

Na osnovu Odluke Vijeća Medicinskog fakulteta o formiranju Komisije za doktorske studije, broj: 392/7 od 21.02.2019. godine a u skladu sa tačkom 3.5 Vodiča za doktorske studije UCG-Centar za doktorske studije, nakon razmatranja ispunjavanja uslova za prijavu teme doktorske disertacije i poštujući princip kopetentnosti, Komisija za doktorske studije dostavlja Vijeću Medicinskog fakulteta

INICIJALNI PRIJEDLOG
sastava Komisije za ocjenu prijave doktorske disertacije

1. Kandidat: dr med Miljana Anđelić

2. Tema istraživanja : «Uticaj maternalnih polimorfizama gena folatnog metabolizma na pojavu hromozomskih aneuploidija kod potomstva»

3. Komisija za ocjenu podobnosti doktorske teze i kandidata:

- Prof. dr Aleksandra Vuksanović Božarić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore - predsjednik
- Prof. dr Olivera Miljanović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore (mentor)
- Prof. dr Vesna Miranović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore

MEDICINSKI FAKULTET
Komisija za doktorske studije



PRIJAVA TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	dr Miljana Anđelić
Fakultet	Medicinski fakultet, Podgorica
Studijski program	Medicina
Broj indeksa	7/2016
Ime i prezime roditelja	Mihailo Anđelić
Datum i mjesto rođenja	02.07.1991. Pljevlja, Crna Gora
Adresa prebivališta	Piperska bb, Podgorica
Telefon	067/854-382
E-mail	miljana.andjelic@kccg.me , miljana.andjelic@gmail.com
BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA	
Obrazovanje	2016/2017 i dalje: doktorand - akademske doktorske studije, studijski program medicina, Medicinski fakultet, Univerzitet Crne Gore. - Sept 2010 - Maj 2016: doktor medicine - Medicinski fakultet, opšti smjer, Podgorica, Univerzitet Crne Gore, ocjena „B“ (9,08) 2006 – 2010: SMS „17. Septembar“ Žabljak, Luča I
Radno iskustvo	- Oktobar 2018 – i dalje: specijalizant pedijatrije za potrebe Centra za medicinsku genetiku i imunologiju, Klinički Centar Crne Gore - Avgust 2017 – Oktobar 2018: klinički ljekar u Centru za medicinsku genetiku i imunologiju, Klinički Centar Crne Gore 2017/2018, 2018/2019, 2019/2020: saradnik u nastavi na Medicinskom fakultetu u Podgorici, katedra fiziologije, Univerzitet Crne Gore - Jun 2016 – Mart 2017: Volonterski pripravnički radni staž u Domu zdravlja u Podgorici
Popis radova	- Nizak rast kod djevojčica kao indikator za otkrivanje Tarnerovog sindroma. Anđelić M, Jovanović J, Teofilov S, Bulatović M, Ostojić T, Miljanović O. Centar za medicinsku genetiku i imunologiju – Klinički centar Crne Gore. Drugi kongres preventivne pedijatrije Crne Gore sa međunarodnim učešćem, november 2018. - Put od prenatalnog cističnog higroma do rijetke metaboličke bolesti - prikaz pacijenta sa Sy Zellweger. Jovanovic J¹, Maver A², Hodžić A², Peterlin B², Anđelić M¹, Miljanovic O.¹ Centar za medicinsku genetiku i imunologiju, Klinički centar Crne Gore, ²Klinični inštitut za medicinsko genetiko, Univerzitetni

	klinični centar Ljubljana. Drugi kongres preventivne pedijatrije Crne Gore sa međunarodnim učešćem, november 2018. 3. Značaj hromozomskih aberacija u etiologiji ponavljanih spontanih pobačaja. Rolović Nešković R, Anđelić M, Jovanović J, Teofilov S, Ostojić T, Bulatović M, Miljanović O. Centar za medicinsku genetiku i imunologiju – Klinički centar Crne Gore. Drugi kongres preventivne pedijatrije Crne Gore sa međunarodnim učešćem, november 2018.
NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Na službenom jeziku	„Uticaj maternalnih polimorfizma gena folatnog metabolizma na pojavu hromozomskih aneuploidija kod potomstva“
Na engleskom jeziku	“Influence of maternal folate metabolism gene polymorphisms on the occurrence of chromosomal aneuploidies in offspring“
Obrazloženje teme	
Hromozomske aberacije (HA) su poremećaji broja ili strukture hromozoma i od velikog su medicinskog i društvenog značaja jer predstavljaju vodeću grupu uzočnika fetalne smrtnosti, dječijeg morbiditeta i dugotrajnog hendikepa u zemljama sa dobro razvijenom zdravstvenom zaštitom. Hromozomske aneuploidije, koje karakteriše poremećaj u broju hromozoma, čine preko 80% svih HA, a nastaju kao posljedica slučajne nepravilne segregacije hromozoma u gametogenezi. Iako se zna da rizik od hromozomskih aneuploidija raste sa životnom dobi majki, molekularni i celularni mehanizmi hromozomskog nerazdvajanja i dalje nijesu razjašnjeni ^{1,2}. Koliki je značaj ispitivanja mehanizma nerazdvajanja i mogućnosti prevencije aneuploidija upućuje činjenica da je najmanje 5% svih humanih koncepcija aneuploidno (Hassold, 2007; Hassold, Hunt, 2001), dok studije humanih gameta sugerišu da je stvarni procenat mnogo veći, čak 20-25%. Učestalost aneuploidija među živorođenom djecom je 0,3% i približno 4% među mrtvorodenom ^{1,2,3,4}. Najčešća aneuploidija i najčešći genetski razlog intelektualne nedovoljnosti je Down-ov sindrom (DS), sa učestalošću od 1:150 koncepcija, koje se u 80% završe ranim spontanim pobačajem (Zintzaras, 2011). U 90 - 95% nerazdvajanje hromozoma je majčinog porijekla i u 80% dešava se tokom mejoze I, u oociti koja sazrijeva prije začeća. Jedini do sada jasno prepoznat faktor rizika povezan sa DS jeste starija životna dob majke u trenutku začeća ^{5,6,7,8}. Mada imaju isti mehanizam nastanka i klinički značaj, ostale vijabilne hromozomske aneuploidije, autozomske trizomije 13 i 18, kao gonozomske trizomije i monozomija X hromozoma, značajno se rjeđe susrijeću u populaciji novorođenčadi i fetusa. U potrazi za uzrocima nepravilne segregacije hromozoma i njihove nestabilnosti James sa saradnicima je još 1999. godine, a potom i Hobbs 2000. godine, pretpostavio da poremećeni obrasci metilacije DNK, koji nastaju kao posljedica abnormalnog metabolizma folata, usljed polimorfizama gena koji kodiraju enzime ovog metaboličkog puta, mogu dovesti do poremećene metilacije centromernih i pericentromernih regiona i time predstavljati faktor rizika majki za rađanje djece sa aneuploidijama ^{8,9,13,14,15}. Folati igraju značajnu ulogu kao kofaktori enzimima uključenim u proces biosinteze DNK i RNK. Metabolizam folata je značajan za dva glavna fiziološka procesa: sintezu purina i pirimidina i proces metilacije kroz metioninski ciklus. Oba puta su regulisana sa dvije reakcije: jedna je remetilacija homocisteina u metionin, koji je prekursor S-adenozilmetionina, najvažnijeg donora metil grupe za procese metilacije nukleinskih kiselina, proteina i lipida, a drugi je put transsulfuracije, u kom se stvara cistein i glutation, a uklanjanje homocistein iz ciklusa ^{8,10,11,12}.	

Predloženim doktorskim istraživanjem ispitiće se povezanost polimorfizama pojedinačnih nukleotida (SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms) u određenim genima folatnog metaboličkog puta odgovornih za izmijenjeni obrazac metilacije DNK kod majki/trudnica čija djeca/fetusi imaju hromozomske aneuploidije, zbog pokazanog uticaja ovih gena na maturaciju oocite, nestabilnost hromozoma i rizik za nerazdvajanje hromozoma u mejozi (Moustafa, 2015; Copeide, 2015; Balarin, 2017; Scala, 2006; O Leary, 2002; Boquett, 2013).

Predloženo doktorsko istraživanje predstavlja sastavni dio bilateralnog projekta Slovenija – Crna Gora „Genetička epidemiologija kongenitalnih anomalija u Sloveniji i Crnoj Gori“ (rukovodioci prof. dr Olivera Miljanović, Crna Gora, prof. dr Borut Peterlin, Slovenija), odobrenog za finansiranje od Ministarstva nauke Crne Gore i Slovenije za period 2021 – 2022. godine (<https://www.mna.gov.me/vijesti/235203/Crna-Gora-i-Slovenija-u-2021-2022-godini-finansirace-30-zajednickih-naucnoistrazivackih-projekata.html>). Doktorsko istraživanje takođe predstavlja nastavak nacionalnog naučno-istraživačkog projekta na temu istraživanja kongenitalnih malformacija, finansiranog od Ministarstva nauke Crne Gore (2012 – 2016. godina; akronim: HPVGM, rukovodilac prof. dr Olivera Miljanović, nosilac Klinički centar Crne Gore), tokom kog je prospektivno formirana baza podataka o kongenitalnim anomalijama i HA, zajedno sa formiranjem biobanke DNK uzoraka pacijenata i njihovih roditelja u Centru za medicinsku genetiku i imunologiju.

Doktorsko istraživanje se planira kao transversalno-prospektivna studija, u kojoj će se koristiti podaci i uzorci iz baze podataka i biobanke DNK, koji su formirani u okviru prethodno navedenih istraživačkih projekata.

Pregled istraživanja

Iako originalna James-ova hipoteza nije još uvijek dokazana, in vitro studije su otkrile da ćelije usljed nedostatka folata povećavaju stopu aneuploidija hromozoma 21 (Lengauer, 1997; Wang, 2004; Beetstra, 2005), a nedavni dokazi sugerišu da poremećaj metilacije DNK u nivou pericentromernih regiona hromozoma 21 može biti odgovoran za greške rekombinacije i nerazdvajanje hromozoma tokom mejoze (Oliver, 2014).

Metilacija DNK igra ključnu ulogu u ekspresiji gena i diferencijaciji ćelija. Dokazano je da polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (SNPs) MTHFR gena uzrokuju smanjenje aktivnosti ovog enzima, što dovodi do povećane potrebe za folnom kiselinom i rezultira povećanim nivoom homocisteina i hipometilacijom nukleinskih kiselina^{8,10,11,12,15}. Najčešći polimorfizam u genu za MTHFR - 677C> T (rs1801133), do danas je istražen u više od 30 studija kao potencijalni faktor maternalnog rizika za rađanje djece sa DS, ali sa dobijanjem oprečnih rezultata. Meta-analize koje su ispitivale drugi polimorfizam u genu za MTHFR otkrile su da MTHFR 1298A>C (rs1801131) polimorfizam nije nezavistan faktor rizika za DS. Međutim, nekoliko studija otkrilo je da prisustvo oba polimorfizma u genu za MTHFR povećava maternalni rizik za rađanje djeteta sa DS, više od pojedinačnog prisustva MTHFR 677C>T (Grillo, 2002; Acacio, 2005; Scala, 2006; Brandalize, 2009; Zampieri, 2012).

Drugi značajan polimorfizam u metaboličkom putu folne kiseline je MTRR 66A>G (rs1801394), povezuje se sa rizikom majke za rađanje djece sa DS (Hobbs, 2000). Naknadni istraživački radovi dali su oprečne rezultate, ali počev od meta-analize koju su 2009. sproveli Medica i saradnici svaka sljedeća meta analiza potvrdila je povezanost ovog polimorfizma sa rizikom za DS.

Bosco sa saradnicima, 2003. godine je ispitivao polimorfizam MTR 2756A> G (rs 1805087) kao faktor rizika za DS, ali nedavne meta analize potvrdile su da polimorfizam MTR 2756A> G nije nezavisan faktor rizika majki za potomstvo sa DS (Yang, 2013; Coppede, 2013a; Balduino Victorino, 2014).

Brojni autori ističu povezanost kombinovanih polimorfizama u MTHFR i MTRR ili MTRR i MTR genu sa rizikom majke da rodi dijete sa DS (Hobbs, 2000; Bosco, 2003; Wang, 2008; Coppede, 2009, 2014; Brandalize, 2010; Liao, 2010). Grupa istraživača iz Brazila (Biselli, 2008) došla je do zaključka da prisustvo tri ili više polimorfnih alela *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G i *RFC1* A80G, kao i koncentracija homocisteina preko 4,99 $\mu\text{mol/l}$ predstavljaju maternalni rizik za rađanje djece sa DS ¹⁶.

Coppede sa saradnicima je 2006. godine u svojoj studiji utvrdio da postoji granično povećan rizik za rađanje djece sa DS, ukoliko su majke nosioci kombinovanog genotipa *RFC1* 80GG/*MTHFR* 677TT, a da je redukovani rizik ako su nosioci *RFC1* 80(AA or AG)/*MTHFR* 1298AA genotipa. Međutim dvije meta analize koje su objavili Yang, 2013. i Coppede, 2013. sugerišu da bi polimorfizam *RFC1* 80G>A mogao predstavljati nezavisan maternalni faktor rizika za aneuploidije ^{7,15,17}.

Meta analiza grupe istraživača iz Slovenije (Medica, Maver, Augusto, Peterlin, 2009) pokazala je da žene nosioci T alela polimorfizma *MTHFR* C677T imaju 35-40% veći rizik za rađanje djece sa DS. Žene nosioci G alela polimorfizma *MTRR* A66G imaju 57% veći rizik za rađanje djece sa DS. Rezultati su ukazali da nosioci polimorfizama *MTHFR* A1298C i *RFC1* A80G imaju povećan rizik, ali rezultat nije uspio da dostigne statističku značajnost ¹⁰.

Meta analiza koju su objavili Yang i saradnici 2013. godine, obuhvatila je 157 objavljenih radova, pokazala je majke nosioci genskog polimorfizma *MTHFR* C677T imaju 35% veću vjerovatnoću za rađanjem djeteta sa DS u odnosu na zdravu majku iz kontrolne grupe. Za majke nosioce genskog polimorfizma *MTRR* A66G ta vjerovatnoća je veća za 31%, a za *RFC1* A80G rizik od rađanja djeteta sa DS iznosi 18% ⁷.

Pregledom objavljenih radova uočava se da je većina istraživanja i meta analiza fokusirana na najučestaliju aneuploidiju: trizomiju 21. Do sada je objavljen mali broj radova na temu povezanosti Turnerovog sindroma (TS) sa genskim polimorfizmima. Najviše su ispitivani polimorfizmi *MTHFR* 677T i A1298C, ali sa dobijanjem oprečnih rezultata (Santos, 2006; Oliveira, 2008; Ismail, 2015) ^{18,19,20}. Ispitivanje povezanosti ostalih vijabilnih aneuploidija (trizomija 13 i 18 i gonozomskih trizomija) nije dostupno u postojećoj literaturi.

Scala sa saradnicima je 2006. godine, u svom istraživanju otkrio da *MTHFD1* 1958G>A polimorfizam (rs2236225) u kombinaciji sa *RFC1* 80G>A polimorfizmom (kombinovani *MTHFD1* 1958AA / *RFC1* 80GG genotip) predstavlja faktor rizika za DS ²¹. Naknadne studije su dale oprečne rezultate (Zampieri, 2012; b; Liao, 2014; Izci Ay, 2015), ali je ovaj polimorfizam i dalje kandidat koji će se istražiti u budućim studijama.

U istraživanjima koje su sproveli Coppede, 2013. i Jaiswal, 2015. godine, sugerisano je da bi kombinovani genotip *DNMT3B* -579GT / -149CC mogao biti povezan sa rizikom majki za rađanje djece sa DS, međutim podaci su još uvijek preliminarni i treba da budu potvrđeni u narednim studijama ^{22,23}.

Studije koje su ispitivale polimorfizam *BHMT* 742G>A (Zampieri, 2012; Amorim, 2013) došle su do zaključka da nosioci ovog polimorfizma mogu imati smanjen rizik za DS, što čini ovaj gen značajnim kandidatom za buduća istraživanja^{24,25}.

U dosadašnjim istraživanjima u Crnoj Gori, pokazano je da HA imaju značajan udio u morbiditetu, susrijeću se kod više od 3% rizične novorođenčadi i kod preko 16% novorođenčadi sa kongenitalnim anomalijama. Najveća smrtnost uočava se u grupi novorođenčadi sa HA (18%), dok je kod novorođenčadi sa kongenitalnim anomalijama, mortalitet bio posljedica hromozomskih bolesti kod 22%. Aneuploidije predstavljaju vodeće HA kod rizičnih novorođenčadi, a među njima prednjači DS (86%) i direktno su povezane sa uznapređovalom životnom dobi majke. Ispitivanje SNPs u genima za hereditarne trombofilije kod žena sa nepovoljnim ishodom trudnoća u Crnoj Gori pokazalo je povezanost polimorfizma 677C>T u *MTHFR* genu sa prisustvom kongenitalnih anomalija i hromozomskih aneuploidija kod njihovih fetusa (Miljanović, 2013)^{26,27,28}.

Cilj i hipoteze

Zadatak doktorskog istraživanja je da ispita na koji način alterirani folatni metabolizam, uzrokovan prisustvom polimorfizama na nivou jednog nukleotida (SNPs) u genima folatnog metabolizma, utiče na nepravilnu segregaciju hromozoma u gametogenezi.

Ciljevi istraživanja:

Cilj 1: Utvrditi frekvenciju alela i genotipova u okviru polimorfizama u odabranim genima folatnog metabolizma (*MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *RFC1*, *MTHFD1*, *DNMT3B*, *BHMT*) u grupi ispitanica čija su djeca/fetusi imali hromozomske aneuploidije i u kontrolnoj grupi.

Cilj 2: Utvrditi da li postoji povezanost pojedinačnih polimorfizama u ispitivanim genima kod ispitanica sa pojavom hromozomskih aneuploidija kod njihove djece/fetusa.

Cilj 3: Utvrditi da li postoji povezanost interakcije više genskih polimorfizama u ispitivanim genima kod ispitanica sa pojavom hromozomskih aneuploidija kod njihove djece/fetusa.

Cilj 4: Pretpostaviti genetičke mehanizme u etiologiji hromozomskih aneuploidija na osnovu potencijalno otkrivenih asocijacija između ispitivanih genskih polimorfizama i nepravilne segregacije hromozoma u oociti.

Cilj 5: Koncipirati plan prekonceptijskih preventivnih mjera u cilju smanjenja rizika za nastanak koncepcija sa aneuploidijama.

Na osnovu navedenih ciljeva, postavljene su sljedeće hipoteze:

H01: Pojedini polimorfizmi u genima folatnog metabolizma učestalije se javljaju u studijskoj grupi ispitanica, čija djeca/fetusi imaju hromozomske aneuploidije nego u kontrolnoj grupi žena.

H02: Pojedinačno i/ili zajedničko djelovanje polimorfizama u genima folatnog metabolizma kod žena modifikuje segregaciju hromozoma u mejozi oocite i utiče na nastajanje hromozomskih aneuploidija kod njihovih potomaka.

Materijali, metode i plan istraživanja**Dizajn istraživanja**

Istraživanje je dizajnirano kao transversalno-prospektivna studija, u kojoj će se ispitivati povezanost polimorfizama u genima folatnog metabolizma žena kod čije je djece/fetusa utvrđeno prisustvo hromozomskih aneuploidija.

U istraživanju će se koristiti baza podataka i biobanka DNK Centra za medicinsku genetiku i imunologiju, koje su prospektivno formirane u okviru prethodnog nacionalnog naučno-istraživačkog projekta, navedenog u obrazloženju teme. Prospektivno prikupljanje podataka i uzoraka DNK nastavlja se i tokom 2021. godine u okviru bilateralnog projekta navedenog u obrazloženju doktorske teme.

Istraživanje će biti sprovedeno u saradnji sa Centrom za medicinsku genetiku i imunologiju Kliničkog centra Crne Gore i Centrom za naučno-istraživački rad Medicinskog fakulteta UCG.

Genetička istraživanja spadaju u posebno osjetljive istraživačke aktivnosti i zahtijevaju striktno postupanje u skladu sa aktuelnim etičkim principima. Iz navedenih razloga istraživački tim Centra za medicinsku genetiku i imunologiju Kliničkog centra Crne Gore, na čelu sa prof. dr Oliverom Miljanović već posjeduje saglasnost Etičkog komiteta Kliničkog centra Crne Gore za prospektivno prikupljanje podataka i formiranje biobanke DNK uzoraka u svrhu ispitivanja molekularnih mehanizama kongenitalnih anomalija i genomskih poremećaja, uključujući i odobreni informisani pristanak ispitanika (djel. br. 03/01-11944/1).

Kompletno istraživanje će se sprovoditi u skladu sa aktuelnim etičkim načelima, crnogorskom zakonskom regulativom (posebno Zakonom o zaštiti genetičkih podataka), Helsinškom deklaracijom 1964. i Konvencijom o ljudskim pravima i biomedicini i njenim dodatnim protokolima (Oviedo konvencija). Za sve ispitanice iz biobanke DNK uzoraka, postoji potpisan informisani pristanak, koji će biti pribavljen i od prospektivno uključenih ispitanica.

Ispitanici

U istraživanje će biti uključeno oko 300 - 350 žena u okviru studijske i kontrolne grupe.

Studijska grupa će obuhvatiti oko 150 – 200 žena čija su djeca/fetusi imali postnatalno ili prenatalno utvrđene hromozomske aneuploidije. Za utvrđivanje aneuploidija kod djece/fetusa koristi se konvencionalna citogenetička metodologija - kariotip, koja se sprovodi u Centru za medicinsku genetiku i imunologiju Kliničkog centra Crne Gore.

Kontrolna grupa ispitanica sastojće se od oko 150 žena koje nijesu imale nepovoljnih ishoda trudnoća (spontani pobačaj, infertilitet, kasna fetalna ili neonatalna smrt), niti djecu/fetuse sa hromozomskim aneuploidijama i imaju najmanje jednu uspješno ostvarenu trudnoću.

Metodologija istraživanja**Uzorkovanje i izolacija genomske DNK:**

Kao uzorak za molekularno-genetičke analize korišće se periferna krv majki/trudnica. Svi uzorci su obilježeni tako da garantuju anonimnost ispitanica i da identitet ispitanica ostane u potpunosti zaštićen. Izolacija DNK iz uzorka periferne krvi će se sprovesti u skladu sa aktuelnim molekularno-genetičkim protokolima. Deoksiribonukleinska kiselina je izolovana iz periferne krvi sakupljene u epruvetama od 4,5 ml sa Na-citratom i ekstrahovana komercijalnim

testom QIA amp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Nemačka). Ekstrahovana DNK je rastvorena u 200 ml pufera AE i čuvana na -20 ° C.

Detekcija polimorfizama u genima folatnog metabolizma:

Istraživanjem je predviđeno određivanje 9 polimorfizama u 7 gena uključenih u folatni metabolizam:

1. MTHFR C677T (rs1801133),
2. MTHFR A1298C (rs1801131),
3. MTR A2756G (rs1805087),
4. MTRR A66G (rs 1801394),
5. RFC1 G80A (rs 1051266),
6. MTHFD1 G1958A (rs 2236225),
7. DNMT3B -G579T (rs 1569686),
8. DNMT3B -C149T (rs 2424913),
9. BHMT G742A (rs 3733890).

Dva polimorfizma nukleotidne sekvence (SNPs) u MTHFR genu (C677T - rs1801133 i A1298C - rs1801131), biće određivani lančanom reakcijom polimeraze specifičnom za alel (PCR). PCR će biti izveden u cikličnom termostatu (Mastercycler gradient Eppendorf) korišćenjem temperaturnog režima: početno aktiviranje (15 min 95 ° C), 5 ciklusa (1 min 94 ° C; 1 min 63 ° C; 1 min 72 ° C), 30 ciklusa (30 s 94 ° C; 30 s 63 ° C, 30 s 72 ° C), finalna elongaciona sinteza (2 min 72 ° C). Amplifikacija DNK uzoraka će biti analizirana nakon elektroforeze (2,5% agarozni gel, obojen etidijum bromidom) i vizualizovana na Ultra Violet (UV) transiluminatoru.

SNPs gena MTR A2756G (rs1805087), MTRR A66G (rs 1801394), RFC1 G80A (rs 1051266), MTHFD1 G1958A (rs 2236225), DNMT3B G579T (rs 1569686) i C149T (rs 2424913), BHMT G742A, (rs 3733890) određivaće se esejom alelske diskriminacije upotrebom "predesigned genotyping SNP" eseja. Diskriminacija genotipova ispitivanih gena radiće se na Applied Biosystems 7500 Real-Time aparatu. Uz navedene eseje koristiće se TaqMan Universal Master Mix, a dobijeni rezultati će se obrađivati uz pomoć Primer-Express^R softvera.

Statistička analiza biće izvršena pomoću Microsoft Excel i softverskog programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Deskriptivna statistika će biti korišćena za demografske karakteristike. Učestalost homozigotnih i heterozigotnih polimorfizama za svaki ispitivani gen, kao i razlike u frekvencama polimorfizama gena kandidata između majki djece/fetusa sa aneuploidijama i kontrolne grupe majki biće određena pomoću hi-kvadratnog testa (χ^2 test). Određivanje frekvence genotipova i alela biće izračunato pod pretpostavkom Hardy-Weinberg ravnoteže. Odnos vjerovatnoće (OR - odds ratio) sa odgovarajućim intervalom povjerenja (CI- Confidence Interval) od 95% biće korišćen da predstavlja vezu između SNPs i rizika od rađanja djece sa aneuploidijama. Vrijednosti p manje od 0,05 smatraće se statistički značajnim.

Podaci će biti prikazani tekstualno, tabelarno i grafički, uz korišćenje MS Excel.

Plan istraživanja za ukupni period istraživanja (prema prihvaćenom gantogramu aktivnosti doktoranda za period od IX 2017. do IX 2023. godine):

Prikupljanje uzoraka za genetičke analize:

- Prospektivno prikupljanje uzoraka krvi ispitanica čija djeca/fetusi imaju utvrđene aneuploidije i izolacija DNK će se nastaviti i tokom 2021. godine

- Prospektivno prikupljanje uzoraka krvi i izolacija DNK ispitanica kontrole grupe će se nastaviti i tokom 2021. godine
- Odabir prikupljenih uzoraka DNK ispitanica čija djeca/fetusi imaju utvrđene aneuploidije iz postojeće baze DNK uskladištene u Centru za medicinsku genetiku i imunologiju Kliničkog centra Crne Gore zaključno sa decembrom 2020. godine.

Genetičke analize:

Ispitivanje polimorfizama u genima kandidatima:

- Priprema metodologije i protokola istraživanja polimorfizma gena kandidata – karakterizacija polimorfizama i odabir gena kandidata
- Ispitivanje polimorfizama u odabranim genima za navedene grupe ispitanika
- Procjena povezanosti ispitivanih polimorfizama gena kandidata sa molekularnim mehanizmima nastanka aneuploidija.

Publikacije i doktorat

- Priprema rukopisa i objavljivanje rezultata istraživanja u indeksiranim časopisima
- Priprema i odbrana doktorske teze

Ostale aktivnosti:

Diseminacija rezultata istraživanja i translacija znanja kroz učešće na naučnim predavanjima.

Očekivani naučni doprinos

Uzimajući u obzir značajan udio hromozomskih aneuploidija u obolijevanju, smrtnosti i invaliditetu djece u Crnoj Gori, kao i činjenicu da je dojenački mortalitet u Crnoj Gori približno na nivou razvijenih zemalja (3,4 promila u 2016. godini), istraživanje molekularnih mehanizama nastanka hromozomskih aneuploidija, neophodan je preduslov za objektivnu identifikaciju i procjenu značaja genomskih faktora povezanih sa nastankom aneuploidija, planiranje i sprovođenje antekonceptijske prevencije aneuploidija, kao i smanjenju troškova za liječenje i rehabilitaciju djece sa aneuploidijama u Crnoj Gori.

Meta analize studija o povezanosti SNPs sa nastankom aneuploidija ukazuju na raznovrsnost i često kontroverznost rezultata i značajne populacijske varijacije, stoga predviđamo da ćemo realizacijom ove doktorske disertacije procijeniti moguću asocijaciju između pojedinih hromozomskih aneuploidija i polimorfizama u genima kandidatima uključenih u folatni metabolizam, u populaciji Crne Gore, čime ćemo doprinijeti saznanjima o mogućim mehanizama nerazdvajanja hromozoma. Uspješna realizacija doktorskog istraživanja unaprijediće crnogorske istraživačke kapacitete u cilju što većeg učešća u evropskim istraživačkim programima usmjerenih na unapređenje kvaliteta zdravlja i života od samog njegovog početka.

Predviđena je promocija rezultata doktorske disertacije kroz objavljivanje radova u međunarodnim i nacionalnim naučnim časopisima, prezentacija rezultata rada naučno-istraživačkoj zajednici Crne Gore, doprinos proširenju biobanke DNK majki djece/fetusa Centra za medicinsku genetiku i imunologiju Kliničkog centra Crne Gore, multidisciplinarnan pristup izučavanja molekularnih mehanizama u nastanku hromozomskih aneuploidija kroz saradnju sa Centrom za medicinsku genetiku i imunologiju KC CG i Centrom za naučno-istraživački rad Medicinskog fakulteta UCG.

Spisak objavljenih radova kandidata

1. Nizak rast kod djevojčica kao indikator za otkrivanje Turnerovog sindroma. Anđelić M, Jovanović J, Teofilov S, Bulatović M, Ostojić T, Miljanović O.

- Centar za medicinsku genetiku i imunologiju – Klinički centar Crne Gore. Drugi kongres preventivne pedijatrije Crne Gore sa međunarodnim učešćem, november 2018.
2. Put od prenatalnog cističnog higroma do rijetke metaboličke bolesti - prikaz pacijenta sa Sy Zellweger. Jovanovic J¹, Maver A², Hodžić A², Peterlin B², Anđelić M¹, Miljanović O.¹ Centar za medicinsku genetiku i imunologiju, Klinički centar Crne Gore, ²Klinični inštitut za medicinsku genetiku, Univerzitetni klinični centar Ljubljana. Drugi kongres preventivne pedijatrije Crne Gore sa međunarodnim učešćem, november 2018.
 3. Značaj hromozomskih aberacija u etiologiji ponavljanih spontanih pobačaja. Rolović Nešković R, Anđelić M, Jovanović J, Teofilov S, Ostojić T, Bulatović M, Miljanović O. Centar za medicinsku genetiku i imunologiju – Klinički centar Crne Gore. Drugi kongres preventivne pedijatrije Crne Gore sa međunarodnim učešćem, november 2018.

Popis literature

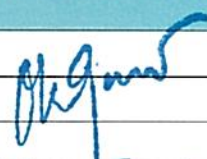
1. Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, Saker D, Shen J, Zaragoza M. **Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology.** Environ Mol Mutagen. 1996;28(3):167-75. doi: 10.1002/(SICI)1098-2280(1996)28:3<167::AID-EM2>3.0.CO;2-B. PMID: 8908177.
2. Griffin DK. **The incidence, origin, and etiology of aneuploidy.** Int Rev Cytol. 1996;167:263-96. doi: 10.1016/s0074-7696(08)61349-2. PMID: 8768496.
3. Hassold TJ, Burrage LC, Chan ER, Judis LM, Schwartz S, James SJ, Jacobs PA, Thomas NS. **Maternal folate polymorphisms and the etiology of human nondisjunction.** Am J Hum Genet. 2001 Aug;69(2):434-9. doi: 10.1086/321971. Epub 2001 Jul 5. PMID: 11443546; PMCID: PMC1235315.
4. Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Jaroudi S, Sarasa J, Enciso M, Wells D. **The origin and impact of embryonic aneuploidy.** Hum Genet. 2013 Sep;132(9):1001-13. doi: 10.1007/s00439-013-1309-0. Epub 2013 Apr 26. PMID: 23620267.
5. Allen EG, Freeman SB, Druschel C, Hobbs CA, O'Leary LA, Romitti PA, Royle MH, Torfs CP, Sherman SL. **Maternal age and risk for trisomy 21 assessed by the origin of chromosome nondisjunction: a report from the Atlanta and National Down Syndrome Projects.** Hum Genet. 2009 Feb;125(1):41-52. doi: 10.1007/s00439-008-0603-8. Epub 2008 Dec 3. PMID: 19050929; PMCID: PMC2833410.
6. Eskes TK. **Abnormal folate metabolism in mothers with Down syndrome offspring: review of the literature.** Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2006 Feb 1;124(2):130-3. doi: 10.1016/j.ejogrb.2005.07.028. Epub 2005 Oct 5. PMID: 16169148.
7. Yang M, Gong T, Lin X, Qi L, Guo Y, Cao Z, Shen M, Du Y. **Maternal gene polymorphisms involved in folate metabolism and the risk of having a Down syndrome offspring: a meta-analysis.** Mutagenesis. 2013 Nov;28(6):661-71. doi: 10.1093/mutage/get045. Epub 2013 Sep 25. PMID: 24068460.
8. Czechowicz P, Małodobra-Mazur M, Lebioda A, Jonkisz A, Dobosz T, Śmigiel R. **Polymorphisms of the MTHFR gene in mothers of children with trisomy 21 (Down syndrome) in a Polish population.** Adv Clin Exp Med. 2020 Feb;29(2):251-256. doi: 10.17219/acem/115078. PMID: 32073761.
9. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, Yi P, Tafoya DL, Swenson DH, Wilson VL, Gaylor DW. **Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome.** Am J Clin Nutr. 1999 Oct;70(4):495-501. doi: 10.1093/ajcn/70.4.495. PMID: 10500018.

10. Medica, I., Maver, A., Augusto, G.F. et al. **Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome — meta-analysis.** Cent Eur J Med 4, 395–408 (2009). <https://doi.org/10.2478/s11536-009-0055-0>
11. Balarin MAS, Cintra MTR, Cordeiro F, Naves L, da Silva-Grecco RL. **Screening of six polymorphisms related with folate metabolism in parents of individuals with Down syndrome.** J Matern Fetal Neonatal Med. 2017 Nov 27;1-7. doi: 10.1080/14767058.2017.1404565. Epub ahead of print. PMID: 29130768.
12. Kedar, R., Chandel, D. **MTHFR gene polymorphism and associated nutritional deficiency in the etiology and pathogenesis of Down syndrome.** Egypt J Med Hum Genet 20, 12 (2019). <https://doi.org/10.1186/s43042-019-0010-9>
13. Brandalize AP, Bandinelli E, Dos Santos PA, Schüler-Faccini L. **Maternal gene polymorphisms involved in folate metabolism as risk factors for Down syndrome offspring in Southern Brazil.** Dis Markers. 2010;29(2):95-101. doi: 10.3233/DMA-2010-0731. PMID: 21045269; PMCID: PMC3835528.
14. Bucerzan, S., Popp, R. A., Vlad, R. M., Lazea, C., Nicolaescu, R., & Grigorescu-Sido, P. **Evaluation of c677t and a1298c polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene as a maternal risk factor for trisomy 21 (a monocentric study).** Revista Romana de Medicina de Laborator. 2017; 25(1), 27-35. doi:10.1515/rrlm-2017-0003
15. Coppède F. **The genetics of folate metabolism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome and associated congenital heart defects.** Front Genet. 2015 Jun 25;6:223. doi: 10.3389/fgene.2015.00223. PMID: 26161087; PMCID: PMC4479818.
16. Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Zampieri BL, Haddad R, Eberlin MN, Pavarino-Bertelli EC. **Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and elevated plasma concentrations of homocysteine: maternal risk factors for Down syndrome in Brazil.** Genet Mol Res. 2008 Jan 22;7(1):33-42. doi: 10.4238/vol7-1gmr388. PMID: 18273817.
17. Coppède F, Lorenzoni V, Migliore L. **The reduced folate carrier (RFC-1) 80A>G polymorphism and maternal risk of having a child with Down syndrome: a meta-analysis.** Nutrients. 2013 Jul 5;5(7):2551-63. doi: 10.3390/nu5072551. PMID: 23857226; PMCID: PMC3738987.
18. Santos K, Lemos-Marini SH, Baptista MT, Bonadia LC, Pinto Júnior W, Bertuzzo CS. **Frequency of 677C → T and 1298A → C polymorphisms in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in Turner syndrome individuals.** Genet Mol Biol. 2006;29:41-44. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000100008>
19. Oliveira KC, Bianco B, Verreschi IT, Guedes AD, Galera BB, Galera MF, Barbosa CP, Lipay MV. **Prevalence of the polymorphism MTHFR A1298C and not MTHFR C677T is related to chromosomal aneuploidy in Brazilian Turner Syndrome patients.** Arq Bras Endocrinol Metabol. 2008 Nov;52(8):1374-81. doi: 10.1590/s0004-27302008000800028. Erratum in: Arq Bras Endocrinol Metabol. 2009 Feb;53(1):115. Bianco, Bianca Borsatto [corrected to Bianco, Borsatto]. PMID: 19169497.
20. Ismail MF, Zarouk WA, Ruby MO, Mahmoud WM, Gad RS. **Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in Egyptian Turner Syndrome patients.** Acta Biochim Pol. 2015;62(3):529-32. doi: 10.18388/abp.2015_974. Epub 2015 Jul 28. PMID: 26217949.
21. Scala I, Granese B, Sellitto M, Salomè S, Sammartino A, Pepe A, Mastroiacovo P, Sebastio G, Andria G. **Analysis of seven maternal polymorphisms of genes involved in**

- homocysteine/folate metabolism and risk of Down syndrome offspring. Genet Med. 2006 Jul;8(7):409-16. doi: 10.1097/01.gim.0000228206.21793.82. PMID: 16845273.
22. Jaiswal SK, Sukla KK, Kumari N, Lakhotia AR, Kumar A, Rai AK. **Maternal risk for down syndrome and polymorphisms in the promoter region of the DNMT3B gene: a case-control study.** Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2015 Apr;103(4):299-305. doi: 10.1002/bdra.23348. Epub 2015 Feb 6. PMID: 25656965.
23. Coppedè F, Bosco P, Tannorella P, Romano C, Antonucci I, Stuppia L, Romano C, Migliore L. **DNMT3B promoter polymorphisms and maternal risk of birth of a child with Down syndrome.** Hum Reprod. 2013 Feb;28(2):545-50. doi: 10.1093/humrep/des376. Epub 2012 Oct 18. PMID: 23081874.
24. Amorim MR, Moura CM, Gomes AD, Barboza HN, Lopes RB, Ribeiro MG, Costa Lima MA. **Betaine-homocysteine methyltransferase 742G>A polymorphism and risk of down syndrome offspring in a Brazilian population.** Mol Biol Rep. 2013 Aug;40(8):4685-9. doi: 10.1007/s11033-013-2563-x. Epub 2013 May 5. PMID: 23645037.
25. Zampieri BL, Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Pavarino EC. **BHMT G742A and MTHFD1 G1958A polymorphisms and Down syndrome risk in the Brazilian population.** Genet Test Mol Biomarkers. 2012 Jun;16(6):628-31. doi: 10.1089/gtmb.2011.0257. Epub 2012 Feb 17. PMID: 22339736.
26. Miljanović O, Dizdarević A, Đukić S, Teofiov S. **Novorođenčad sa Down sindromom u Crnoj Gori – osvrt na prepoznavanje faktora rizika i mogućnosti prevencije.** Medicinski zapisi 2004, 58: 11 – 19.
27. Miljanović O. **Značaj ispitivanja etiologije multifaktorskih bolesti: Model istraživanja polimorfizama gena.** Medicinski zapisi 2011, 60 (2): 13 – 26. ISSN 0419-7747.
28. Miljanovic O, Dakić T, Teofilova S, Vojvodić D, Magic Z, and Likic D (2013). **The FII 2021G→A, FV Laiden and MTHFR 677C→T polymorphisms and the risk of pregnancy loss, fetal malformations and chromosomal abnormalities.** MD-Medical Data 2013; 5(3): 223-229

SAGLASNOST PREDLOŽENOG/IH MENTORA I DOKTORANDA SA PRIJAVOM

Odgovorno potvrđujem da sam saglasan sa temom koja se prijavljuje.

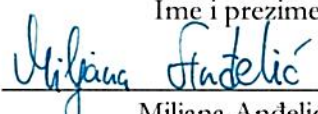
Prvi mentor	prof. dr Olivera Miljanović	(Potpis) 
Drugi mentor	/	/
Doktorand	dr Miljana Anđelić	(Potpis) 

IZJAVA

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

U Podgorici, 21. april 2021.

Ime i prezime doktoranda


Miljana Anđelić

UNIVERZITET CRNE GORE MEDICINSKI FAKULTET			
31.12.2019			
Objekat	Broj	Priloge	Vrijednost
med	1230/3		

Na osnovu člana 32 stav 1 tačka 14 Statuta Univerziteta Crne Gore, u vezi sa članom 29 Pravila doktorskih studija, Senat Univerziteta Crne Gore, u postupku razmatranja prijedloga Vijeća Medicinskog fakulteta i na prijedlog Centra za doktorske studije, na sjednici održanoj 24.12.2019. godine, donio je sljedeću

ODLUKU

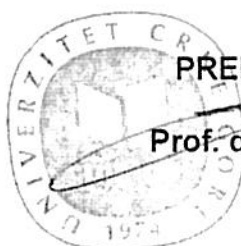
I

Dr Olivera Miljanović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore imenuje se za mentora pri izradi doktorske disertacije **kandidatkinje Miljane Anđelić**.

II

Odluka stupa na snagu danom donošenja.

Broj: 03- 3987/2
Podgorica, 24.12.2019. godine



PREDSJEDNIK SENATA

Prof. dr Danilo Nikolić, rektor