

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta, održanoj dana 17.11.2022.godine broj 11 / X- 4 / 4 - LJ imenovana je Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom:

“ANALIZA EVOLUCIONE I TRANSMISIONE DINAMIKE INFEKCIJE VIRUSOM HUMANE IMUNODEFICIJENCIJE U SRBIJI I NA BALKANU”

kandidata dr Luke Jovanovića (br. Indeksa 5058/16), doktora medicine, specijaliste radijacione onkologije, zaposlenog na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije. Mentor doktorske disertacije je prof. dr Maja Stanojević.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Aleksandra Knežević, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. dr sci. med. Marina Šiljić, naučni saradnik Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Dimitrios Paraskevis, vanredni profesor Medicinskog fakulteta, Univeriteta u Atini

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 dr Luke Jovanovića napisana je na 76 stranica i podeljena je na poglavlja: Uvod, Ciljevi, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. Disertacija sadrži ukupno 4 tabele i 30 slika. Doktorska disertacija sadrži rezime na engleskom i srpskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji. Poglavlje Reference sadrži spisak od 139 referenci citiranih u disertaciji i spisak skraćenica.

Uvod je podeljen na četiri potpoglavlja. Prvo potpoglavlje sadrži kratak pregled otkrića virusa humane imunodeficijencije (HIV) kao uzročnika sindroma stečene imunodeficijencije (AIDS), kao i pregled istorije pandemije HIV/AIDS-a. Drugo potpoglavlje sadrži pregled aktuelne epidemiološke situacije u svetu i Evropi, sa posebnim osvrtom na epidemiološku situaciju u Srbiji i na Balkanu. Treće potpoglavlje predstavlja biologiju HIV-a, strukturu virusa i ciklus replikacije, njegovu raznovrsnost i klasifikaciju, kao i rasprostranjenost podtipova HIV-a u svetu, Evropi i na Balkanu. U četvrtom potpoglavlju predstavljena je upotreba i primena različitih metoda filogenetske analize u istraživanju HIV-a, uključujući i razmatranje potencijalnih etičkih pitanja u vezi sa korišćenjem filogenetske analize u molekularnom nadzoru epidemije HIV-a.

Precizno definisani **ciljevi** disertacije obuhvatili su: istraživanje dinamike prenošenja i filodinamičkih obrazaca epidemije HIV-a u Srbiji, u opštoj populaciji kao i u ključnim subpopulacijama obolelih u odnosu na način prenošenja i podtip HIV-a; da rekonstruiše matematički model trenutnog toka i budućih trendova incidencije HIV-a u Srbiji; da istraži evolucionu dinamiku i filogeografske obrasce širenja epidemije HIV podtipa B na Balkanu.

U poglavlju **Materijal i metode** dat je detaljan opis istraživanja koje je osmišljeno kao studija preseka i analiza trenda korišćenjem molekularnih, filogenetskih i odgovarajućih statističkih metoda. Analiza je obuhvatila dva seta sekvenci: 385 sekvenci iz Srbije skupljenih u periodu 1997. do 2015. godine i 2.415 sekvenci HIV podtipa B iz sedam balkanskih zemalja, sakupljenih u periodu 1999. do 2019. godine, sa pripadajućim demografskim, epidemiološkim i kliničkim podacima. Kriterijumi za uključivanje u studiju bili su jasno definisani, kao i molekularne analize koje su uključivale ekstrakciju RNK, različite modalitete PCR reakcije i DNK sekvenciranje zasnovane na Sangerovoj metodi sekvenciranja. Primenjeni su napredni filogenetski i statistički pristupi uključujući: filodinamičku i filogeografsku analizu, zasnovanu na algoritmima maksimalne verovatnoće i Bajesove statistike implementirane u IQTREE, MEGA, PAUP, MrBaies i BEAST; multifaktorska analiza latentnih klasa (analiza latentnih klasa -LCA). Za analizu dugoročnog trenda rasta epidemije HIV-a primenjena su dva pristupa: logističko modelovanje rasta epidemije HIV-a u Srbiji na osnovu podataka za period 1985. do 2015. godina i „join-point” regresiona analiza incidencije novodijagnostikovanih slučajeva HIV-a u sedam balkanskih zemalja, za period 2004. do 2019. godina, prema objavljenim podacima Instituta za javno zdravlje Srbije i Evropskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti (ECDC).

U poglavlju **Rezultati** dat je objektivna i detaljan prikaz svih dobijenih rezultata. Ovo poglavlje je podeljeno u šest potpoglavlja sa 28 priloga (3 tabele i 25 slika) sa odgovarajućim naslovima.

U poglavlju **Diskusija**, rezultati ovog istraživanja su korelirani i upoređivani sa rezultatima drugih studija, na sveobuhvatan i detaljan način. Na osnovu ovoga, kandidat je izneo svoje zaključke i hipoteze.

U poglavlju **Zaključci** prikazani su najvažniji zaključci, izvedeni iz i u skladu sa dobijenim rezultatima i postavljenim ciljevima istraživanja.

U poglavlju **Literatura** navodi se 139 bibliografskih jedinica iz međunarodnih i domaćih publikacija koje su se citirale shodno Vankuverskim standardima.

B) PROVERA ORIGINALNOSTI DOKTORSKE DISERTACIJE

Primenom programa iThenticate izvršena je provera originalnosti doktorske disertacije „Analiza evolucione i transimisione dinamike infekcije virusom humane imunodeficijencije u Srbiji i na Balkanu/Analysis of Evolutionary and Transmission Dynamics of Human Immunodeficiency Virus in Serbia and the Balkans”. Na osnovu nalaza u izveštaju iz programa iThenticate utvrđeno je da podudaranje teksta iznosi 42%. Analizom izveštaja i pregledom navedenih izvora sa kojima je uočeno poklapanje konstatujem da je uočeni stepen podudarnosti najvećim delom rezultat podudaranja sa prethodno publikovanim rezultatima istraživanja samog doktoranda, a koji su proistekli iz disertacije, uz napomenu da je disertacija napisana na engleskom jeziku i da su rezultati iz teze publikovani su u okviru dva rada in extenso, kategorija M21 i M22. Izuzimajući navedeno podudaranje sa in extenso radovima publikovanim iz teze, preostala obuhvataju podudaranje sa opštim podacima kao i opštim pojmovima i terminima u mikrobiologiji i molekularnoj biologiji. Sve navedeno je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18).

C) KRATAK PREGLED DOBIJENIH REZULTATA

U okviru istraživanja evolucione i transimisione dinamike širenja HIV-a u Srbiji analizirano je 385 sekvenci iz Srbije sakupljenih u periodu 1997-2015. godine, za koje su bili dostupni relevantni klinički i epidemiološki podaci. Istraživanje je takođe obuhvatilo ispitivanje prekogranične transimisije HIV-1 podtipa B na Balkanu i u tu svrhu je analizirano 2415 sekvenci iz sedam balkanskih zemalja sakupljenih u periodu 1999-2019.

godine i to: 220 iz Rumunije, 770 iz Grčke, 411 iz Srbije, 251 iz Bugarske, 365 iz Hrvatske, 333 iz Slovenije i 65 iz Crne Gore. Analiza trenda HIV incidencije, predstavljenog brojem novodijagnostikovanih slučajeva u opštoj populaciji i ključnim populacijama u riziku, obavljena je na setu dostupnih epidemioloških i demografskih podataka dostupnih u godišnjim izveštajima Instituta za javno zdravlje Srbije i Svetske zdravstvene organizacije/Evropskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti.

Filogenetskom analizom HIV sekvenci iz Srbije identifikovano je postojanje 19 transmisionih klastera, koji su ispunili sve unapred definisane kriterijume, kao i jedna proširena transmisiona mreža, što čini 44% ispitivanog skupa podataka (170/385), sve unutar podtipa B. Većina klastera, 15/19 (79%), sadržala je sekvence muškaraca koji imaju seks sa muškarcima (MSM) kao prijavljeni rizik za HIV transmisiju. Sekvence podtipa C formirale su monofiletsku grupu sa visokom statističkom podrškom koja nije ispunjavala kriterijume definicije klastera, međutim, sastojala se isključivo od HIV sekvenci povezanih sa heteroseksualnim kontaktom kao rizikom za prenos. Filodinamička analiza je ukazala na kontinuiranu ekspanziju tri najveća transmisiona klastera tokom čitavog perioda istraživanja, povezana sa podtipom B i grupom transmisije MSM. Nasuprot tome, analiza heteroseksualnih monofiletskih klada podtipa B i C ukazala je na stagnaciju rasta.

Što se tiče epidemije HIV podtipa B na Balkanu, udeo sekvenci unutar transmisionih klastera bio je 68% (1.642/2.415), unutar 93 klastera. Četiri klastera, sa 11% od ukupnog broja proučavanih sekvenci (264/2.415), ispunila su kriterijume za prekogranične klastere. Filogeografska analiza je pokazala da se prekogranično širenje HIV podtipa B na Balkanu odvijalo između zemalja bivše Jugoslavije i Rumunije, stvarajući složene recipročne obrasce širenja između Srbije, Slovenije, Hrvatske i Crne Gore počev od sredine 80-ih godina, dok je širenje u Rumuniju počelo sredinom 90-ih.

Trend broja novodijagnostikovanih HIV slučajeva u Srbiji ukazao je na ranu eksponencijalnu fazu rasta povezanu sa MSM rizikom od transmisije, sa očekivanim kontinuitetom do 2030. godine. „Join-point“ regresiona analiza je ukazala na različite trendove u pogledu incidencije novodijagnostikovanih slučajeva HIV infekcije u zemljama Balkana, pad je uočen u Rumuniji, Grčkoj i Sloveniji i povećanje u Srbiji, Bugarskoj, Hrvatskoj i Crnoj Gori, uglavnom povezano sa rizikom od prenošenja MSM-a u celom regionu.

D) UPOREDNA ANALIZA DOKTORSKE DISERTACIJE SA REZULTATIMA IZ LITERATURE

Ranija istraživanja su ukazala na ulogu transmisionih klastera u HIV epidemiji u Srbiji, i njihovu povezanost sa podtipom B kao i MSM transmisionim rizikom (Šiljić M, 2017, Šiljić M et al 2013). Takođe, primenom koalescentnih modela i teorije molekularnog sata u filogenetskoj analizi uspešno je datirana pojava i širenje dominantnih HIV podtipova kao i najvećih transmisionih klastera (Šiljić M 2017). Primenom i

kombinacijom različitih filogenetičkih metoda zasnovanih na nukleotidnoj distanci, teoriji maksimalne verovatnoće i metodama Bajesove statistike kao i teorije molekularnog sata, definisani su robusni kriterijumi za lokalne klastere, koji su našli punu dalju primenu u naučnim i forenzičkim istraživanjima (Šiljić M 2017, Šiljić M et al 2017). U prikazanom doktorskom istraživanju metodološki pristup je proširen uključivanjem rekonstrukcije populacionog rasta primenom „Birth-Death“ modela kao i određivanjem srednjeg efektivnog reprodukcionog broja (Re) (Stadler et al., 2012, 2013). Premda se reprodukcioni broj (R/Re parametar) ne smatra najboljim parametrom za epidemiološku analizu HIV epidemije na nacionalnom nivou, pokazao se nezamenljivim u analizi transmisionih klastera (Liu M et al 2020). Naime klasteri transmisije pogotovo ukoliko obuhvataju više od 10 sekvenci ukazuju na žarišta lokalne HIV epidemije, te filodinamska i kliničko-epidemiološka karakterizacija istih pomaže u kreiranju i evaluaciji ciljanih preventivnih mera. (Paraskevis D et al 2017, Liu M et al 2020). Takođe multifaktorske analize socio-demografskih i kliničkih parametara sa podacima o klasterovanju omogućavaju detekciju faktora rizika, koji su udruženi za klasterovanjem (Paraskevis D et al 2019, Kostaki EG et al 2022). U ovom istraživanju pokazana je značajna i prolongirana aktivnost klastera povezanim sa MSM u odnosu na klade povezane sa heteroseksualcima dok je analiza latentnih klasa (multivarijantna analiza) ukazala da je klasterovanje u vezi sa skorašnjom infekcijom kod mladih muškaraca sa konkomitantnom seksualno prenosivom bolešću što je nalaz koji zabrinjava.

Istraživanja u zemljama sa generalizovanom HIV epidemijom su pokazala da su migrirajuće populacije (vozači kamiona, mornari/ribari i sl.) značajni činioci lokalnog/regionalnog širenja HIV-a (Jochelson K et al 1991, Bbosa N et al 2019). U Evropi, dominantan vid HIV transmisije jekroz lokalne klastere unutar ključnih populacija pod rizikom (Ferenz D et al 2013). Skorašnji talasi migracije uticali su na promenu distribucije podtipova u pojednima evropskim zemljama (Hauser A et al 2018), dok je dalja popagacija podtipova ostvarena kroz lokalne klastere i uključula i domicilno stanovništvo (Maggiorella MT et al 2020). U studiji dr Jovanovića u vezi transmisije HIV podtipa B na Balkanu uključeno je preko 2000 sekvenci sakupljenih u periodu 1999-2019. transmisija kroz lokalne klastere je bila najzastupljenija, sa sporadičnom pojavom prekograničnih klastera. Filogeografska analiza je ukazala na značajnu filogenetska povezanost HIV podtipa B u oblasti bivše Jugoslavije i Rumunije gde su Slovenija, Srbija i Crna Gora potencijalni izvori transmisije dok je Rumunija okarakterisana kao potencijalni primalac podtipa B iz ove regije, što je u skladu sa literaturnim podacima o poreklu ovog podtipa u Rumuniji (Parachiv S et al. 2012).

Komparativna analiza trenda HIV incidencije u Balkanskim zemljama ranije nije rađena. Dobijeni rezultati matematičkog modelovanja i komparativne joinpoint regresione analize ukazali su na različite trendove rasta, koji su zavisili od primenjenih preventivnih politika, kao što su preekspoziciona profilaksa kod MSM, promocija upotrebe kondoma u populacijama sa povećanim rizikom, kao i programi za redukciju opasnosti od

intravenskog konzumiranja droga (ECDC 2020). Trend porasta HIV incidenije u posmatranom periodu je uočen u Srbiji, Bugarskoj, Crnoj Gori i Hrvatskoj, prevashodno u vezi sa MSM transmisijom. Redukcija HIV incidenije u Rumuniji i Grčkoj povezana je sa primenom odgovarajućih programa za smanjenje HIV incidenije kod intravenskih korisnika droge, poput programa ARISTOTLE (Hatzakis A et al. 2015).

D) RADOVI PRIHVAĆENI ZA PUBLIKACIJU KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

1) **Jovanovic L**, Siljic M, Cirkovic V, Salemovic D, Pesic-Pavlovic I, Todorovic M, Ranin J, Jevtovic D, Stanojevic M. **Exploring Evolutionary and Transmission Dynamics of HIV Epidemic in Serbia: Bridging Socio-Demographic With Phylogenetic Approach.** Front Microbiol. 2019;10:287. doi: 10.3389/fmicb.2019.00287 **M21, IF 4.236**

2) **Jovanovic L**, Siljic M, Cirkovic V, Salemovic D, Jevtovic D, Alexiev I, Zidovec-Lepej S, Oroz M, Begovac J, Paraskevis D, Skoura L, Chaztidimitriou D, Kostaki G E, Dragas S, Dupanovic B, Otelea D, Paraschiv S, Poljak M, Lunar M M, Stanojevic M. **HIV-1 subtype B spread through cross-border clusters in the balkans: a molecular analysis in view of incidence trends.** AIDS. 2022 Sep 20. doi: 10.1097/QAD.0000000000003394. Epub ahead of print. PMID: 36129113. **M22, IF 4.632**

F) ZAKLJUČAK (Obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija pod nazivom “ANALIZA EVOLUCIONE I TRANSMISIONE DINAMIKE INFEKCIJE VIRUSOM HUMANE IMUNODEFICIJENCIJE U SRBIJI I NA BALKANU” kandidata dr Luke Jovanovića, predstavlja originalan i značajan naučni doprinos razumevanju molekularne epidemiologije, transmisiona dinamike i evolucije HIV-a u Srbiji i na Balkanu. Sve analize urađene su primenom najsavremenijih metoda molekularne virusologije i filogenetske analize, kombinujući više različitih setova podataka radi iznalaženja sveobuhvatnog odgovora na ovo veoma složeno pitanje. Ovo istraživanje pruža informacije o trendovima rasta HIV epidemije u Srbiji i zemljama iz njenog neposrednog okruženja, ukazujući na dalji trend porasta u Srbiji, Bugarskoj, Crnoj Gori i Hrvatskoj u datom periodu i omogućavajući kompartivnu sliku stanja HIV epidemije na nivou opšte populacije i ključnih populacija pod rizikom, čime pruža osnovu za razradu i implementaciju ciljanih preventivnih mera u Srbiji i na Balkanu..

Detaljnim filogenetskim istraživanjem sekvenci iz Srbije uočeno je prisustvo širećih transmisionih klastera i opisani su faktori povezani sa klasterovanjem, dok je sveobuhvatna big-data analiza transmisije HIV podtip B na Balkanu, opisala pojavu prekograničnih klastera na Balkanu.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su precizno definisani, naučni pristup je originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je 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, Luke Jovanovića, doktora medicine, specijaliste radijacione onkologije, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju Luke Jovanovića, i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 19.12.2022.

Članovi Komisije:

1. Prof. dr Aleksandra Knežević

2. Dr sci. med. Marina Šiljić, naučni saradnik

3. Prof. dr Dimitrios Paraskevis

Mentor:

Prof. dr Maja Stanojević
