

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 24.09.2015. godine, broj 4600/16, imenovna je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Uticaj infekcije virusom humane imunodeficijencije na genetičku varijabilnost kliničkih izolata BK i JC poliomavirusa“**

kandidata dr Danijele Karalić, zaposlene na Medicinskom fakultetu u Beogradu kao saradnik u nastavi na katedri za Mikrobiologiju. Mentor je Doc. dr Ivana Lazarević.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Tanja Jovanović, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Maja Čupić, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Dobrila Stanković Đorđević, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

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

**IZVEŠTAJ**

**A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije**

Doktorska disertacija pod nazivom „Uticaj infekcije virusom humane imunodeficijencije na genetičku varijabilnost kliničkih izolata BK i JC poliomavirusa“ sadrži sledeća poglavlja: Uvod, Ciljevi rada, Materijal i metodologija, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. Rad sadrži 19 tabela, 10 grafikona i 10 slika. U poslednjem poglavlju je iznet pregled literature koja je citirana u doktorskoj disertaciji i sadrži 158 navoda i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

**UVOD** se sastoji od sedam celina. U prvoj celini opisan je istorijat i prikaz savremene klasifikacije humanih poliomavirusa. Druga i treća celina opisuje strukturu i karakteristike virusnog genoma BK virusa (BKV) i JC virusa (JCV), dok se u četvrtoj celini opisuje životni

ciklus BKV i JCV. U petoj celini opisuju se klinički značaj BK i JC virusne infekcije, kao i značaj reaktivacije poliomavirusa kod HIV-inficiranih pacijenata. Šesta celina posvećena je prikazu genetičke varijabilnosti dva regiona BK i JC virusa: NCRR i VP1 regiona. Poslednja celina se odnosi na molekularnu epidemiologiju BKV i JCV, klasifikaciju genotipova, subgenotipova JCV kao i subtipova i subgrupa BKV, s posebnim osvrtom na upotrebu JCV kao antropološkog markera migracije stanovništva kao i klinički značaj određivanja genotipova JCV i subtipova BKV.

**CILJEVI RADA** su jasno definisani i podrazumevaju određivanje prevalencije izlučivanja BKV i JCV u urinu HIV-inficiranih pacijenata i pacijenata kontrolne grupe kao i ispitivanje povezanosti stepena imunodeficijencije i virurije u grupi HIV-inficiranih. Zatim, utvrđivanje distribucije genotipova i subtipova JCV i BKV kao i strukture NCRR oba virusa. Takođe, ciljevi se odnose i na utvrđivanje moguće povezanosti prisustva BKV i JCV u urinu HIV-inficiranih pacijenata sa demografskim, virusološkim i citološkim parametrima kao i sa stadijumima bolesti i vrstom primenjene terapije.

**MATERIJAL I METODOLOGIJA** obuhvata detaljno opisane procedure koje su korišćene u prikupljanju materijala i eksperimentalnom radu. U posebnoj celini opisane su ispitanici: 114 HIV-inficiranih pacijenata i 120 ispitanika kontrolne grupe, a zatim je sledio opis kliničkih uzoraka. U ovom poglavlju prikazani su i protokoli prema kojima se vršilo izolovanje virusne DNK, dokazivanje JCV i BKV u urinu umnožavanjem VP1 regiona i NCRR JCV i BKV seminested i nested-PCR metodama, elektroforeza u agaroznom gelu, i DNK sekvenciranje delova navedenih gena. I konačno, opisani su postupci analize dobijenih sekvenci, poređenja sa referentnim sekvencama i filogenetska analiza kao i metode za statističku obradu podataka.

**REZULTATI** su kroz 10 celina prikazani u vidu 26 priloga tj. 13 tabela, 9 grafikona i 4 slike uz propratni tekst, čiji sadržaj u potpunosti odgovara sadržaju priloga. U prve dve celine prikazani su rezultati učestalosti BKV i JCV DNK u urinu. U trećoj celini dati su rezultati ispitivanja učestalosti BK i JC virurija u odnosu na kliničke parametre kod HIV-inficiranih pacijenata. Rezultati distribucije subtipova i subgrupa BKV kao i genotipova i subgenotipova JCV dati su u 4. i 7. celini. Detaljan opis sinonimnih i nesinonimnih nukleotidnih izmena i mutacija u okviru VP1 regiona BKV i JCV dat je u celinama 5. i 8. U okviru celina 6. i 9. prikazani su rezultati analize strukture NCRR oba virusa. Poslednji deo poglavlja Rezultati

posvećen je filogenetskoj analizi izolata VP1 regiona BKV i JCV, zajedno sa rezultatima procene selekcionog pritiska za protein kodirajuće sekvence VP1 regiona BKV i JCV.

U poglavlju **DISKUSIJA** kandidat je na sveobuhvatan i detaljan način povezoao svoje rezultate sa rezultatima drugih autora. Na osnovu toga, kandidat je izneo svoje zaključke i hipoteze, koji objašnjavaju rezultate ove doktorske disertacije u skladu sa rezultatima većine drugih autora koji imaju isti naučni interes. Značajan doprinos predstavlja utvrđivanje distribucije genotipova JCV i BKV kako kod HIV-inficiranih pacijenata tako i u zdravoj populaciji, kao i analiza varijabilnosti virusnih genoma u obe grupe ispitanika. Takođe je prikazan uticaj imunosupresivnog stanja na učestalost reaktivacije poliomavirusa kod HIV-inficiranih pacijenata.

U poglavlju **ZAKLJUČCI** navedeni su najznačajniji zaključci koji su potpuno u skladu sa dobijenim rezultatima i navedenim ciljevima istraživanja.

U poglavlju **LITERATURA** navedene su 158 bibliografske jedinice iz stranih i domaćih publikacija koje su citirane prema opšteprihvaćenim standardima.

## **B. Kratak opis postignutih rezultata:**

U ovom istraživanju učestalost BK virurije kod HIV-inficiranih pacijenata iznosila je 50,8%, dok je u kontrolnoj grupi ispitanika iznosila 7,5%. Utvrđena je visoka statistička značajna razlika u učestalosti BK virurije između dve ispitivane grupe ( $p=0,0001$ ). JC virurija je češće otkrivana kod HIV-inficiranih pacijenata (43,8% kod HIV-inficiranih pacijenata vs. 30,8% kod ispitanika kontrolne grupe) i utvrđena je statistički značajna razlika između dve ispitivane grupe ( $p=0,039$ ). U obe ispitivane grupe JC virurije je bila češća kod muškog pola, dok povezanost između BK virurije i pola nije utvrđena. Godine starosti imale su uticaj na frekvenciju JC i BK virurije jer je frekvencija virurije s godinama rasla. Statističkom analizom nije utvrđena značajna razlika u učestalosti BKV ili JCV virurije u odnosu na stepen imunosupresije (definisano brojem CD4+ ćelija). Utvrđena je statistički značajna razlika u stepenu BKV virurije među CDC kliničkim kategorijama ( $p=0,019$ ). BK virurija je značajno češća među HIV-inficiranim pacijentima koji pripadaju C kliničkoj kategoriji (64,4%) u odnosu na one koje pripadaju A+B kategoriji. U odnosu na antiretrovirusnu terapiju, kod HIV-inficiranih pacijenata koji su na terapiji didanozinom češće je otkrivan BKV DNK u urinu u odnosu na pacijente koji nisu primali ovaj lek ( $p=0,014$ ).

U grupi HIV-inficiranih pacijenata među izolatima BKV identificovana su dva subtipa: I i IV. Dominantan subtip BKV u grupi HIV-inficiranih pacijenata je subtip I (81%) sa subgrupama Ia (39,6%) i Ib2 (41,4%) i subtip IV identificovan kod 19%. I u kontrolnoj grupi ispitanika je dokazano prisustvo subgrupa Ia (11,1%), subgrupa Ib2 (55,5%) i IV (33,4%).

Kod 7 (70%) izolata BKV HIV-inficiranih pacijenata i 3 (30%) ispitanika kontrolne grupe utvrđeno je prisustvo ukupno 10 različitih nesinonimnih nukleotidnih izmena. Kod HIV-inficiranih pacijenata, u okviru BC receptorskog domena VP1 gena BKV otkriveno je 85,7% nesinonimnih nukleotidnih izmena, dok je samo 1 (14,3%) otkrivena u okviru  $\beta$ -ploča koje povezuju receptorke domene. U kontrolnoj grupi, sve 3 (100%) nesinonimne nukleotidne izmene otkrivene su van receptorskih domena u okviru  $\beta$ -ploča. U kontrolnoj grupi, nesinonimne nukleotide izmene nisu utvrđene u receptorskim domenima VP1 BKV. Statistički visoko značajna razlika je utvrđena u distribuciji mutacija u BC receptorskom domenu VP1 gena između HIV-inficiranih pacijenata i ispitanika kontrolne grupe ( $p=0,0004$ ). Najčešća mutacija je bila E82D. Sve mutacije su otkrivene kod pacijenata koji su imali CD4+ ćelije manje od 200 po ml krvi.

Struktura svih pozitivnih uzoraka urina odgovara arhetip varijanti NCRR BKV. Samo male promene poput baznih supstitucija, delecija i insercija koje nisu remetile bazičnu arhitekturu NCRR su otkrivene među sekvencama NCRR i HIV-inficiranih pacijenata i ispitanika kontrolne grupe.

U kontrolnoj grupi ispitanika najčešći genotipovi JCV su bili genotip 1 (43,2%), 2 (29,7%) i 4 (27,1%). U okviru genotipa 1 otkriveni su subgenotipovi 1A i 1B, dok su u okviru genotipa 2 otkriveni subgenotipovi 2B, 2C i 2D. U grupi HIV-inficiranih dominantan genotip je 2 (42%), 1 (34%) i 4 (24%).

Nesinonimne nukleotidne izmene su utvrđene na 8 pozicija VP1 gena JCV kod 14% HIV-inficirana pacijenta i 10,8% ispitanika kontrolne grupe. U DE receptorskom regionu VP1 gena utvrđeno je 30% nesinonimnih nukleotidnih izmena, dok je preostalih 70% otkriveno u  $\beta$ -pločama. U kontrolnoj grupi kod 13,5% ispitanika utvrđene su 4 (80%) nesinonimne nukleotide izmene u  $\beta$ -pločama i 1 (20%) u DE receptorskom domenu.

Struktura NCRR svih izolata JCV odgovara arhetip varijanti NCRR JCV. Minimalne promene, koje nisu uticale na bazičnu strukturu, poput baznih supstitucija i pojedinačnih delecija su otkrivene među sekvencama JCV NCRR u ovom istraživanju.

dN i dS vrednosti DE i BC receptorskih domena VP1 JCV i BKV kod HIV-inficiranih pacijenata su bile nekoliko puta više od dN i dS vrednosti za protein kodirajuće sekvence VP1 regiona JCV i BKV, ukazujući da je ovaj deo genoma pod većim uticajem selekcionog pritiska. Međutim, pošto je odnos dN/dS bio manji od 1 u svim ispitivanim grupama pozitivna selekcija nije utvrđena.

### **C. Uporedna analiza doktorskse disertacije sa rezultatima literature**

Produženo stanje imunosupresije kao posledica HIV infekcije, izdvojilo je humane poliomaviruse kao nove igrače u timu „oportunističkih infekcija“ u odnosu na AIDS pacijente. U poslednje vreme, BKV i JCV dobijaju sve više i više pažnje u naučnim krugovima pre svega zbog visokog mortaliteta oboljenja koja nastaju kao posledica njihove reaktivacije. Ovo je prva studija u našoj zemlji, ali i u zemljama u regionu koja se bavi izučavanjem genetičke varijabilnosti humanih poliomavirusa: BKV i JCV.

U ovom istraživanju BK virurija je utvrđena kod 50,8% HIV-inficiranih pacijenata. Rezultati ranijih studija su pokazali široki raspon učestalost BK virurije među HIV-inficiranim pacijentima koja se kretala od 15% do 60%. S druge strane, učestalost BK virurije među ispitanicima kontrolne grupe tj. zdravim donorima u Srbije je bila 7,5%. Ova učestalost je u skladu sa rezultatima predhodnih istraživanja gde je utvrđeno da se kod imunokompetentnih seropozitivnih osoba BKV reaktivira kod nekih 5-10%.

Među HIV-inficiranim pacijentima u Srbiji, učestalost JC virurije iznosila je 43,8%. Ova učestalost virurije je u skladu sa rezultatima za druge evropske zemlje. Na primer, frekvencija JC virurije među HIV-inficiranim pacijentima u Irskoj je iznosila 54,2%, u Portugaliji 51% u Italiji 46,7%. Kao i neke predhodne studije i rezultati ovog istraživanja potvrđuju statistički značajnu razliku u frekvenci izlučivanja JCV između HIV-inficiranih pacijenata i zdravih donora.

Među zdravim donorima učestalost JC virurije iznosila je 30,8%. Ovaj rezultat je u skladu sa objavljenim rezultatima za druge evropske zemlje, gde se frekvencija JC virurije kod zdravih osoba kreće u rasponu od 21% u Irskoj do 32% u Nemačkoj, 38% u Portugalu, 39-46% u Poljskoj, 40-47% u Italiji, 47-54% u Španiji.

Ovo istraživanje kao i neka predhodna nisu pokazala statistički značajnu povezanost između JC virurije i stepena imunosupresije utvrđenog samo na osnovu broja CD4+ T ćelija.

Takođe, nije uočena povezanost između BK virurije i stepena imunosupresije utvrđenog na osnovu broja CD4+ ćelija. Međutim, statistički značajna razlika je utvrđena u frekvenci izlučivanja BKV u odnosu na CDC kategoriju HIV-inficiranih pacijenata.

Široka rasprostanjenost JCV udružena sa transmisijom unutar porodice i koevolucija sa ljudskom populacijom od trenutka nastanka modernog čoveka, učinili su ovaj virus pogodnim kandidatom za rekonstrukciju migracije stanovništva. Genotip 1 je glavni genotip u Evropi i Americi, genotipovi 2 i 7 su karakteristika stanovništva Azije, tipovi 3 i 6 dominiraju među stanovništvom Afrike kao i njihovim potomcima koji naseljavaju druge kontinente. Imajući u vidu da su moderni Srbi južnoslovenski narod, etnički i lingvistički organak Indoevropskog naroda i milenijum dugu zajedničku evoluciju ljudi i JCV, nije bilo neočekivano da se evropski, evroazijski i indijski genotipovi JCV otkriju među stanovništvom Srbije.

Dominantan JCV genotip, među ispitanicima kontrolne grupe (zdravim donorima) u Srbiji, je bio genotip 1, praćen genotipovima 2 i 4. Skoro 71% (70,3%) ispitanika kontrolne grupe u ovom istraživanju su nosioci genotipova 1 i 4, osnovnih markera naroda koji su tokom migracije stanovništva naselili Evropski kontinent. Tri različita subgenotipa genotipa 2 su otkrivena u Srbiji: 2B, 2C i 2D. Subgenotipovi 2A i 2C dominiraju u severnoistočnoj Aziji, subgenotip 2B je evroazijski tip dok je 2D indijski tip. Ovaj obrazac distribucije genotipova JCV, gde je genotip 1 dominantna i praćen genotipovima 2 i 4, je takođe utvrđen i u nekim drugim evropskim zemljama poput Poljske, Portugala i Irske. Situacija sa distribucijom genotipova JCV se menja kada se posmatraju i imunodeficientni pacijenti. U ovom istraživanju je utvrđena razlika u distribuciji genotipova JCV između dve ispitivane grupe. Naime, među HIV-inficiranim pacijentima najčešće otkrivan genotip je bio genotip 2, praćen genotipovima 1 i 4.

Među ispitanicima obe grupe ovog istraživanja dominantan BKV subtip je bio subtip I, praćen subtipom IV. Ovakav obrazac distribucije BKV subtipova, gde je subtip I najčešći i praćen subtipom IV, odgovara distribuciji BKV subtipova na Evropskom kontinentu i rezultatima predhodnih istraživanja.

U ovom istraživanju, aminokiselinske izmene otkrivene su u obe grupe ispitanika u okviru BC receptorskog domena BKV sa izuzetkom par izmena koje su otkrivene u  $\beta$ -pločama. Aminokiselinske izmene otkrivene na pozicijama 73, 82, 89, 117 i 120 su bile poznate i objavljene u nekim ranijim studijama, dok su izmene na pozicijama 60, 61, 76 i 121 prvi put

opisane u ovom istraživanju. Rezultati predhodnih istraživanja predložili su teoriju da mutacije na pozicijama 73 i 82 ne utiču na virusnu replikaciju, dok mutacije na pozicijama 61, 64, 65 i 69 dovode do nestabilnosti kapsida i defektnog vezivanja virusa za ciljnu ćeliju *in vitro*.

Nijedna od 4 mutacije na pozicijama 55, 60, 267 i 269 koje se označavaju kao prognostički marker za PML nisu otkrivene u ovom istraživanju. U ovom istraživanju svi uzorci HIV-inficiranih pacijenata su bili urini i to je moguće razlog zašto nijedna mutacija koja je karakteristika PML nije otkrivena.

U uzorcima urina obe grupe ispitanika utvrđeno je prisustvo arhetip varijante NCRR BKV i JCV. Samo promene manjeg obima su otkrivene u NCRR poput pojedinačnih delecija i insercija kao i brojne nukleotidne izmene. Pošto u ovom istraživanju HIV-inficirani pacijenti nisu imali poliomavirus-udružena oboljenja otkrivanje samo arhetip varijante sa minimalnim promena u vidu tačkastih mutacija kao posledica „zamora“ DNK polimeraze zbog povećanog obima replikacije je u skladu sa predhodnim studijama.

#### **D. Objavljeni radovi koji čine deo doktorskog disertacija:**

1. **Karalic D.**, Lazarevic I., Knezevic A., Cupic M., Jevtovic D., Jovanovic T. Distribution of JC Virus Genotypes among Serbian Patients Infected with HIV and in Healthy Donors. J Med Virol 2014(3):411-418. (M23, IF:2,37)

2. **Karalic D.**, Lazarevic I., Cupic M., Jevtovic D., Jovanovic T. Prevalence of JC and BK Polyomavirus excretion in the urine of HIV-infected patients from Serbia. Arch. Biol. Sci, Belgrade 2014;66: 559-564 2014 (M23, IF:0.79)

3. Cupic M., Lazarevic I., Pravica V., Banko A., **Karalic D.**, Naumovic R., Kravljaca M., Jovanovic T. The prevalence of the most important viral infections in renal transplant recipients in Serbia. Arch. Biol. Sci, Belgrade 2012;64: 1285-1296. (M23, IF: 0,79)

4. **Karalic D.**, Lazarevic I., Cupic M., Jovanovic T. The prevalence of Human Polyomaviruses in urine samples of immunocompetent individuals in the Serbian population. Arch. Biol. Sci, Belgrade 2012;64: 1383-1388. (M23, IF:0,79)

## **E. ZAKLJUČAK** (Obrazloženje naučnog doprinosa):

Doktorska disertacija „**Uticao infekcije virusom humane imunodeficijencije na genetičku varijabilnost kliničkih izolata BK i JC poliomavirusa**“ dr Danijele Karalić predstavlja originalni naučni doprinos izučavanju poliomavirusa u našoj zemlji. Ovo istraživanje pruža prve informacije o distribuciji genotipova, subgenotipova, subtipova i subgrupa JCV i BKV u našoj zemlji, kao i saznanja o genetičkoj varijabilnosti kliničkih izolata BK i JC poliomavirusa. Distribucija genotipova JCV u kontrolnoj grupi ispitanika može da posluži kao osnova za neka buduća opsežnija antropološka istraživanja o poreklu naroda koji naseljavaju područje Balkana. Dobijene informacije o genotipovima JCV kod HIV inficiranih pacijenata mogle bi imati klinički značaj s obzirom da genotipizacija može da posluži za prepoznavanje pacijenata koji nose “nepovoljni” genotip za nastanak poliomavirus-udruženih oboljenja i koji bi stoga mogli biti odabrani za češću i opsežniju kontrolu.

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 Naučnom Veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Danijele Karalić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

### **Mentor:**

---

Doc. dr Ivana Lazarević

### **Članovi Komisije**

---

Prof. dr Tanja Jovanović

---

Prof. dr Maja Čupić

Beograd, 08.oktobar 2015.godine

---

Prof. dr Dobrila Stanković Đorđević