

**NAUČNOM VEŠTAČENJE U MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veštačenja Medicinskog fakulteta, održanoj dana 1.12.2016.godine (broj 5940/8), imenovana je Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom:

**“Filogenetska analiza i molekularna karakterizacija virusa humane  
imunodeficijencije u Srbiji”**

kandidata Marine Šilji, master biologa, zaposlene na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na naučno istraživačkom projektu finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Mentor doktorske disertacije je Prof. dr Maja Stanojević.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Goran Jevtović, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Tanja Jovanović, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Aleksandra Knežević, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
4. Dr Sanja Glišić, Viši naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča“
5. Prof. dr Anne-Mieke Vandamme, profesor Katoličkog Univerziteta u Luvenu u Belgiji

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije Komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veštačenju u Medicinskog fakulteta sledeći

## IZVEŠTAJ

### A) PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija Marine Šilji napisana je na 185 strana i podeljena je na slede a poglavlja: Uvod, Ciljevi rada, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci, Literatura i Prilozi. U disertaciji se nalazi ukupno 10 tabela i 27 grafi kih priloga. Doktorska disertacija sadrži sažetak na engleskom i srpskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji. Poglavlje Literatura sadrži spisak od 225 referenci citiranih u disertaciji i listu skra enica.

**Uvod** je podeljen na sedam potpoglavlja. Prvo potpoglavlje sadrži prikaz otkri a virusa humane imunodeficijencije (HIV) uzročnika sindroma steene imunodeficijencije (SIDA/AIDS). Istorijat pandemije HIV infekcije i AIDS-a kao i prikaz trenutne epidemiološke situacije u svetu sa posebnim osvrtom na stanje u Srbiji. Drugo i tre e potpoglavlje detaljno prikazuju strukturu HIV estice, virusni genom kao i karakteristike replikativnog ciklusa HIV-a. U etvrtom potpoglavlju opisana je patogeneza i klasifikacija HIV infekcije. U petom potpoglavlju opisani su uzroci izuzetnog geneti kog diverziteta HIV-a. U šestom potpoglavlju opisana je klasifikacija HIV-a na tipove, grupe, podtipove kao i cirkulišu e rekombinantne forme kao i njihova prevalencija i distribucija u svetu sa vrlo detaljnim prikazom situacije na Balkanu i Srbiji. U poslednjem potpoglavlju prikazana je upotreba filogenetske analize u otkri u porekla HIV-a kao i transmisivnih lanaca HIV infekcije.

**Ciljevi** rada su precizno i jasno definisani i obuhvatili su ispitivanje aktuelne prevalencije i distribucije podtipova i cirkulišu ih rekombinantnih formi u Srbiji. Tako e ciljevi su obuhvatili i analizu transmisivnih klastera i filogenetsko datiranje epidemije najzastupljenijih HIV-1 podtipova u Srbiji. Ispitivanje uestalosti i svojstava molekularnih markera koji su odraz trajanja HIV-1 infekcije je tako e bio jedan od ciljeva ove doktorske disertacije.

U poglavlju **Materijal i metode** dat je detaljan opis istraživanja dizajniranog kao studija preseka kao i primenjenih molekularnih i filogenetskih analiza diverziteta HIV-a. Kriterijumi uključivanja u studiju, vremenski period kao i procedura sakupljanja uzoraka su veoma precizno definisani. Molekularne metode koje su obuhvatile ekstrakciju nukleinskih kiselina, modalitete

lan ane reakcije polimerizacije (engl. Polymerase Chain Reaction - PCR), metode DNK sekvenciranja kao i savremene metode bioinformatike i filogenetske analize su veoma opširno i detaljno prikazane. U ovom poglavlju kandidat je veoma preciznim argumentima potkrepio izbor svakog od primenjenih algoritama filogenetske analize kao i uključivanje kontrolnih sekvenci.

U poglavlju **Rezultati** dat je objektiv i detaljan prikaz svih dobijenih rezultata. Ovo poglavlje organizovano je u pet potpoglavlja sa 18 priloga (3 tabele i 15 grafičkih priloga) uz priložni tekst koji sadržaj u potpunosti odgovara sadržaju priloga.

U poglavlju **Diskusija** kandidat je na sveobuhvatan i detaljan način povezo 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 sličan naučni interes.

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

U poglavlju **Literatura** navedene su 225 bibliografske jedinice iz stranih i domaćih publikacija koje su citirane prema opšteprihvaćenim standardima.

## A) KRATAK PREGLED DOBIJENIH REZULTATA

Planom istraživanja generisane su nove DNK sekvence HIV izolata iz Srbije što je rezultiralo sa 142 nove HIV sekvence pol regiona kao i 34 nove HIV sekvence env regiona.. Analiza ovih sekvenci obavljena je zajedno sa 162 sekvence HIV izolata pacijenata iz Srbije generisanih u periodu od 1997. do 2007., dostupne u NCBI bazi podataka, kao i kontrolnim sekvencama stranih izolata različitih regiona. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je među HIV-1 inficiranim pacijentima u Srbiji dominantan podtip B virusa sa prevalencijom od 90,8% (129/142), dok je prevalencija non B podtipova iznosila 9,2% (13/142). Među non B podtipovima prevalencija podtipa C bila je najviša 4,2% (6/142), koji je identifikovan u polovini od ukupnog broja non B izolata 46,1% (6/13). Među drugim non B podtipovima, podtip A identifikovan je u 2,1% (3/142) dok su cirkulirajuće rekombinante forme identifikovane kod 2,3% (4/142) virusna izolata. U ovom istraživanju podtip B virusni izolati dominantno su

izolovani iz muškaraca koji imaju seksualne odnose sa muškarcima (MSM). Nasuprot tome, me u pacijentima inficiranim non B podtipovima dominantno je utvr en heteroseksualni na in transmisije virusa. Za ovu razliku utvr eno je da je visoko statisti ki zna ajna ( $p < 0,001$ ).

Detaljnou filogenetskom analizom ukupnog seta sekvenci uklju enih u studiju, generisanih u periodu od 1997. do 2013. godine identifikovano je, prema svim postavljenim filogenetskim kriterijumima, prisustvo 14 transmisionih klastera i 12 transmisionih parova podtipa B virusa. Broj sekvenci u okviru transmisionih klastera varirao je od 3 do 11, sa rasponom vremena uzorkovanja od 1 do 8 godina i srednjom geneti kom distancom 0,9%. Najve i broj sekvenci u okviru 14 identifikovanih transmisionih klastera su iz HIV izolata pacijenata iz Beograda 80,3% (53/66), dok je za 11/14 utvr eno da obuhvataju sekvence poreklom od pacijenata muškog pola koji su kao rizik za transmisiju prijavili seksualni odnos sa muškarcem. Tako e, u ovom istraživanju identifikovano je dodatnih 45 sekvenci podtipa B u okviru transmisione mreže sa visokom statisti kom podrškom ( $>95\%$ ) i geneti kom distancom me u sekvencama od 7,7%. Kod pacijenata iz kojih su izolovane navedene virusne sekvence postojanje HIV infekcije je ustanovljeno u rasponu od 17 godina (1997-2013.), pri emu je najve i broj njih bio muškog pola 93,3% (42/45) sa prijavljenim rizikom za transmisiju seksualni odnos sa muškarcem (MSM) 77,7% (35/45). Ukupno 40,4% (111/275) pol sekvenci podtipa B identifikovano je u okviru transmisionih klastera i mreže, dok je 59,6% (164/275) prona eno zajedno sa sekvencama stranih izolata.

Me u sekvencama non B podtipa identifikovano je 5 transmisionih parova dok nisu identifikovani transmisioni klasteri koji ispunjavaju definisane filogenetske kriterijume. Ipak, me u sekvencama podtipa G utvr eno je prisustvo grupe sekvenci sa visokom statisti kom podrškom i distancom od 4% ali sa sekvencom stranog izolata dobijenom BLAST analizom izme u lokalnih sekvenci.

Rezultati filogenetske analize transmisionih klastera u kontekstu forenzi kog istraživanja epidemiološke povezanosti tri klju ne sekvence pokazale su prisustvo filogenetski odvojenog transmisionog klastera sa zna ajnom statisti kom podrškom i niskom geneti kom distancom me u njima, ime je podržana po etna pretpostavka ovog istraživanja. Me utim, uprkos utvr enoj topologiji filogenetskog stabla i parafiliji sekvenci subjekta 1 u odnosu na subjekte 2 i

3, dobijeni rezultati ne mogu sa sigurnoš u da dokažu neposrednu transmisiju virusa izme u dva subjekta, kao ni smer transmisije.

Vreme najskorijeg zajedni kog pretka (engl, time of the Most Recent Common Ancestor – tMRCA) procenjivano je za sve sekvence podtipa B, sekvence transmisione mreže kao i najve i transmisioni klaster. Tako e vremensko poreklo procenjivano je za sve sekvence podtipa G kao i podtipa C. Analizom je procenjeno da najskoriji zajedni ki predak svih sekvenci podtipa B virusnih izolata iz Srbije potie iz 1983 (95% IP: 1977-1989), a da za opisanu transmisionu mrežu, sa injenud 45 virusnih sekvenci datira od 1994. godine (95% IP: 1982– 2000.). Vremensko poreklo najve eg transmision klastera sa injenog od 11 virusnih sekvenci, dominantno izolovanih iz pacijenata muškog pola koji su kao rizik transmisije virusa prijavili seksualni odnos sa muškarcem, procenjeno je na znatno kasniju 2004. godinu (95% IP: 2002– 2006.). Analiza porekla podtipova G i C sekvenci izolata iz Srbije pokazala je da je najskoriji predak poreklom sa po etka devedesetih godina.

Analiza u estalosti pojave istovremnog prisustva razli itih baza na istoj poziciji u genomu, na osnovu usvojene granice od 0,47% za ukupno 54% ispitanih virusnih sekvenci podtipa B ukazivala je na trajanje infekcije kra e od godinu dana. Na poziciji 245 produkta RT gena u najve em procentu 61% (168/275) identifikovana je aminokiselina divljeg soja virusa, aminokiselina valin (V), dok je 36.7% (101/275) na toj poziciji imalo aminokiselinsku izmenu. Najzastpljenija promena aminokiselina na poziciji 245 produkta RT gena bila je metionin ( ) 22.9% (63/275), zatim glutaminska kiselina (E) 7.7% (20/275), glutamin (Q) 5.5% (15/275), i ostale. Veoma visoka prevalenca, 93.6% (41/45), promene aminokiseline na ispitivanoj poziciji prona ena je u okviru sekvenci koje su obuhva ene transmisionom mrežom, dok je jednaka prevalenca ove supstitucije prona ena me u sekvencama rane i hroni ne infekcije.

## **B) UPOREDNA ANALIZA DOKTORSKE DISERTACIJE SA REZULTATIMA IZ LITERATURE**

U ovoj studiji utvr ena je dominacija HIV-1 podtipa B, što je u skladu sa rezultatima istraživanja zemalja Zapadne i Centralne Evrope (Abecasis i sar., 2013; Beloukas i sar., 2016). Abecasis i sar., opisali su distribuciju i prevalenciju HIV-1 podtipova kao i povezanost sa socio-

demografskim faktorima me u novodijagnostikovanim HIV inficiranim pacijentima Zapadne i Centralne Evrope (Abecasis i sar., 2013). Ovi autori pokazali su da je HIV-1 podtip B sa najvećom prevalencijom, premda identifikovan u manjem procentu u odnosu na prethodni izveštaj UNAIDS-a (66,1% nasuprot 85%). Me utim, poslednja istraživanja govore o porastu kompleksnosti HIV-1 epidemije pomenutih delova Evrope tokom godina, koja se ogleda u porastu prevalencije non-B podtipova, povezanih sa migracijama i kasnijim širenjem transmisionim lancima HIV infekcije. Ove karakteristike variraju me u zemljama različitih regiona (Beloukas i sar., 2016). Analizom sekvenci Evropskog projekta „SPREAD“ utvrđeno je da je dominacija podtip B virusa sa prevalencijom od 70,2%, praćena podtipom C, CRF02\_AG, G, A sa prevalencijama od 5,0%, 4,9%, 4,8% i 3,6%, navedenim redom (Beloukas i sar., 2016). Me utim, utvrđeno je da je u zemljama kao što su Portugalija, Kipar, Švedska i Grčka HIV-1 podtip B manje zastupljen sa prevalencijom manjom do 50%, dok je sa druge strane u Češkoj, Nemačkoj, Španiji, Sloveniji i Poljskoj, ovaj podtip zastupljen sa prevalencijom preko 80%, sa najvećom dominacijom u Poljskoj (96,2%) i Sloveniji (93,6%) (Abecasis i sar., 2013; Beloukas i sar., 2016; Paraskevis i sar., 2009). U skorašnjoj publikaciji, Abecasis i sar., izvanredno su saželi biološke funkcije različitih podtipova i time ukazali na značaj stalnog molekularnog nadzora diverziteta HIV-1.

Analizom dosadašnje literature dolazi se do zaključaka o stalnom porastu kompleksnosti i genetičkog diverziteta HIV-1 pandemije, što ukazuje na značaj praćenja infekcije na molekularnom nivou, kako globalno tako i lokalno, a time i važnost rezultata dobijenih ovim istraživanjem.

Brojne studije pokazale su da je HIV non B infekcija Evrope povezana sa heteroseksualnim putevima transmisije poreklom od migranata i osoba koje su epidemiološki povezane sa zemljama Podсахarske Afrike. Nasuprot ovim studijama, kod najvećeg broja pacijenata ovog istraživanja nije utvrđena epidemiološka povezanost sa zemljama inostranstva. Nasuprot zemalja Zapadne Evrope gde je HIV podtip B epidemija primarno opisana kod muškaraca koji imaju seksualne odnose sa muškarcima (MSM) a kasnije povezana i sa drugim putevima prenosa, u Srbiji HIV epidemija poela je me u intravenskim uživaocima droge i podtipom B virusa.

U pore enju sa drugim istraživanjima, u ovoj studiji identifikovani su transmisioni lanci HIV infekcije koji po karakteriskama odgovaraju zemljama gde su oni povezani sa MSM putem transmisije virusa. Jedan broj studija govori o ekvivalentnom broju transmisionih lanaca povezanim sa MSM i heteroseksualnim na inom transmisije virusa. Sa druge strane, brojne studije sprovedene širom sveta govore o zna ajnom porastu broja transmisionih lanaca HIV infekcije povezanih sa MSM na inom prenosa (Cuevas i sar., 2009; Kouyos i sar., 2010; Lewis i sar., 2008; Mitsch i sar., 2008; Paraschiv i sar., 2012).

Lemey i sar., pokazali su da je *pol* gen, koji je analiziran u ovom istraživanju, idealan region za analizu transmisionih lanaca HIV infekcije, rekonstrukciju puteva transmisije, kao i karakterizaciju tipova epidemije što je zna ajno za javno zdravstveni nadzor (Lemey i sar., 2005). U brojnim studijama do sada, filogenetska analiza je uspešno primenjivana u istraživanju transmisionih klastera kao i epidemiološke povezanosti virusnih izolata. Me utim, smer transmisije virusa i vreme po etka širenja virusa transmisionog klastera je daleko teže istražiti (Rachinger i sar., 2011). Standardne tehnike filogenetske analize mogu da ukažu na evolutivnu povezanost ali ne i na smer evolucije. Primena modela molekularnog sata omogu ava vremensko filogenetsko datiranje evolucije sekvenci (Drummond i sar., 2002; Rachinger i sar., 2011).

#### **D) RADOVI PRIHV A ENI ZA PUBLIKACIJU KOJI I NE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE**

1. **Siljic M**, Salemovic D, Cirkovic V, Pesic-Pavlovic I, Ranin J, Todorovic M, Nikolic S, Jevtovic D, Stanojevic M. Forensic application of phylogenetic analyses - Exploration of suspected HIV-1 transmission case. *Forensic Sci Int Genet.* 2017; 27:100-105.
2. **Siljic M**, Salemovic D, Jevtovic D, Pesic-Pavlovic I, Zerjav S, Nikolic V, Ranin J, Stanojevic M. Tracing the origin and dynamics of HIV-1 epidemic in Serbia. *Arch biol sci.* 2014; 66:507-515.
3. Stanojevic M, **Siljic M**, Salemovic D, Pesic-Pavlovic I, Zerjav S, Nikolic V, Ranin J, Jevtovic D. Ten Years Survey of Primary HIV-1 Resistance in Serbia - the Occurrence of Multiclass Resistance. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2014; 7:634-641.

4. **Siljic M**, Salemovic D, Jevtovic D, Pesic-Pavlovic I, Zerjav S, Nikolic V, Ranin J, Stanojevic M. Molecular typing of the local HIV-1 epidemic in Serbia. *Infect Genet Evol.* 2013; 19:378-385.

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

Doktorska disertacija pod nazivom „Phylogenetic Analyses and Molecular Characterization of Human Immunodeficiency Virus in Serbia“; „Filogenetska analiza i molekularna karakterizacija virusa humane imunodeficijencije u Srbiji“ kandidata Marine Šilji, mastera biologije, predstavlja originalan i značajan naučni doprinos razumevanju molekularne epidemiologije, transmisione dinamike i evolucije HIV-a u Srbiji. Sve analize urađene su primenom savremenih metoda molekularne virusologije i filogenetske analize. Ovo istraživanje pruža informacije o prevalenciji i distribuciji podtipova i cirkulišu ih rekombinantnih formi u Srbiji. Detaljnim filogenetskim istraživanjem ove studije sprovedenim prvi put u Srbiji analizom velikog seta polisekvenki pokazano je prisustvo velikog broja transmisivnih lanaca HIV infekcije. Procenjuje se da kod blizu polovine inficiranih osoba HIV infekcija nije dijagnostikovana, zbog čega je identifikacija puteva transmisije izuzetno značajna u cilju javno zdravstvenog nadzora. U ovoj doktorskoj disertaciji posebna pažnja usmerena je na preciznu definiciju filogenetskih kriterijuma za identifikaciju transmisivnih klastera, što je ključno u interpretaciji analiza ali i dalje predmet brojnih debata. Ovo istraživanje pokazalo je da je širenje HIV-1 podtip B epidemije u lokalnim transmisivnim mrežama pošlo od početkom devedesetih godina prošlog veka. Iz rezultata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji proizilaze zaključci da je u skorijem periodu najzastupljeniji put širenja HIV epidemije u Srbiji MSM kontakt, čime epidemija sa ovih prostora postaje sličnija HIV epidemiji u zemljama Zapadne Evrope. Filogenetsko ispitivanje dinamike HIV epidemije ukazalo je na razliku u dinamici epidemije za podtipove B, C i G. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na značaj stalnog molekularnog nadzora promena HIV epidemije, u cilju njenog boljeg sagledavanja, kontrole i, najvažnije, prevenciji HIV infekcije u Srbiji.

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 i zaključci.



Na osnovu svega navedenog, i imaju i u vidu dosadašnji nau ni rad kandidata, Marine Šilji , master biologa, komisija predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju Marine Šilji , i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 8.2.2017.godine

**lanovi Komisije:**

Prof. dr or e Jevtovi

---

Prof. drTanja Jovanovi

---

Prof. dr Aleksandra Kneževi

---

Dr Sanja Gliši , Viši nau ni saradnik

---

Prof. drAnne-Mieke Vandamme

---

**Mentor:**

Prof. dr Maja Stanojevi

---