

**NASTAVNO NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 30.07.2023. godine, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Analiza ekspresije gena koji kodiraju sintezu enzima CYP3A4, CYP2B6,i ABCB1 transportera kod bolesnika sa HIV i HCV infekcijom lečenih antivirusnim lekovima “

kandidata dr Božane Obradović, zaposlene na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Mentor 1 je prof. dr Gordana Dragović Lukić, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Mentor 2 je prof. dr Ivana Milošević, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu,

Mentor 3 je prof. Andrew Owen, Institute of Systems, Molecular and Integrative Biology, University of Liverpool, UK.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Ljiljana Gojković Bukarica, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Ivana Novaković, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Nada Tomanović, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
4. Prof. dr Jovan Ranin, Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu
5. Prof. dr Saša Vukomirović, Medicinski fakultet, Univerziteta u Novom Sadu.

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Božane Obradović napisana je na ukupno 93 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i reference. U disertaciji se nalazi ukupno 41 tabela i 22 slike. Doktorska disertacija sadrži i sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** su opisane osnovne epidemiološke karakteristike, faktori rizika, klinička slika i terapijski protokoli dve hronične virusne infekcije, HIV i HCV infekcije. Opisani su takodje, klinički najvažniji, metabolički enzimi i transporteri koji igraju ulogu u procesima metabolisanja i eliminacije lekova koji se koriste u lečenju ovih virusnih infekcija. Detaljno

su opisane lokalizacija, karakteristike i značaj CYP3A4, CYP2B6 metaboličkih enzima i ABCB1 transportera sa pregledom grupa lekova koji su supstrati ovih enzima i transportera. Takođe, posebno poglavlje posvećeno je faktorima koji mogu uticati na aktivnost ovih metaboličkih enzima i transportera a posebno onih varijabli koje mogu dovesti do promena u ekspresiji gena CYP3A4, CYP2B6 i ABCB1 kao što su hronicitet infekcije, oštećenje tkiva jetre i gradus inflamacije kao i primena hronične terapije. Jasno je naglašeno da nema dovoljno podataka u literaturi o ekspresiji CYP3A4, CYP2B6 i ABCB1 u populaciji HIV i HCV inficiranih pacijenata kao i HIV/HCV ko-inficiranih pacijenata.

Ciljevi rada su precizno formulisani. Definisani su sledeći ciljevi: 1. Sprovesti analizu ekspresije gena koji kodiraju CYP3A4, CYP2B6 i ABCB1 transporter u kohorti pacijenata zaraženih HIV infekcijom, pacijenata zaraženih HCV infekcijom, i pacijenata zaraženih HIV/HCV ko-infekcijom; 2. Ispitati povezanost između stepena fibroze i nivoa (gradusa) inflamacije jetre sa potencijalnim promenama u ekspresiji gena koji kodiraju CYP3A4, CYP2B6 i ABCB1 transporter kod pacijenata zaraženih HIVinfekcijom, pacijenata zaraženih HCV infekcijom, i pacijenata zaraženih HIV/HCV ko-infekcijom; 3. ispitati potencijalni uticaj različitih terapijskih režima na ekspresiju gena koji kodiraju CYP3A4, CYP2B6 i ABCB1 transporter kod pacijenata zaraženih HIVinfekcijom, pacijenata zaraženih HCV infekcijom, i pacijenata zaraženih HIV/HCV ko-infekcijom; 4. Ispitati potencijalni uticaj različitih biohemijskih i inflamatornih faktora na ekspresiju gena koji kodiraju CYP3A4, CYP2B6 i ABCB1 transporter kod pacijenata zaraženih HIVinfekcijom, pacijenata zaraženih HCV infekcijom, i pacijenata zaraženih HIV/HCV ko-infekcijom.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da su u ovom istraživanju korišćeni uzorci jetre iz kohorte pacijenata koja je ispunila kriterijuma za biopsiju jetre a koji su pripadali grupi HIV monoinficiranih, HCV monoinficiranih i HIV/HCV ko-inficiranih pacijenata. U okviru ovih grupa pacijenata jasno su definisane podgrupe u odnosu na primenu ili izostanak primene terapijskih režima. Biopsija jetre radjena je na Klinici za infektivne i tropske bolesti „Dr Kosta Todorović“ UKCS. Jasno su definisani kriterijumi za uključivanje i isključivanje iz studije. Jasno je opisana priprema tkivnih uzoraka i imunohistohemijska analiza, kao i metode homogenizacije, ekstrakcije, prevodjenja u cDNK i qRT-PCR. Opisane su i metode statističke analize dobijenih podataka. Istraživanje je sprovedeno uz saglasnost Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (17/I-8 od 12.1.2023.).

U poglavlju **rezultati**, detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati. Ilustrovani su velikim brojem tabela i slika, a predstavljeni su i rezultati statističke analize podataka.

Diskusija je napisana jezgrovito, jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije. Jasno su interpretirani dobijeni rezultati i diskutovan je njihov značaj u kontekstu promene u ekspresiji gena CYP3A4, CYP2B6 enzima i ABCB1 transportera.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Direktno je korišćeno i citirano 87 referenci.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je vršena provera originalnosti doktorske disertacije „*Analysis of gene expression encoding enzymes*“

CYP3A4, CYP2B6, and ABCB1 transporter in patients with HIV and HCV infections treated with antiviral medications”, autora Božane Obradović, utvrđeno podudaranje teksta iznosi 25%. U doktorskoj disertaciji je uradjena analiza aktivnosti metaboličkih enzima i transportera u kontekstu uticaja na efikasnost lekova koji se koriste u lečenju HIV i HCV infekcija. U okviru teorijskog obrazloženja istraživanja, bilo je potrebno navesti specifične terapijske protokole koji su primenjeni u klasičnim pristupima lečenja. Ispravno su navedeni originalni izvori i reference za svaki od tih protokola. Istovremeno, radi preciznosti i jasnoće, bilo je neophodno korišćenje naziva grupa lekova, kao i generičkih imena pojedinačnih lekova, koji su predstavljeni ili u tabelama ili navedeni u različitim delovima teksta. Ovaj stepen podudarnosti takodje je posledica navodjenja tzv. opštih mesta i termina kao što su “ekspresija metaboličkih enzima i transportera” kao i ličnih imenica, naziva samih metaboličkih enzima i transportera na kojima je vršena analiza (*CYP3A4, CYP2B6* i *ABCB1/P-gp*), što je u skladu sa članom 9. Pravilnika. Takodje, ovaj stepen podudarnosti delom je i posledica stepena sličnosti široko publikovanih metodoloških procedura u istraživanjima iz oblasti farmakogenomike kao što su postupci homogenizacije tkiva, ekstrakcije i izvodjenja RT-qPCR protokola, kao i korišćenja hemijskih supstanci i prajmera u okviru procedura gde je neophodno uniformno referisanje pojmova i postupaka radi očuvanja reproducibilnosti istraživanja i rezultata. Potrebno je uzeti u obzir da i činjenicu da je doktorska disertacija napisana na engleskom jeziku koristeći usko specifičnu naučnu terminologiju, a iz široko ispitivanih oblasti genetskih istraživanja, sa izuzetno velikim brojem publikacija. Ovo relativno ograničava broj mogućih formulacija, a bez značajnog odstupanja od naučne terminologije ove oblasti i kompromitovanja jasnoće obrazloženja teze, što može povećati stepen podudarnosti pri proveru originalnosti.

C) Kratak opis postignutih rezultata

Ova studija preseka uključivala je 54 pacijenta klasifikovana u tri grupe: HIV monoinficirane, HCV monoinficirane i HIV/HCV ko-inficirane pacijente. Uzorak je uključivao 30 (55.6%) HCV-inficiranih pacijenata, 9 (16.7%) HIV monoinficiranih i 15 (27.8%) ko-inficiranih pacijenata. Promenjena ekspresija gena koji kodiraju metaboličke enzime i transportere uočena je u grupi ko-inficiranih pacijenata kod kojih je primećena statistički značajno povećana ekspresija gena za CYP2B6. Statistička značajnost je takodje primećena pri poredjenju sa HIV monoinficiranim kao i HCV monoinficiranim grupama pacijenata. Takodje, u grupi HCV monoinficiranih pacijenata primećena je statistički značajno povećana ekspresija gena koji kodiraju CYP2B6 u pogrupi pacijenata koji su lečeni pegilovanim interferonom (PEG IFN) u odnosu na grupu nelečenih pacijenata kao i u odnosu na grupu HCV pacijenata lečenih direktno delujućim lekovima (DAA). Ekspresija gena koji kodiraju CYP3A4 u kontekstu povećane ekspresije primećena je u grupi HIV inficiranih pacijenata, mono ali i ko-inficiranih sa HCV infekcijom. Pored toga, povećana ekspresija gena koji kodiraju CYP3A4 pokazala je statistički značajnu korelaciju sa stepenom (gradusom) zapaljenja u jetri, iako ne i sa stepenom fibroze jetre. Takodje, povećana ekspresija gena koji kodiraju CYP3A4 pokazala je pozitivnu korelaciju sa visokim vrednostima trombocita. Iako je ekspresija gena koji kodiraju ABCB1 transporter pokazala trend snižene ekspresije u svim grupama pacijenata, statistički značajnu povezanost pokazala je samo sa pacijentima koji su koristili lamivudin.

D) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U ovom istraživanju uradjena je analiza na uzorcima humane jetre koja je ispitivala potencijalne promene u ekspresiji gena koji kodiraju dva metabolička enzima CYP3A4, CYP2B6 i ABCB1 transportera u grupama HIV, HCV i HIV/HCV ko-inficiranih pacijenata.

CYP2B6 se prvenstveno eksprimira u tkivu jetre, pokazujući značajnu interindividualnu varijabilnost i razlike u aktivnosti u zavisnosti od starosti, pola, rase, kao i upotrebe alkohola i pušenja (Zanger, U.M et al. 2013.). U prethodnim decenijama, studije su pokazale da CYP2B6 metaboliše 2 – 10% ukupnog sadržaja CYP enzuma u jetri i uključen je u metabolizam brojnih poznatih supstrata, uključujući antiretrovirusne lekove, kao što je efavirenz (Wang, P.F. et al., 2019). Posebno zanimljiv rezultat ovde doktorske disertacije je pozitivna korelacija između povećane ekspresije CYP2B6 i prisustva HIV/HCV ko-infekcije. Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima Pereira et al. koji su pokazali niže koncentracije efavirena u plazmi u HIV/HCV koinficiranih pacijenata u poređenju sa HIV monoinficiranim, što sugerira nižu aktivnost CYP2B6 enzima u ovoj populaciji pacijenata (Pereira, S.A. et al., 2008). Poseban značaj ovog rezultata je u tome što ova povećana ekspresija može da se posmatra nezavisno od ostalih faktora za koje se zna da utiču na ekspresiju gena. U farmakogenomskim studijama koje se bave analizom ekspresije metaboličkih enzima česta je upotreba surogat markera poput plazma koncentracije efavirena kada je u pitanju CYP2B6. Približno 90% ovog leka metaboliše se 8-hidroksilacijom posredovanom CYP2B6, uz minimalni doprinos drugih citohrom enzima poput CYP2A6, CYP3A i CYP1A2 (Faucette, S.R., et al. 2004.). Na osnovu analize promenjene ekspresije gena koji kodiraju metaboličke enzime i transportere (CYP3A4, CYP2B6 i ABCB1) u populaciji pacijenata izloženih hroničnom zapaljenju odnosno pacijentima koji žive sa HIV, HCV ili HIV/HCV ko-infekcijom, ova doktorska disertacija je pokazala da je u grupi koinficiranih pacijenata postojala ushodna regulacija ekspresije gena koji kodiraju CYP2B6. Podaci dostupni iz studija uzoraka periferne krvi koristili su plazma koncentracije efavirena kao surogat marker za metaboličku aktivnost CYP2B6. Nedavna sprovedena studija u Keniji (Ngayo, M.O. et al., 2022.) takodje je pokazala da koncentracija efavirena može biti smanjena u delu populacije pacijenata inficiranih HIV-om, i da je ovo najčešće povezano sa specifičnim polimorfizmima. Nivo efavirena u plazmi uglavnom korelira sa prisustvom određenog polimorfizma CYP2B6 ali i iako polimorfizmi mogu biti u korelaciji sa ekspresijom gena, upravo za CYP2B6, postoje studije koje pokazuju da to nije uvek slučaj (Haas T. et al., 2004.). Kada se koristi efavirenz kao model za određivanje aktivnosti CYP2B6, važno je napomenuti da efavirenz izaziva akutnu inhibiciju, ali pokazuje hroničnu indukciju CYP2B6, kao što je pokazano u studiji sa efavirenzom i bupropionom kod zdravih dobrovoljaca (Ngayo, M.O. et al., 2022.). Indukcija enzima može dovesti do povećane ekspresije gena koji taj enzim kodiraju.

Analizom razlika u ekspresiji gena koji kodiraju CYP2B6 u dve grupe pacijenata sa HCV infekcijom, u početku nije pronađena statistički značajna razlika između nelečenih i lečenih pacijenata. Međutim, pri poredjenju pacijenata lečenih DAA i kod onih koji su tretirani PEG IFN-om, primećena je veća ekspresija CYP2B6 u grupi PEG-IFN pacijenata. Pored toga, u poređenju sa grupom nelečenih pacijenata sa HCV, grupa lečena PEG IFN je takodje pokazala povećanu ekspresiju gena koji kodiraju CYP2B6. Iako prethodno radjene *in vitro* studije sugerisu da određene osobe pokazuju sniženu ekspresiju CYP2B6 i povećanu ekspresiju CYP3A4 (Drozdik, M. et al., 2023; Chen, X. et al., 2012), postoje ograničeni i konfliktni podaci o efektima PEG IFN na ekspresiju CYP2B6 na humanim uzorcima. Rezultati ovog istraživanja sugerisu značajnu individualnu varijabilnost u ekspresiji CYP2B6 kao odgovor na lečenje PEG IFN. Dodatni faktori kao što su oštećenje jetre, starost, pol i CYP2B6 polimorfizmi takodje mogu doprineti ovoj varijabilnosti. Međutim, važno je napomenuti da je mala veličina uzorka koji prima PEG INF značajni limit studije.

Iako je ključno razumeti modulaciju CYP3A4 u HIV infekciji zbog uticaja koji ovaj enzim ima na efikasnost i bezbednost primenjene terapije, studije pokazuju oprečne rezultate. Na primer, utvrđeno je da su koncentracije atazanavira niže kod pacijenata zaraženih HIV-om

nego kod zdravih volontera, a studija koja je analizirala metabolizam kofeina otkrila je da metabolizam kofeina bio nije izmenjen kod pacijenata zaraženih HIV-om u poređenju sa zdravim dobrovoljcima, ali je bio značajno smanjen kod pacijenata sa AIDS-om, što sugerise da nivo zapaljenja može biti važan faktor koji utiče na metaboličke enzime [Jetter, A. et al., 2010; Venuto, C.S. et al., 2018; Shah, S. et al., 2014.]. Kada je u pitanju ekspresija gena koji kodiraju CYP3A4 u ovom istraživanju je pokazana pozitivna korelacija sa povećanom ekspresijom CYP3A4 i prisustvom HIV infekcije. Ovaj rezultat se potencijalno može tumačiti i kao korelacija sa upotrebom ART-a, s obzirom da su svi pacijenti zaraženi HIV-om primali odgovarajuću terapiju. Većina pacijenata uključenih u istraživanje koristila je jedan od sledeća tri antiretrovirusna leka: efavirenz, lamivudin i dolutegravir (iako se dolutegravir samo delimično metaboliše preko ovog enzima) u različitim kombinacijama, odnosno, lekove koji se uglavnom metabolišu preko CYP3A4 (Hariparsad, N. et al.2004; Li, F. et al. 2012.). Nije bilo korelacije između specifičnog izbora leka ili kombinacije lekova sa ekspresijom CYP3A4. Nakon posmatranja ovih podataka, može se zaključiti da uočeno povećanje ekspresije gena CYP3A4 može biti aktivacija ili indukcija zajedničkog puta za ovaj metabolizam enzim kao što je ranije pokazano u studijama (Hariparsad, N. et al.2004; Li, F. et al. 2012.).

U ovoj studiji, primećena je pozitivna korelacija između ekspresije ABCB1 i upotrebe lamivudina u populaciji HIV pacijenata. Utvrđeno je da je upotreba lamivudina povezana sa sniženom ekspresijom gena ABCB1 transportera, što je u skladu sa rezultatima prethodnih studija (Shah, S. et al., 2014.). Regulacija ekspresije gena ABCB1 je složena i može uključivati različite faktore kao što su prisustvo virusne infekcije, hronično zapaljenje i primena antiretrovirusnih lekova. U prethodnim studijama opisana je smanjena ekspresije gena ABCB1 kod HIV i HCV infekcije (Lee, L.S. et al., 2010; Lucia, M.B., et al. 2002.) dok su druge prijavljivale povećanu ekspresiju ili pak izostanak promene u ekspresiji ovog transportera [Meaden, E.R. et al., 2001; Whyte-Allman, S.K., 2021.). Pored toga, mogu postojati interindividualne varijacije u ekspresiji gena ABCB1, a farmakogenomske studije su do sada dale oprečne podatke (Ebert, C. et al., 2016; Swart, M. et al., 2012.) Posebna vrednost ove studije je što predstavlja jednu od retkih studija sprovedenih na uzorcima tkiva humane jetre, a posebno u HIV i HCV populaciji. Korišćenje uzoraka tkiva humane jetre u ovoj specifičnoj populaciji pruža jedinstvenu mogućnost da se direktno ispituju i razjasne svi potencijalni faktori koji utiču na ekspresiju gena metaboličkih enzima i transportera u humanom tkivu jetre, koji se ne mogu u potpunosti obuhvatiti samo putem *in vitro* ili animalnih modela.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Obradovic, B.; Roberts, O.; Owen, A.; Milosevic, I.; Milic, N.; Ranin, J.; Dragovic, G. Expression of CYP2B6 Enzyme in Human Liver Tissue of HIV and HCV Patients. *Medicina* 2023, 59, 1207.

[https:// doi.org/10.3390/medicina59071207](https://doi.org/10.3390/medicina59071207) (M22, IF 2.948)

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Analiza ekspresije gena koji kodiraju sintezu enzima CYP3A4, CYP2B6, i ABCB1 transportera kod bolesnika sa HIV i HCV infekcijom lečenih antivirusnim lekovima“ dr Božane Obradović, kao jedan od retkih radova o ovakvoj tematici u populaciji pacijenata koji žive sa HIV i HCV infekcijom ili koinfekcijom predstavlja originalni naučni doprinos istraživanjima koja se odnose na potencijalni značaj izmenjene ekspresije gena koji kodiraju metaboličke enzime CYP3A4 i CYP2B6 i ABCB1 transportera. Ovaj rad, pored toga

što predstavlja jednu od retkih naučnih publikacija u oblasti farmakogenomike radjenih na humanom uzorku jetre kod pacijenata sa hroničnom infekcijom i/ili koinfekcijom, pruža i uvid u povezanost ekspresije gena koji kodiraju metaboličke enzime CYP3A4 i CYP2B6 i ABCB1 transporter i faktora koji mogu uticati na njihovu promenjenu ekspresiju poput prisustva i ozbiljnosti zapaljenja, oštećenja jetre i primenjene terapije.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučno-nastavnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Božane Obradović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 03.07.2023.

Mentori:

Prof. dr Gordana Dragović Lukić

Prof. dr Ivana Milošević

Prof. Andrew Owen

Članovi Komisije:

Prof. dr Ljiljana Gojković Bukarica

Prof. dr Ivana Novaković

Prof. dr Nada Tomanović

Prof. dr Jovan Ranin

Prof. dr Saša Vukmirović