

UNIVERZITET CRNE GORE
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
VIJEĆU PRIRODNO-MATEMATIČKOG FAKULTETA

PREDMET: Ocjena podobnosti teme magistarskog rada i kandidata

Na osnovu člana 64 Statuta Univerziteta Crne Gore, a u vezi sa članom 15 stav 2 Pravilnika o studiranju na master studijama, na LXXX sjednici Vijeća Prirodno-matematičkog fakulteta, održanoj 5.04.2022. godine, imenovani smo za članove komisije za ocjenu podobnosti teme za izradu magistarskog rada pod nazivom **“Učestalost i genetska struktura infektivne larve crva iz klase Nematoda, rod Anisakis, u odabranim komercijalno važnim ribljim vrstama akvatorijuma crnogorskog dijela Jadranskog mora”**, kandidatkinje **Tamare Mitrović**. Na osnovu uvida u dostavljenu dokumentaciju, podnosimo sljedeći

IZVJEŠTAJ

1. Podaci o kandidatu

Tamara Mitrović rođena je 12.10.1996. godine u Foči, gdje je završila osnovnu i srednju školu. Osnovne studije završila je 2018. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu, Studijski program Biologija, Univerziteta Crne Gore. Zvanje specijaliste biolog – ekolog stekla je u septembru 2019. godine. Na magistarskim studijama - smjer Ekologija, položila je sve predviđene ispite. Kandidatkinja dobro vlada engleskim jezikom i posjeduje neophodne kompjuterske vještine (MS Office - Word, PowerPoint, Excel; STATSOFT). Od oktobra 2019. godine, radi u Institutu za biologiju mora kao stručni saradnik.

Obrazloženje teme

U prijavi teme kandidatkinja je predložila temu pod naslovom **“Učestalost i genetska struktura infektivne larve crva iz klase Nematoda, rod Anisakis, u odabranim komercijalno važnim ribljim vrstama akvatorijuma crnogorskog dijela Jadranskog mora”** koja je odobrena od strane Odbora za monitoring magistarskih studija.

a) *Naučna oblast*

Predložena tema, odnosno istraživanja koja su predviđena u ovom radu, spadaju u okvir biologije, a uža oblast istraživanja je parazitologija – ekologija i genetika.

b) *Predmet rada*

Odrasli crvi roda *Anisakis* žive u stomaku morskih sisara. Žive u grozdovima, ugrađeni u sluzokožu. Odrasle ženke proizvode jaja bez embriona koja se izlučuju u spoljašnju sredinu izmetom morskih sisara. Zatim jaja u vodi postaju embrionalna i u njima se formiraju larve I i II stepena. Nakon izlijeganja iz jajeta larve postaju slobodno-plivajuće. Larve koje slobodno plivaju dalje jedu rakovi koji predstavljaju prvog prelaznog domaćina za *Anisakis*. U rakovima se larve razvijaju u larve trećeg stadijuma i migriraju iz crijeva u tkiva u peritonealnoj šupljini. Kada domaćina pojedu riba ili lignja, larve migriraju u mišićno tkivo, a dalje se larve prenose sa ribe na ribu ishranom. Dakle larve trećeg stadijuma, koje su infektivne za ljude i morske sisare, žive u ribama i lignjama. Kada infektivnu ribu ili lignju pojedu morski sisari, larve se razvijaju u odrasle crve. Odrasle ženke proizvode jaja koja izbacuju morski sisari, čime se životni ciklus *Anisakis*-a zaokružuje. Ljudi mogu postati slučajni domaćini za *Anisakis* larve trećeg stadijuma jedući sirovu ili nedovoljno kuvanu zaraženu morsku ribu. Nakon dospijevanja u organizam, larve prodiru u sluzokoži želuca i crijeva, izazivajući neželjene simptome. Simptomi gastrične anisakijaze obično uključuju bol u stomaku, mučninu i povraćanje u roku od nekoliko sati nakon gutanja larvi. Zahvatanje tankog crijeva je manje uobičajeno i može dovesti do upale i subakutnih simptoma koji liče na Kronovu bolest koji se razvijaju 1 do 2 nedelje kasnije. Rijetko se mogu javiti ektopične infekcije izvan lumena gastrointestinalnog trakta. Usljed nepravilnog liječenja ili kasne dijagnoze, *Anisakijaza* može izazvati smrt.

c) *Naučni cilj rada*

Glavni cilj ovog istraživanja je precizna identifikacija vrsta parazitskih crva izolovanih iz digestivnog sistema oslića (*M. merluccius*), šnjura (*T. trachurus*) i barbuna (*M. barbatus*), a koje predstavljaju važne komercijalne riblje vrste Crne Gore. Jedan od primarnih ciljeva je proširenje dosadašnjih saznanja o vrstama roda *Anisakis*, kao i njihova molekularna identifikacija, koja do sad nije rađena na vrstama roda *Anisakis* koji parazitiraju na predstavnicima ihtiofaune crnogorskog primorja. Svrha molekularne analize crva roda

Anisakis podrazumijevaće utvrđivanje strukture genetike populacije najbrojnije vrste, *Anisakis pegreffii*. Utvrđivanjem brojnosti nematodnih parazita, računanjem prevalencije, abundance i intenziteta parazita po domaćinu utvrdiće se dinamika populacije parazita *Anisakis* spp. što ima za cilj dobijanje epidemiološki važnih informacija.

Sumarno prikazano ciljevi ovog rada su:

- Identifikacija vrsta parazitskih crva u odabranim komercijalno važnim vrstama riba akvatorijuma crnogorskog dijela Jadranskog mora
- Proširenje dosadašnjih saznanja o parazitskoj nematodi roda *Anisakis* u Jadranskom moru
- Molekularna identifikacija crva roda *Anisakis* u u odabranim komercijalno važnim vrstama riba akvatorijuma crnogorskog dijela Jadranskog mora
- Utvrđivanje genetičke strukture populacije najbrojnije vrste, *A. pegreffii*
- Utvrđivanje dinamike populacije parazitske nematode *Anisakis* spp. u odabranim komercijalno važnim vrstama riba akvatorijuma crnogorskog dijela Jadranskog mora.

d) Naučne metode

U istraživanju će biti primijenjene sljedeće metode:

- Prikupljanje ribljih vrsta: oslić (*M. merluccius*), barbun (*M. barbatus*) i šnjur (*T. trachurus*), koje će biti izlovljavane kočom od strane lokalnih ribolovaca. Uzorkovanje ribe obuhvatiće regione crnogorskog primorja (od Herceg Novog do Ulcinja) i biće obavljeno tokom jedne godine nasumično, bez posvećivanja pažnje sezonskoj dinamici.
- Uzorkovanje crva iz ribljih vrsta i numerička analiza po domaćinu. Nakon disekcije trbušne duplje riba, izvršiće se izolovanje crva iz digestivnog sistema, gonada i mišića (vidljivi okom) i njihovo prebrojavanje. Izolovane jedinke parazitskih nematoda potom će se stavljati u 96% alkohol u propisno obilježene ependorf tubice i čuvati na 4 stepena do daljih analiza.
- Morfološka identifikacija parazita roda *Anisakis*. Detaljnija determinacija vrsta iz roda *Anisakis* biće urađena korišćenjem svjetlosnog mikroskopa pod uvećanjima 40, 100 i 200x. Da bi se olakšala vizuelizacija svih anatomskih struktura, zbog čvrste kutikule i

promjera tijela 0,3 do 3 mm, jedinke parazita će se uklopiti između dvije debele staklene ploče. Razvojni stadijumi parazita određiće se prema Berland (1961).

- Metode procjene dinamike populacije. Statističke mjere dinamike populacije biće izračunate u programu Quantitative Parasitology 3.0 (Rózsa i sar., 2000; Reiczigel i Rózsa, 2005). Dobiće se podaci o prevalenciji, intenzitetu i srednjoj abundance vrste.

- Molekularna analiza koja obuhvata:

1. Izolaciju DNK. Izolacija će se vršiti modifikovanom verzijom metode po Saliju (Hogan i sar., 1994);

2. Lančana reakcija polimerazom (PCR, Polymerase chain reaction). Lančanom reakcijom polimeraze umnožiće se fragment mitohondrijske DNK, lokus citohrom oksidaze podjedinice 2 (COII), dužine oko 600 parova baza (bp, base pairs). Uz pomoć F i R primer-a, Premix Ex Taq Hot Start Version i nuclease free water napraviće se master mix koji će se zajedno sa produktom izolacije DNK izmiješati u eppendorf tubicama. PCR će se obaviti u Eppendorf uređaju za PCR.

3. Elektroforeza PCR produkata. Dužina (broj parova baza) i prisutnost umnoženih fragmenata DNK (PCR produkata) provjeriće se elektroforezom na 1 % agaroznom gelu. Gel će se napraviti uz pomoć agarose i TE pufera, zatim ohladiti i izliti u posudu u koju će se umetnuti češljici. Nakon hlađenja gela u komorice će se uz pomoć mikropipeta unijeti PCR produkt. Nakon elektroforeze rezultat će se provjeriti uz pomoć UV transiluminatora.

4. Pročišćavanje PCR produkata i sekvenciranje. Pročišćavanje će odraditi pomoću komercijalnog kita QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), slijedeći uputstva iz protokola proizvođača. Pročišćeni PCR produkti poslaće se u laboratoriju „MacroGen Europe“, Holandija, na sekvenciranje zajedno sa 5' prajmerom. Sekvenciranje će biti obavljeno na aparatu ABI 3100 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems), korišćenjem kita ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit;

5. Analiza dobijenih sekvenci mitohondrijske DNK koja obuhvata:

1. Genetsku raznovrsnost i strukturu haplotipova vrste *Anisakis* sp. Nukleotidne sekvence fragmenta mitohondrijske DNK poravnaće se pomoću algoritma Clustal W (Thompson i sar., 1994) implementiranog u programu MEGA X (Tamura i sar., 2018). Tačnost sekvenci će biti provjerena u BioEdit 7.2 Software-u pregledom na hromatogramu.

Pogrešno očitana nukleotidna mjesta će biti ručno korigovana. Genetska raznovrsnost će se odrediti se u programima DnaSP 6.0 (Rozas i sar., 2017) i Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier i Lischer., 2010) procjenom broja haplotipova (H), polimorfnih mjesta (S), raznovrsnosti haplotipova (h, genetička raznolikost; Nei, 1987), nukleotidne raznovrsnosti (π ; Nei, 1987) i srednjeg broja razlika između parova nukleotidnih sekvenci (k, Tajima, 1983).

2. Filogenetska analiza vrsta roda *Anisakis*. BI analiza (Larget i Simon, 1999) napraviće se na sekvencama crva roda *Anisakis* izolovanih ovim istraživanjem zajedno sa sekvencama preuzetim iz GenBank baze podataka fragmenta COII, koristeći MRBayes v3.2.7 program (Ronquist i sar. 2012). Dobijeno stablo vizualizovaće se korišćenjem FigTree programa.

Aktuelnost problematike u svijetu

Interesovanje za parazita kao što je *Anisakis* je uvijek prisutno na naučnom polju jer je jedan od parazita koji imaju zdravstveni rizik za ljude. Mišljenja smo da će rezultati ovog istraživanja dati informacije od velike u prvom redu jer će se dobiti uvid u zastupljenost parazita roda *Anisakis* u komercijalno važnim ribljim vrstama Crne Gore. Bitnost dobijenih informacija se ogleda u tome što parazit roda *Anisakis* (usljed nedovoljno termički obrađene ribe) izaziva bolest anisakijazu kod ljudi, koja se može završiti i smrtnim ishodom. Informacije o zastupljenosti crva roda *Anisakis* iz komercijalno važnih ribljih vrsta daće doprinos nauci jer se do sad ovako pouzdana genetička analiza nije vršila na crnogorskom primorju i time će se pridružiti ostalim ispitivanim regijama u Jadranskom moru.

Zaključak

Nakon pregleda dostavljenog materijala, Komisija je utvrdila da kandidatkinja **Tamara Mitrović** ispunjava sve zakonom predviđene uslove, predložena tema ima jasno definisane ciljeve, metode istraživanja i očekivane rezultate, prati savremene naučne trendove kada je u pitanju problematika kojom se rad bavi, te će sam rad biti značajan doprinos proučavanju ribljih parazita u Crnoj Gori. Rezultati koji će biti prezentovani u ovom radu daće veliki doprinos u razumijevanju ekologije predmetne vrste što je od neprocjenjive važnosti, a najviše zbog činjenice da parazit roda *Anisakis* (usljed nedovoljno termički obrađene ribe) izaziva bolest anisakijazu kod ljudi, koja može završiti i smrtnim ishodom.

Imajući u vidu sve gore navedeno predlažemo Vijeću Prirodno-matematičkog fakulteta da odobri izradu magistarske teze pod nazivom **“Učestalost i genetska struktura infektivne larve crva iz klase Nematoda, rod Anisakis, u odabranim komercijalno važnim ribljim vrstama akvatorijuma crnogorskog dijela Jadranskog mora”**.

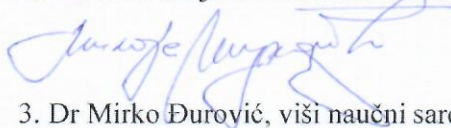
Podgorica, 27.5.2022. godine

KOMISIJA:

1. Prof dr Dragana Milošević Malidžan vanr. profesor PMF-a, mentor



2. Doc dr Miloje Šundić docent PMF-a, član



3. Dr Mirko Đurović, viši naučni saradnik u Institutu za biologiju mora, Kotor

