

**UNIVERZITET CRNE GORE
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DOKTORSKE STUDIJE**

Crna Gora
UNIVERZITET CRNE GORE
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Broj 8511
Podgorica, 14. 06. 2021 god.

VIJEĆU PRIRODNO-MATEMATIČKOG FAKULTETA

Predmet: Prijava teme doktorske disertacije i predlog Komisije za ocjenu podobnosti teme

U skladu sa članom 33, stav 4, Pravila doktorskih studija, doktorand **mr Milutin Radonjić** je 19. 05. 2021. god. Vijeću Prirodno-matematičkog fakulteta podnio **Prijavu teme doktorske disertacije (PD Obrazac** sa pratećom dokumentacijom) pod naslovom **“Učestalost haplotipova HLA-DQ2 i HLA-DQ8 u crnogorskoj populaciji i njihova povezanost sa kliničkom slikom celijakije”**.

Komisija za doktorske studije PMF-a je na elektronskoj sjednici održanoj 07. 06. 2021. god. razmatrala formalne uslove dostavljene prijave sa stanovišta neophodnih podataka i ispunjavanja uslova za prijavu teme i podnosi Vijeću

P R E D L O G

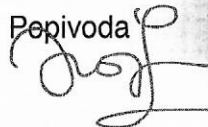
sastava **Komisije za ocjenu podobnosti teme:**

1. **Dr Andrej Perović**, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta Crne Gore (naučna oblast: ekofiziologija)
2. **Dr Brigita Smolović**, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore (naučna oblast: gastroenterohepatologija)
3. **Dr Danilo Mrdak**, vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta Crne Gore, mentor (naučna oblast: genetika populacija, ihtiologija, konzervaciona biologija)

Podgorica, 10. 06. 2021. god.

ZA KOMISIJU ZA DOKTORSKE STUDIJE

Doc. dr Goran Popivoda



PRIJAVA TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	Mr Milutin Radonjić
Fakultet	Prirodno-matematički fakultet
Studijski program	Biologija
Broj indeksa	2/19
Ime i prezime roditelja	Zorka Popović
Datum i mjesto rođenja	07.09.1985., Cetinje, Crna Gora
Adresa prebivališta	Studentska bb, Lamela 7/56, Podgorica, Crna Gora
Telefon	069-229 650
E-mail	milutinradonjic@gmail.com
BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA	
Obrazovanje	Milutin Radonjić je rođen 07.09.1985. godine na Cetinju, gdje je završio osnovnu školu „Lovčenski partizanski odred“ i gimnaziju „Cetinjska gimnazija“. Školske 2004/2005 godine upisao je osnovne studije Biologije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Podgorici, osnovne studije završio je 2008. godine sa stečenim zvanje BSc. Biologije. Specijalističke studije upisuje 2008/2009. godine, na smjeru Biologija-Ekologija, na Prirodno-matematičkom fakultetu u Podgorici, a završava ih 2009. godine i stiče zvanje Spec. Sci. Biologije-Ekologije. Povono upisuje specijalističke studije 2009/2010. godine, na smjeru Biologija-Eksperimentalna biologija i biotehnologija, na Prirodno-matematičkom fakultetu u Podgorici, a završava ih 2010. godine i stiče zvanje Spec. Sci. Eksperimentalne biologije i biotehnologije. Magistarske akademske studije, na smjeru Biologija-Eksperimentalne biologije i biotehnologije upisao je školske 2013/2014. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu u Podgorici. Magistarsku tezu pod nazivom: „Specifični antigen prostate (PSA) u dijagnostici i liječenju invazivnog karcinoma prostate hormonalnim tretmanom“ je odbranio 03.03.2014. godine i stekao zvanje MSc. Eksperimentalne biologije i biotehnologije. Doktorske studije na istom fakultetu upisao je u oktobru 2019/2020. godine na Studijskom programu Biologija na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta Crne Gore.
Radno iskustvo	2019-sadašnjost: molekularni biolog/biotehnolog Zavod za transfuziju krvi Crne Gore - HLA laboratorija 2017-2019: molekularnog biologa/biotehnolog u KBC Crne Gore na projektu - HLA laboratorija Crne Gore 2016-2017: Profesro u JU strulna medicinskoj skoli, Podgorica, Crna Gora

	Crna Gora 2015-2016: Asistent u nauci na Univerzitetskoj bolnici u Jeni, Njemačka. 2012-2013: Nacionalni Sekretar u I.A.E.S.T.E. Montenegro The International Association for the Exchange of Students for Technical Experience 2010-2015: Kordinator, PRONA-Fondacija za promociju nauke.
Popis radova	1. „Prostate-specific antigen (PSA) in the diagnosis and treatment of invasive prostate cancer treated with hormone treatment” IFCC WORLDLAB Instambul 2014, 22nd International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 22-26, Jun, 2014, Milutin R. Danica P. 2. „Influence of L-Carnitine of muscle metabolism in the athletes“, 20th meeting of Balcan Jurnal of Clinical Laboratory. Septembar 19-22, 2012. Beograd, Srbija. Milutin R. Danica P.
NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Na službenom jeziku	Učestalost haplotipova HLA-DQ2 i HLA-DQ8 u crnogorskoj populaciji i njihova povezanost sa kliničkom slikom celijakije
Na engleskom jeziku	Frequency of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 haplotypes in Montenegrin population and their association with the clinical parameters of celiac disease
Obrazloženje teme	
Istraživanja na polju imunogenetike nijesu rađena u Crnoj Gori do sada, što nam je i bio podstrek da počnemo sa razvojem i afirmacijom ove oblasti. Na razvoju ove oblasti na području ExYu zemalja najviše je rađeno na području Hrvatske, Univerzitet Zagreb, Univerzitetska klinika KBC Rebro, laboratorija za Imunokompatibilnost (Dr. Zorana Grubić, Dr. Renate Žunec, Dr. Katarina Stingl Janković, Dr. Marija Burek Kamenarić), gdje se ova zemlja izdvaja kao jedna od prve dvije u Evropskoj Uniji po broju transplantiranih pacijenata po na milion stanovnika. Imunogenetika je grana molekularne biologije koja se bavi interakcijama između genetike i imunologije. Ima niz različitih aplikacija, a jedna od najvažnijih je u transplantacijskoj medicini. Jedno područje od posebnog interesa je histokompatibilnost. Ovaj se izraz odnosi na situaciju u kojoj se tkivo ili krv jedne osobe mogu sigurno presaditi (transplantirati) u drugu jer njih dvoje imaju slične ili iste antigene. Manje je vjerovatno da će donatorsko tijelo odbaciti ili loše reagovati na donatorski materijal jer ga prepoznaje, barem djelomično. Kada je nekom potrebna transplantacija organa ili tkiva, izvode se studije istokompatibilnosti kako bi se pronašlo najbolje moguće podudaranje. Takođe, ova oblast se bavi i proučavanjem autoimunih bolesti koje su povezane sa HLA (engl. human leukocyte antigen-HLA) sistemom. HLA je izrazito polimorfan sistem. S obzirom na različite genske porodice humanih MHC (engl.: major histocompatibility complex-MHC) je podijeljen u tri regije: klasa I, II i III. Mnogi geni klase I i II vrlo su polimorfni, a najveći polimorfizam postoji u dijelu koji kodira hipervarijabilnu regiju kojom se veže strani peptid (1, 2, 3). HUGO Gene Nomenclature Committee označio je HLA-DQA1 i HLA-DQB1 gene klase II kao CELIAC1 i smatra se da samo HLA regija pridonosi oko 40% heritabilnosti	

Obrazac

na različite genske porodice humanih MHC (engl.: major histocompatibility complex-MHC) je podijeljen u tri regije: klasa I., II. i III. Mnogi geni klase I. i II. vrlo su polimorfni, a najveći polimorfizam postoji u dijelu koji kodira hipervarijabilnu regiju kojom se veže strani peptid (1, 2, 3). HUGO Gene Nomenclature Committee označio je HLA-DQA1 i HLA-DQB1 gene klase II. kao CELIAC1 i smatra se da samo HLA regija pridonosi oko 40% heritabilnosti celijakije (3, 4). Razlog zašto ovi geni pogoduju razvoju celijakije je u tome što izoforme receptora DQ2 i DQ8, koje su produkti rizičnih alela, imaju snažan afinitet za deaminirani glijadin u odnosu na druge antigen prezentirajuće receptore, što dovodi do aktivacije T-limfocita (2, 5). Shodno gore navedenom možemo zaključiti da su ispitivanja epistatskih reakcija gena, kao i korelacije između genotipa i fenotipske ekspresije bolesti, od izuzetnog značenja i za pacijente u Crnogorskoj populaciji.

Pregled istraživanja

Istraživanja iz oblasti imunogenetike u Crnoj Gori do danas nijesu rađena, tako da ćemo po prvi put imati dublji osvrt na ovu jako interesantnu oblast, a sve to iz aspekta uticaja genetske predispozicije pacijenata na celijakiju kao sistematsku autoimunu bolest. Celijakija je bolest poremećenog imunog odgovora potstaknuta glutenom, koja se javlja kod genetički predisponiranih osobama. Svrha ovog rada je prikazati dosadašnje spoznaje iz imunogenetike celijakije u populaciji Crne Gore a genska podloga celijakije vezana za lokus humanih leukocitnih antigena (HLA) kao dominantnu genetičku predispoziciju, predstavlja osnov istraživanja.

Celijakija ili glutenska enteropatija: je hronična bolest tankog crijeva uzrokovana glutenom prvenstveno iz pšenice, raži i ječma. Bolest se karakteriše poremećajima imunog odgovora, u genetički predisponiranim osoba, s posljedičnim oštećenjem sluznice tankog crijeva i malapsorpcijom (6). Danas se smatra da bolest nije rasprostranjena samo u Evropi i da oko 0,5-1% svjetskog stanovništva ima celijakiju (7). Recentna epidemiološka studija sprovedena u 15 mediteranskih zemalja, procjenjuje da će u idućih deset godina biti više od pet miliona novootkrivenih bolesnika (8). Neprepoznata bolest je povezana s većim brojem komplikacija, najčešće anemijom, osteoporozaom, malapsorpcijom i sa malignim tumorima (limfomima) (9). Prema recentnim radovima stiže se utisak da je rizik od malignih tumora, uključujući limfome, nešto niži nego što se prije smatralo (10).

Klinička slika: Simptomatska celijakija podrazumijeva širok spektar simptoma, kako crijevnih tako i izvancrijevnih, poznatih s ingestijom glutena. Kod bolesnika s klasičnim tipom celijakije bolest se najčešće javlja između 6. i 24. mjeseca života, ali i generalno tokom života, a manifestuje se simptomima malapsorpcije uz prisustvo masne stolice, gubitaka tjelesne mase ili zastajanjem u rastu.

Etiopatogeneza celijakije: Značaj genske predispozicije u etiopatogenezi celijakije potvrđen je u brojnim genetičko-epidemiološkim istraživanjima bolesti kod bolesnikovih srodnika. Tako kod jednojajčanih blizanaca postoji visoki procenat podudarnosti (oko 75%), dok se kod onih dvojajčanih i prvih srodnika bolest javlja u znatno manjem procentu (10-15%) (7, 11). Uz to je poznato da je bolest jako povezana s alelima humanog leukocitnog antigena (HLA) klasa II, glavnog sistem tkivne podudarnosti (MHC). Više od 95% oboljelih od celijakije nosi HLA DQ2 ili DQ8 haplotip (6, 12).

HLA geni i celijakija: S obzirom na to da je celijakija multifaktorska bolest, predispozicija za nju determinisana je velikim brojem gena, pri čemu se HLA sistem ističe kao ključni genetički činilac u etiopatogenezi bolesti. Molekuli DQ2 i DQ8 kodirani su HLA sistemom koji je lociran na

kratkom kraku hromosoma 6, u regiji 6p21.3 i kodira sintezu proteina koji predočavaju antigene imunološki kompetentnim ćelijama. Regiju čini više od 250 gena sa 4 milijona parova baza, što približno obuhvata 0,12% humanog genoma i čini ga jednim od genski najvarijabilnijim regijama. Mnogi od tih gena determinišu stvaranje proteina odgovornih za imunološki nadzor (1, 2, 13).

Cilj i hipoteze

Glavni cilj ove doktorske disertacije je utvrditi učestalost haplotipova i alela HLA-DQA1 i HLA-DQB1 lokusima kod pacijenata oboljelih od celijakije, kao i njihov utjecaj na kliničku ekspresiju bolesti, koja će se sprovoditi korišćenjem metodama molekularne biologije, primjenom savremenih metoda multivarijacione statistike i numeričke klasifikacije u svrhu detekcije i determinacije uticaja navedenih gena na pacijente sa celijakijom. Kao cilj je i da se ustanovi stepen genetske sličnosti sa drugim populacijama.

Prilikom izrade ove doktorske disertacije poći će se od sljedeće hipoteza:

- H₀₁: Učestalost celijakije u Crnoj Gori poklapa se sa učestalošću ove bolesti u drugim Mediteranskim zemljama.
- H₀₂: Učestalost alela koji se dovode u vezu sa celijakijom u crnogorskoj populaciji slična je sa frekvencijom ovih alela u drugim mediteranskim zemljama.

Materijali, metode i plan istraživanja

U ispitivanju će biti uključeno preko 200 pacijenata s dijagnostifikovanom celijakijom prema revidiranim ESPGHAN kriterijima 24 koji su klinički obrađeni na Klinici za internu medicine i Klinici za pedijatriju Kliničkog bolničkog centru Crne Gore, kao i centrima na teritoriji Crne Gore. Pacijenti su prikupljeni u okviru naučno - istraživačkog projekta CEBIMER – Centar za biomedicinska istraživanja (Ministarstvo Nauke, Vlada Crne Gore) kojeg je finansiralo Ministarstvo nauke Crne Gore. Medicinski podaci i humani materijal prikupljaju se u skladu sa etičkim i bioetičkim principima te je osigurana privatnost ispitanika uključenih u istraživanju, kao i zaštita tajnosti podataka.

Kao materija za ekstrakciju DNA koristićemo krv, uzorkovanu iz vena sa DB Vakutajner metodom, od 6ml, sa K2E-EDTA. Ispitanicima je u epruvete s antikoagulansom (EDTA) izvađeno po 5 ml periferne krvi. Ekstrakciju DNA radićemo sa Ready DNA Spin Kit-om proizvođača Inno-Train Molekular Diagnostik GmbH. Molekularne-genetičke analize za HLA tipizaciju zasnovane na reakciji lančanog umnožavanja DNA (PCR) upotrebom oligonukleotidnih proba specifičnih za sekvence (PCR-SSO) koristićemo IFECODES HLA-SSO Typing Kit Product Insert (LC1436IVD), a za očitavanje dobijenih rezultat koristićemo specijalno namijenjen program LIFECODES MACHT IT DNA. Takođe, kao molekularnu metodu (PCR) koristićemo prajmer specifične sekvence (PCR-SSP) gdje ćemo koristiti Olerup SSP-HLA typing kits. A za slikanje dobijenih rezultata koristićemo BIO RAD Molecular Imager Gel Doc XR system, kao i specijalno dizajnirani program Olerup – Helmberg – SCORE za njihovo čitanje. Molekularno-genetička analiza HLA-DRB1, HLA-DQA1 i HLA-DQB1 gena napravljena je na Zavodu za transfuziju krvi Crne Gore, laboratorija za imunogenetiku i HLA dijagnostiku. Genetičke analize provodit će se standardno prema uputama proizvođača, a interpretacija rezultata vršiće se takođe prema uputi proizvođača koristeći listu alela IGMT/HLA (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>).

Statistička obrada podataka sprovoditi će se u programu Statistika 10.0. Na temelju dobijenih rezultata vršiće se upoređene učestalosti genotipova za nosioce HLA-DQ2 i/ili HLA-DQ8 molekula u podskupinama pacijenata pomoću Hi-kvadrat testa. Takođe je ispitana povezanost između genotipa i fenotipske ekspresije bolesti. U okviru analize kliničkih pokazatelja

koristićemo i deskriptivnu statistiku (srednje vrijednosti, standardne devijacije). Za testiranje bolesti u odnosu da dob manifestacije iste koristićemo ANOVO test. Rezultati se smatraju statistički značajnim ako je nivo vrijednosti $P < 0,05$.

Očekivani naučni doprinos

Kako je već navedeno, rezultati ovog rada će predstavljati po prvi put prikazane učestalosti alela i učestalosti haplotipova za lokuse HLA-DRB1, HLA-DQA1 i HLA-DQB1 kod ispitivanih bolesnika u populaciji Crne Gore. Takođe, na osnovu dobijenog polimorfizma HLA, analizom demografskih karakteristika uspoređićemo stepen genetičke sličnosti sa drugim populacijama. Ustanovljenjem HLA polimorfizma je osnov za dalja ispitivanja značaja HLA alela kod različitih grupa bolesnika.

Spisak objavljenih radova kandidata

1. „Prostate-specific antigen (PSA) in the diagnosis and treatment of invasive prostate cancer treated with hormone treatment” IFCC WORLDLAB Instambul 2014, 22nd International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 22-26, Jun, 2014, Milutin R. Danica P.
2. „Influence of L-Carnitine of muscle metabolism in the athletes“, 20th meeting of Balcan Jurnal of Clinical Laboratory. Septembar 19-22, 2012. Beograd, Srbija. Milutin R. Danica P.

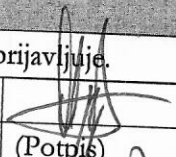
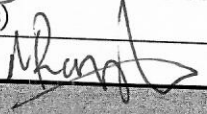
Popis literature

1. Starčević Čizmarević N, Mijandrušić Sinčić B, Licul V, Kapović M, Ristić S. Geni i celijakija. *Pediatr Croat* 2015;59:88-94.
2. Peršić M, Vujaklija-Stipanović K, Crnić-Martinović M, Fućak M. HLA tipizacija u djece s glutenskom enteropatijom. *Jugosl Pedijatr* 1988;31:93-6.
3. Revised criteria for celiac disease. Working group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. *Arch Dis Child* 1990;65:909-11.
4. European Molecular Biology Laboratory [Internet]. Hinxton: IMGT/HLA Database. c2015 [cited 2013 Jun 3]. Available from: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>
5. Romanos J, van Diemen CC, Nolte IM, Trynka G, Zhernakova A, Fu J et al. Analysis of HLA and non-HLA alleles can identify individuals at high risk for celiac disease, *Gastroenterology*. 2009;137:834-40.
6. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PHR et al. The Oslo definition and related terms. *Gut* 2013;62:43-52.
7. Freeman HJ. Celiac disease: a disorder emerging from antiquity, its evolving classification and risk, and potential new treatment paradigms. *Gut Liver* 2015;9:28-37
8. Tack GJ, Verbeek WHM, Schreurs MWJ, Mulder CJJ. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:204-13.
9. Cosnes J, Cellier C, Viola S, Colombel JF, Michaud L, Sarles J et al. Incidence of autoimmune disease in celiac disease: protective effect of the gluten free diet. *Clin Gastroenterol Hepatol* 008;6:753-8.
10. Viljama M, Kaukinen K, Huhtala H, Kyropalo S, Rasmussen M, Collin P. Celiac disease, autoimmune diseases and gluten exposure. *Scand J Gastroenterol* 2005;40:437-43.
11. Ludvigsson JF, Bai JC, Biagi F, Card TR, Ciacci C, Ciclitira PJ et al. Diagnosis and management of adult celiac disease: guidelines from the British Society of Gastroenterology. *Gut* 2014;63:1210-28.

12. Wijmenga C, Gutierrez-Achury J. Celiac disease genetics: past, present and future challenges. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2014;59:S4-7.
13. Jurčić Z, Brkljačić-Šurlaković L, Grubić Z, Žunec R, Vezmar v, Kaštelan A. Gluten enteropathy in croatian children is primarily associated with the HLA-DR3-DQ2 haplotype. Lijecn Vjesn 2000; 122:259-63.

SAGLASNOST PREDLOŽENOG/IH MENTORA I DOKTORANDA SA PRIJAVOM

Odgovorno potvrđujem da sam saglasan sa temom koja se prijavljuje.

Prvi mentor	Dr Danilo Mrdak	
Drugi mentor	(Ime i prezime)	(Potpis)
Doktorand	Mr Milutin Radonjić	

IZJAVA

Odgovorno izjavljujem da doktorsku disertaciju sa istom temom nisam prijavio/la ni na jednom drugom fakultetu.

U Podgorici,

Ime i prezime doktoranda
Mr Milutin Radonjić

