. Овакав приступ има значајан допринос у откривању нових дијагностичких маркера и терапеутика. Истраживања у оквиру предложене докторске дисертације биће реализована кроз три сегмента. У првом делу, истраживања ће бити фокусирана на анализу генске експресије (анти)метастатских миРНК и таргет иРНК на нивоу транскриптома, као и анализу секвенци *MIR200A*, *MIR210*, *MIR126* и *MIR21* гена на нивоу генома изолованих из ткива тумора јајника. Други део дисертације обухвата анализу миРНК експресије (*miR-200a*, *miR-210*, *miR-126* и *miR-21*) изоловане из крви пацијената са дијагностикованим тумором јајника и здравих испитаника у циљу формирања одговарајућих дијагностичких маркера. Трећи сегмент дисертације су *in vitro* испитивања утицаја биоактивних супстанци и миРНК интерференције на имортализованој ћелијској линији карцинома оваријума (OVCAR-3), примена биоинформатичких софтвера за откривање нових миРНК и потенцијално нових таргет иРНК молекула, као и испитивање ефекта интерференције увођењем синтетске миРНК од интереса.

#### Веза са досадашњим истраживањем

Анализа профила експресије миРНК и интерферентних таргета - иРНК, које кодирају метастатске протеине, доприноси разумевању регулаторних механизама метастазе тумора јајника. Досадашња истраживања су показала да полиморфизми у појединачним нуклеотидима (енгл. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) унутар гена за миРНК утичу на генску експресију и способност интерференције, те доприносе индивидуалној предиспозицији за развој болести код људи. Анализа генских секвенци за миРНК, као и корелација експресије миРНК и таргет иРНК молекула, дефинише ове молекуле као добре тумор-маркере стадијума развоја и метастазе тумора јајника, у дијагностици и процени ефеката терапије, а што је већ показано сличним анализама у досадашњим истраживањима. Многобројна *in vitro* истраживања на имортализованим ћелијским линијама дала су доказе о улози миРНК у промовисању резистенције на лекове, као и да могу деловати као тумор супресори или онкогени. Анализа миРНК експресије након деловања одређеног третмана може бити од значаја за проучавање ефекта потенцијалних лекова.

#### 2. Образложение предмета, метода и циља који уверљиво упућују да је предложена тема од значаја за развој науке.

Предмет докторске дисертације је анализа експресије миРНК (*miR-200a*, *miR-210*, *miR-126*, *miR-21*) и иРНК за *E-cadherin*, *Dicer1*, *Ago2*, *ZEB1*, *TGF-β*, *HIF1*, *VEGF* и *PTEN* гене чији протеински продукти учествују у метастази тумора, на нивоу транскриптома, као и анализа генских секвенци *MIR200A*, *MIR210*, *MIR126* и *MIR21* на нивоу геномске ДНК хуманих ткива тумора јајника. Упоредна анализа експресије циркулишућих миРНК молекула у узорцима крви пацијената са дијагностикованим тумором јајника и здравих испитаника. Испитивање утицаја новосинтетисаних комплекса рутенијума и фитотерапеутика на имортализованим ћелијским линијама карцинома јајника и њихов метастатски потенцијал. Биоинформатичка анализа потенцијалних таргета и откривање нових миРНК молекула, као и експериментална валидација трансфекцијом миРНК од интереса.



### Хипотезе докторске дисертације

- Профилисање и анализа експресије миРНК које учествују у процесу малигне трансформације (miR-200a, miR-210, miR-126 и miR-21) се разликује између малигних и бенигних тумора јајника и представља потенцијалан дијагностички маркер.
- Ниво експресије иРНК молекула за *E-cadherin*, *Dicer1*, *Ago2*, *ZEB1*, *TGF-β*, *HIF1*, *VEGF* и *PTEN* гене који су укључени у процес метастазирања се разликује у зависности од типа тумора јајника.
- Експресија миРНК (miR-200a, miR-210, miR-126 и miR-21) и иРНК које оне специфично циљају је у негативној корелацији.
- Специфични полиморфизми у генима за миРНК (*MIR200A*, *MIR210*, *MIR126* и *MIR21*) су повезани са ризиком за развој карцинома јајника и његов инвазивни потенцијал.
- Профил и ниво експресије циркулишућих миРНК молекула варира између узорака крви пацијената са дијагностикованим тумором јајника и здравих испитаника.
- Анализа антитуморског деловања биоактивних супстанци (стандардни и нови хемио- и фитотерапеутици), на имортализованим ћелијским линијама карцинома јајника омогућава додатне могућности за превенцију, дијагнозу и терапију.
- Откривање нових миРНК молекула и анализа потенцијалних таргета иРНК применом биоинформатичких софтвера, њихова експериментална валидација трансфекцијом синтетске миРНК од интереса, има значајан допринос у откривању нових дијагностичких маркера као и њиховог терапеутског потенцијала.

**Циљ докторске дисертације** је испитивање сигналних и молекуларних механизама метастазе и интерференције миРНК у бенигним и малигним туморима хуманих јајника, као и анализа антитуморског деловања биоактивних супстанци на имортализованим ћелијским линијама карцинома јајника. Примена биоинформатичких софтвера у циљу утврђивања нових миРНК молекула и њихових таргета уз експерименталну валидацију трансфекцијом миРНК од интереса.

### Специфични циљеви:

А. Формирати биобанке транскриптома и генома из ткива бенигно и малигно трансформисаних хуманих јајника за анализу иРНК (*E-cadherin*, *Dicer1*, *Ago2*, *ZEB1*, *TGF-β*, *HIF1*, *VEGF* и *PTEN* гени) и миРНК молекула (miR-200a, miR-210, miR-126 и miR-21) са аспекта:

- Испитивање релативне експресије иРНК за *E-cadherin*, *Dicer1*, *Ago2*, *ZEB1*, *TGF-β*, *HIF1*, *VEGF* и *PTEN* гене, као и миРНК молекула (miR-200a, miR-210, miR-126 и miR-21) у изолованом транскрипту бенигних и малигних тумора јајника.
- Статистичка и биоинформатичка анализа корелације између експресије миРНК и таргет иРНК молекула у изолованом транскрипту бенигних и малигних тумора јајника применом биоинформатичких софтвера.
- Анализа секвенци гена за миРНК молекуле (*MIR200A*, *MIR210*, *MIR126* и *MIR21*) методом секвенцирања у изолованој геномској ДНК.

Б. Профилисати и анализирати миРНК експресију у крви пацијената са дијагностикованим тумором јајника и здравих испитаника у циљу формирања одговарајућих дијагностичких маркера.

В. Анализирати антитуморски ефекат деловања биоактивних супстанци и миРНК интерференције на имортализованим ћелијским линијама карцинома јајника са аспекта:

- Преклиничка *in vitro* испитивања молекуларних механизама метастазе и антитуморског ефекта стандардних и нових хемио- и фито-терапеутика.
- Примена биоинформатичких софтвера за откривање нових миРНК и потенцијално нових иРНК молекула за који се оне везују.
- Испитивање ефекта интерференције миРНК увођењем синтетске миРНК од интереса (миРНК мимика или миРНК инхибитора) и праћење експресије иРНК коју она потенцијално регулише.



### Пацијенти и методологија рада

Испитивања на ткиву пацијената са бенигним и малигним туморима јајника жена су део Студије академског карактера под називом „Испитивање молекуларних маркера малигних тумора јајника“, која је одобрена од стране Етичког одбора Клиничког центра у Крагујевцу (бр. 01-14-3042, 14.07.2019. године). Истраживање се обавља по типу контролисане клиничке и експерименталне студије и спроводи на пациенткињама код којих је дијагностикован малигни тумор јајника. Контролну групу чине пациенткиње код којих је урађена хистеректомија због немалигних стања. У току хируршке интервенције, а уз добровољни пристанак пацијената (пацијенти су писмено и усмено информисани о свим детаљима Студије - потписан Информисани пристанак), лечећи гинеколог КЦ Крагујевац узима исечак туморског ткива јајника и асцита (слободна течност). Од пациенткиња које су укључене у студију, крв се узоркује из периферне вене у запремини од 10 ml, према важећим стандардима за изолацију РНК и ДНК (епрувете са антикоагулансима - хепарин, ЕДТА или Na-цитрат). Узорци крви пацијената, као и узорци крви контролне групе се узимају преоперативно на Клиници за гинекологију и акушерство. Након узорковања и обележавања узорака, крв се аликовотира на два дела. Један део крви се центрифугира на 2000-3000 обрт/мин. Издвојени серум и плазма се чувају на -80 °C за анализу експресије миРНК. Други део крви се замрзава на -20 °C за накнадно одређивање додатних студијских параметара (изолација РНК и ДНК). Чување узорака ткива (на температури од -196 °C до извођења анализа) и крви, као и формирање биобанки ткива, генома и транскриптома спроводи се у складу са принципима Европског истраживачког простора (Biobanks for Europe, 2012), а од стране истраживача Лабораторије за ћелијску и молекуларну биологију, Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу. Планирано је извршити истраживања на узорцима ткива тумора јајника узоркованим од 30 пациенткиња.

#### A. Модел систем транскриптом и геном изолован из ткива бенигно и малигно трансформисаних хуманих јајника

Формирање биобанки транскриптома и генома из ткива бенигно и малигно трансформисаних јајника жена се врши: (а) изолацијом укупне РНК тризол методом, (б) изолацијом геномске ДНК комерцијалним китовима за изолацију укупне ДНК из узорака.

Анализе:

- 1) Одређивање експресије иРНК за *E-cadherin*, *Dicer1*, *Ago2*, *ZEB1*, *TGF-β*, *HIF1*, *VEGF* и *PTEN* гене као и миРНК молекула (miR-200a, miR-210, miR-126 и miR-21) у транскрипту из ткива тумора јајника. Метода квантитативног PCR у реалном времену (енгл. *real-time quantitative PCR* - qPCR) користи се за праћење релативне генске експресије.
- 2) Статистичка и биоинформатичка анализа корелације између експресије миРНК и иРНК молекула у изолованом транскрипту бенигних и малигних тумора јајника. Применом бионформатичких софтвера могуће је утврдити ефекат интерференције миРНК молекула на експресију иРНК које специфично регулишу.
- 3) Амплификација и секвенцирање *MIR200A*, *MIR210*, *MIR126* и *MIR21* гена у геномској ДНК из ткива тумора јајника. Multiplex PCR метода се користи за амплификацију циљаних генских секвенци, које се секвенцирају Сангеровом методом у циљу утврђивања SNP-ова и мутација.

#### B. Модел систем крв пацијената са дијагностикованим тумором јајника и здравих испитаника

- 1) Одређивање експресије миРНК (miR-200a, miR-210, miR-126 и miR-21) у транскрипту из крви пацијената са дијагностикованим тумором јајника и здравих испитаника, квантитативном PCR методом у реалном времену.

#### B. Модел систем имортализована ћелијска линија карцинома јајника – OVCAR-3

OVCAR-3 ћелијска линија (*American Type Culture Collection*, ATCC, Manassas, VA, USA) је изолована из малигних асцита пацијента са прогресивним аденокарциномом јајника након комбиноване хемотерапије са циклофосфамидом, адриамицином и цисплатином.



У третману OVCAR-3 ћелијске линије биће коришћени: (а) хемијски комплекси на бази рутенијума; (б) биљни екстракти који су у досадашњим испитивањима Лабораторије за ћелијску и молекуларну биологију показали значајан цитотоксични и антимиграторни ефекат на имортализованим ћелијским линијама канцера.

Анализе:

- 1) Дефинисање антиканцерогеног ефекта испитиваних биоактивних супстанци на имортализованој ћелијској линији карцинома јајника (OVCAR-3). Методе анализе цитотоксичности (MTT тест) и испитивања промена миграторног потенцијала ћелијских линија (Transwell миграторни тест).
- 2) Изолација укупне РНК и утврђивање ефекта третмана на релативну експресију иРНК за *E-cadherin*, *Dicer1*, *Ago2*, *ZEB1*, *TGF-β*, *HIF1*, *VEGF*, *PTEN* гене, као и експресија миРНК (miR-200a, miR-210, miR-126 и miR-21). Квантитативни PCR се користи за праћење релативне генске експресије.
- 3) Испитивање протеинске експресије VEGF и *E-cadherin*, који имају улогу у ангиогенези и међућелијској адхезији, у третману биоактивним супстанцима на ћелијској линији карцинома јајника. Метода за праћење протеинске експресије је имуноцитофлуоресцентна микроскопија која се базира на флуоресцентној детекцији специфичних антитела која се везују за циљани протеин.
- 4) Анализа нових миРНК и нових таргет иРНК молекула применом биоинформатичких софтвера као што су: DIANA (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>), TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), ComiR (<http://www.benoslab.pitt.edu/comir/>), итд.
- 5) Испитивање ефекта интерференције миРНК увођењем синтетске миРНК од интереса (миРНК мимика или миРНК инхибитора) и праћење експресије иРНК коју она потенцијално регулише квантитативним PCR-ом. Увођење миРНК у ћелију се врши китом за трансфекцију, који је базиран на технологији липидних наночестица чија је улога уношење мале интерферирајуће РНК у ћелију.

#### Оквирни садржај докторске дисертације

Предложена докторска дисертација садржаће следећа поглавља:

- 1) Увод
- 2) Циљ истраживања
- 3) Материјал и методе истраживања
- 4) Резултати
- 5) Дискусија
- 6) Закључци
- 7) Литература

Досадашња открића и актуелна истраживања која су у корелацији са темом докторске дисертације биће приказана у Уводу докторске дисертације. У овом поглављу кандидат ће предочити: [а] молекуларне механизме биогенезе и улоге миРНК молекула; [б] молекуларне механизме метастазе ћелија јајника пратећи циљане гене, њихове мутације и полиморфизме, затим улогу миРНК (miR-200a, miR-210, miR-126 и miR-21) и иРНК које оне регулишу у канцерогенези и метастази; [в] молекуларну биотехнологију тумора и малигнома јајника са освртом на значај имортализованих ћелијских линија у преклиничким испитивањима, затим на примену биоинформатичких алата и трансфекција код откривања нових миРНК молекула и њихових таргета. Циљ истраживања биће концизно описан на основу хипотеза докторске дисертације. Начин коришћења хуманог материјала, материјал и методе коришћени за доказивање хипотеза истраживања биће детаљно описани у поглављу Материјал и методе истраживања. Поглавље Резултати садржаће табеларни и графички приказ статистички обрађених резултата. Добијени резултати ће бити детаљно обrazloženi u поглављу Дискусија, са упоредном анализом литературних података. На основу добијених резултата истраживања, биће изведени појединачни и општи закључци. Поглавље Литература садржаће целокупан преглед литературе коришћене у докторској дисертацији.



**3. Образложение теме за израду докторске дисертације које омогућава закључак да је у питању оригинална идеја или оригинални начин анализирања проблема.**

Анализа експресије миРНК (miR-200a, miR-210, miR-126 и miR-21) и интерферентних таргета иРНК које оне регулишу, доприноси разумевању молекуларних механизама метастазе тумора јајника. Профили Испитивање нуклеотидних секвенци у оквиру *MIR200A*, *MIR210*, *MIR126* и *MIR21* гена у ткивима тумора јајника жене доприноси детекцији и повезивању полиморфизма и мутација са настанком, током и исходом проучавање повезаности миРНК и њихове улоге током метастазирања тумора јајника, као и оригиналан прилаз проблематици испитивања. Испитивања антитуморских ефеката нових хемио- и фитотерапеутика на имортализоване ћелијске линије карцинома јајника, доприноси размевању молекуларних механизама примену савремених метода у анализи интерферентних таргета, односно специфичној интеракцији миРНК-иРНК, као и њихових функционалних импликација. Биоинформатичка анализа нових миРНК молекула и њихових потенцијалних таргета, као и експериментална валидација трансфекцијом специфичне миРНК, даје значајан допринос у откривању нових биомаркера. На основу свега изнетог, закључујемо да је предложена тема „Молекуларни механизми метастазе, експресија и биоинформатичка анализа микро РНК“ у бенигним и малигним туморима хуманих јајника“ кандидата Стефана Благојевића оригинална идеја. Очекивани резултати могу бити научно верификовани и публиковани у међународним научним часописима и на научним скуповима.

**4. Усклађеност дефиниције предмета истраживања, основних појмова, предложене хипотезе, извора података, метода анализе са критеријумима науке уз поштовање научних принципа у изради коначне верзије докторске дисертације.**

Кандидат Стефан Благојевић ће обухватити све елементе савременог научноистраживачког рада у току израде своје докторске дисертације. Увидом у актуелну литературу, кандидат ће потврдити тачност svojih хипотеза и поставити циљеве, изабрати адекватну методологију у истраживању и статистичко-биоинформатичкој обради резултата. Поштујући основне критеријуме науке и научних принципа, доприноће развоју научних идеја у области докторске дисертације. Научни допринос предложене докторске дисертације се базира на актуелним истраживањима, унапредиће сазнања о улози миРНК у малигној трансформацији и процесима метастазе хуманих тумора јајника, као и утицај нових видова терапије (бионактивне супстанце и миРНК интерференција) на имортализованој ћелијској линији карцинома јајника. Примена биоинформатичких алата приликом откривања нових миРНК и њихових таргета уз експерименталну валидацију, има велики допринос у дијагностици и разумевању молекуларних механизама ове болести.

**5. Предложени ментор израде докторске дисертације.**

За ментора докторске дисертације кандидата Стефана Благојевића, Комисија предлаже др Снежану Марковић, доцента у Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Крагујевцу, ужа научна област Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија. Доц. др Снежана Марковић се активно бави научноистраживачким радом и аутор/коаутор је преко 65 научних радова (SCI листа; 1136 хетероцитата, χ индекс 15, извор SCOPUS) од значаја за развој научне мисли у оквиру Области. Од тога, преко 40 публикација су резултат испитивања биолошких ефеката и молекуларних механизама



деловања биоактивних супстанци (хемијски синтетисаних и изолованих из природних материјала) на хуманим имортализованим ћелијским линијама канцера, као и разумевања молекуларних механизама малигнитета у хуманој популацији.

Доц. др Снежана Марковић се две деценије бави научно-наставним радом у областима Молекуларне биологије, биотехнологије и физиологије, а тренутно је наставник на 15 акредитованих предмета на свим нивоима студија. До сада је била ментор пет одбрањених докторских дисертација и преко 20 магистарских/специјалистичких/ мастер/ дипломских радова из наведене научне области. Имајући у виду циљеве и очекивање резултате ове докторске дисертације, као и поље истраживања предложеног ментора, Комисија сматра да доц. др Снежана Марковић испуњава Законом и одговарајућим Правилником Универзитета у Крагујевцу предвиђене услове да буде ментор предложене докторске дисертације.

## 6. Научна област докторске дисертације.

Предложена тема докторске дисертације припада научној области Биологија, а ужо научној области Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија.

## 7. Научна област чланова комисије.

Ментор и предложени чланови комисије се баве научним радом у областима релевантним за тему предложене докторске дисертације. Сви чланови комисије имају већи број радова објављених у међународним научним часописима и завидно искуство у образовању научног подмлатка у својим институцијама.

**Др Наташа З. Ђорђевић, ванредни професор** Департмана за биомедицинске науке, Државни универзитет у Новом Пазару, ужа научна област: Биологија; докторат из у же области Анимална и хумана физиологија и молекуларна биологија. Проф. др Наташа Ђорђевић се 14 година активно бави наставним и научноистраживачким радом у области Хумане и анималне физиологије. У оквиру научноистраживачког рада бави се проучавањем редокс хомеостазе и улоге оксидационог стреса у патофизиолошким процесима, као и испитивањем цитотоксичности биоактивних супстанци. Досадашње резултате истраживања публиковала је као аутор/коаутор у 20 научних радова (SCI листа; 127 хетероцитата, h-индекс 6, извор SCOPUS). У оквиру наставе ангажована је на 11 акредитованих предмета на свим нивоима студија. До сада је била ментор једне одбрањене докторске дисертација и 15 мастер радова из научне области Биологија.

**Др Марко Н. Живановић, научни сарадник** Институт за информационе технологије, Универзитет у Крагујевцу; научна област: Биологија; ужа научна област: Ћелијска и молекуларна биологија. Фокус научноистраживачког рада је примењена биологија, биомедицински инжењеринг и *in vitro* испитивање молекуларних механизама биоактивних супстанци. Др Марко Живановић је у свом досадашњем научном раду објавио 74 библиографске јединице. На основу броја хетероцитата, h-индекс износи 7 (извор SCOPUS). Велики акценат ставља на пројектни менаџмент са више од 20 пријављених пројектних апликација Фонда за науку, Иновационог фонда Р. Србије, Министарства просвете, науке и технолошког развоја, као и у оквиру H2020 позива. Био је члан комисије за одбрану 2 завршна (мастер) рада и члан комисије за оцену и одбрану 3 докторске дисертације на Универзитету у Крагујевцу и Универзитету у Београду, ментор је двема колегиницама докторских академских студија биологије на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу.



## 8. Биографија кандидата са библиографијом.

Стефан Благојевић је рођен 05.08.1993. године у Крагујевцу. Основну школу „Мирко Јовановић“ је завршио 2008. године у Крагујевцу. Средњу школу „Друга крагујевачка гимназија“ завршио је 2012. године. Исте године је уписао основне академске студије Биологије у Институту за биологију и екологију (ИБЕ), Природно-математичког факултета (ПМФ), Универзитета у Крагујевцу (УН КГ), које је завршио 2016. године са просечном оценом 9,54. Мастер-академске студије Биологија – молекуларна биологија је уписао 2016. године на ИБЕ, ПМФ, УН КГ. Током студентске мобилности у оквиру ERASMUS+CREDIT MOBILITY програма, који је реализован у периоду од 05.02.2017. до 30.06.2017. године на Факултету за Биологију и Заштиту животне средине, Универзитета у Лођу (Польска), одлучао је и положио испите: *Cancer epigenetics, Cell cycle apoptosis and cancer, DNA damage and repair, Genetics and genomics in Medicine, Fluorescence and fluorescence probes in biological research, Epigenetics and Lifestyle*. Завршни рад под насловом „Статистичко груписање IC<sub>50</sub> вредности као показатеља цитотоксичности биоактивних супстанци на НСТ-116 и SW-480 ћелијским линијама карцинома колона“ (ментор доц. др Снежана Марковић), одбранио је са оценом 10 (29. септембра 2017.) и стекао академско звање Мастер биолог-молекуларни биолог са укупном просечном оценом 9,89. Исте године је уписао прву годину Докторских академских студија Биологије у ИБЕ, ПМФ, УН КГ.

У звању истраживач приправник (2018.-), започео је научноистраживачки рад у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију (Лабораторија) ИБЕ, ПМФ, УН КГ, ангажован на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (Преклиничка испитивања биоактивних супстанци, ПИБАС, Ев.бр. ИИИ41010, 2011-2019; руководилац Пројекта и Лабораторије је доц. др Снежана Марковић) и запослен на ПМФу (Пројекат ИИИ41010 закључно са 2019.; по Уговору о реализацији и финасирању научноистраживачког рада НИО-ПМФ 2020.- године).

Током докторских академских студија, под менторством доц. др Снежане Марковић као изабраним наставником-саветником, Стефан Благојевић је едукован у ужој научној области Физиологија човека и молекуларна биологија. Положио је три уско стручна предмета (Молекуларна биологија еукариотске ћелије, Молекуларна физиологија и Молекуларна биологија малигне ћелије). Кроз 6 студијско-истраживачка предмета (Истраживачки рад 1-4, Докторска дисертација-студијско истраживање 1, 2) дефинисао је оквире научноистраживачког рада.

У оквиру експерименталног дела научноистраживачког рада у Лабораторији, Стефан Благојевић је овладао савременим техникама и методама ћелијске и молекуларне биологије и укључио се у експериментална истраживања у областима:

- *In vitro* тестирање цитотоксичног ефекта биоактивних супстанци на имортализованим ћелијским линијама МТТ методом; одређивање типа ћелијске смрти Акридин оранж-Етидијум бромид (АО-ЕБ) микроскопском методом; испитивање протеинске експресије имуноцитофлуоресцентном микроскопијом.
- Биоинформатичка и статистичка обрада резултата тестирања цитотоксичних ефеката биоактивних супстанци (IC<sub>50</sub> вредности).
- Испитивање експресије информационих и микро РНК молекула из ткива и ћелијских линија, PCR методом у реалном времену.
- Амплификација циљаних ДНК секвенци из хуманих, биљних, животињских узорака, Multiplex PCR методом.
- Секвенирање циљаних ДНК секвенци методом по Сангера и биоинформатичка обрада резултата секвенирања применом Chromas Lite и Megab софтвера у циљу дефинисања полиморфизама и одређивања хаплогрупа њиховом имплементацијом са различитим геномским базама попут NCBI, Blast и MITOMASTER.

Савладао је методе рада, планирања и извођења експеримента, обраде и презентовања резултата истраживања.



### Стручна и научна усавршавања:

- Фебруар 2019. год. - обука за оптимизацију услова PCR амплификације на Природно-математичком факултету у Крагујевцу. Реализатор обуке: др Јелена Ракобрадовић, научни сарадник са Института за онкологију и радиологију Србије.
- Март 2019. год. - дводневна обука за секвенцирање по Сангеру (ДНК секвенце хуманог, биљног и животињског генома) на Ветеринарском Специјалистичком Институту у Краљеву. Реализатор обуке: Др Дејан Видановић, виши начни сарадник.
- Септембар 2019. год. - полазник у I напредној петничкој школи молекуларне биологије под називом „Квантитативни PCR“ у Истраживачкој станици Петница.
- Октобар 2019. год. - учествовао је у биоинформатичкој радионици која је реализована у сарадњи компаније „Seven Bridges Genomics“ и Института за информационе технологије УН КГ. Стефан Благојевић је учествовао у експерименталном раду мастер студената Биологије-молекуларна биологија, који су у Лабораторији радили завршне радове из области Физиологије животиња и човека и молекуларне биологије. Активно се бави промоцијом науке као представник Лабораторије, ИБЕ и ПМФ, на различитим манифестацијама попут „Ноћ истраживача“, „Ноћ музеја“ и „Фестивал науке“. Научноистраживачки рад у оквиру израде докторске дисертације, Стефан Благојевић ће реализовати у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију, ИБЕ, ПМФ, УН КГ.

### Библиографија

У току свог научноистраживачког рада, Стефан Благојевић је резултате истраживања публиковао у 7 библиографских јединица: три *in extenso* рада – један у међународном часопису (M22) и два рада у националном часопису међународног значаја (M24); 4 саопштења на међународним скуповима штампана у изводу (M34).

### Радови објављени у научним часописима међународног значаја (M20):

- Medjedović M, Simović A, Čočić D, Milutinović M, Senft L, Blagojević S, Milivojević N, Petrović B. Dinuclear ruthenium(II) polypyridyl complexes: Mechanistic study with biomolecules, DNA/BSA interactions and cytotoxic activity. *Polyhedron*, 2020, 178. doi: 10.1016/j.poly.2019.114334. ISSN: 0277-5387, IF2019: 2.343; **M22**

### Радови објављени у националном часопису међународног значаја (M24):

- Blagojević SZ, Cvjetković VM, Nikezić AG, Milutinović MG, Marković SD. Bioinformatics online support for bioactive substances cytotoxicity testing and their statistical analysis. *Kragujevac J. Sci*, 2020, 42: 55-72, ISSN: 1450-9636; doi: 10.5937/KgJSci2042055B. **M24**
- Nikezić AG, Blagojević SZ, Ćupurdija MĐ, Planojević NS, Jovankić JV, Rakobradović JD, Vidanović DS, Arsenijević DD, Marković SD. Comparative analysis of human DNA extraction methods and mitochondrial DNA HV1 and HV2 haplogroup determination. *Kragujevac J. Sci*, 2020, 42: 73-83, ISSN: 1450-9636; doi: 10.5937/KgJSci2042073N. **M24**

### Саопштења са међународног скупа штампана у изводу (M34):

- Nikezić A, Blagojević S, Planojević N, Ćupurdija M, Jovankić J, Cvetković D, Veličković T, Simić V, Marković SD. Comparative analysis of DNA extraction methods from human buccal swabs and fish tissue samples. 9th Conference of Serbian Biochemical Society "Diversity of Biochemistry". Belgrade, Serbia. November 14-16. 2019, pp. 140. ISBN: 987-86-7220-101-7. **M34**
- Ćupurdija M, Planojević N, Blagojević S, Nikezić A, Jovankić J, Milutinović M, Lazović M, Grbović F, Marković SD. Comparative study of different DNA isolation methods from plants and fungus. 9th Conference of Serbian Biochemical Society "Diversity of Biochemistry", Belgrade, Serbia. November 14-16. 2019, pp. 83. ISBN: 978-86-7220-101-7. **M34**



3. Blagojević S, Milutinović M, Milivojević N, Živanović M, Marković S. Cytotoxic and proapoptotic effects of extracts from *Vitis vinifera* L. petiole on colon cancer cell lines. 8th Conference of Serbian Biochemical Society "Coordination in Biochemistry and Life", Novi Sad, Serbia. November 16. 2018, pp. 117. ISBN: 978-86-7220-096-6. M34
4. Blagojević SZ, Furtula B, Nikezić AG, Milutinović MG, Živanović MN, Marković SD. Statistical clustering of IC50 values as indicators of cytotoxicity of bioactive substances on HCT-116 and SW-480 cell line on colon cancer. 7th Conference of Serbian Biochemical Society "Biochemistry of Control in Life and Technology", Belgrade, Serbia. November 10. 2017, pp. 129. ISBN: 978-86-7220-091-1. M34

## ЗАКЉУЧАК КОМИСИЈЕ

Кандидат Стефан З. Благојевић, мастер биолог-молекуларни биолог, студент је докторских академских студија биологије, ужа област Физиологија и молекуларна биологија, у Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу. Одслушао је завршну годину студија и положио све планом и програмом предвиђене испите. Резултате истраживања је публиковао у 7 библиографских јединица: три *in extenso* рада – један у међународном часопису са SCI листе (M22) и два рада у националном часопису од међународног значаја (M24); 4 саопштења на међународним скуповима штампана у изводу (M34). Увидом у доступну документацију и чињенице, као и анализом литературних података о стању истраживања у области предложене Дисертације, Комисија закључује да је предложена тема за израду докторске дисертације заснована на савременим научним сазнањима, те да ће реализација истраживања у оквиру ове теме представљати значајан допринос развоју области ћелијске и молекуларне биологије малигних тумора хумане популације.

Сматрајући да постоје сви релевантни предуслови да се предложена истраживања квалитетно реализују, уз поштовање принципа професионалне и научне етике, посебно у погледу коришћења хуманог материјала, Комисија потврђује да је тема докторске дисертације „Молекуларни механизми метастазе, експресија и биоинформатичка анализа микро РНК у бенигним и малигним туморима хуманих јајника“ актуелна и научно заснована, а кандидат Стефан З. Благојевић испуњава услове за научноистраживачки рад и реализацију предложене докторске дисертације, у складу са Законом и одговарајућим Правилником Универзитета.

За ментора дисертације, Комисија предлаже доц. др Снежану Марковић, Природно-математички факултет Универзитета у Крагујевцу.



На основу свега изнетог, Комисија предлаже Наставно-научном већу Природно-математичког факултета и Већу за Природно-математичке науке Универзитета у Крагујевцу да усвоји Извештај о оцени научне заснованости теме и испуњености услова кандидата Стефана З. Благојевића и ментора за израду докторске дисертације, те спроведе даљи поступак за реализацију предложене докторске дисертације.

У Крагујевцу,  
12.02.2021.

### КОМИСИЈА

Др Наташа З. Ђорђевић, ванредни професор; **председник Комисије**  
Департман за биомедицинске науке, Државни универзитет у Новом Пазару  
Ужа научна област: Биологија;

Др Снежана Д. Марковић, доцент; **предложени ментор**  
Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу  
Ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија;

Др Марко Н. Живановић, научни сарадник; **члан Комисије**  
Институт за информационе технологије, Универзитет у Крагујевцу  
Научна област: Биологија; ужа научна област: Ђелијска и молекуларна биологија.