

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta, održanoj dana 9.11.2017. godine (broj 5940/13), imenovana je Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom:

„Filogenetska analiza molekularne evolucije hantavirusa u različitim vrstama glodara“

kandidata Valentine Ćirković, master biologa, zaposlene na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na naučno istraživačkom projektu finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Mentori doktorske disertacije su Prof. dr Maja Stanojević i Dr Gorana Stamenković, viši naučni saradnik.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Aleksandra Knežević, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Anna Papa-Konidari, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Solunu
3. Dr Sanja Glišić, Viši naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča“
4. Dr Snežana Tomanović, Viši naučni saradnik Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu
5. Prof. dr Ivana Lazarević, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

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 Valentine Ćirković „Filogenetska analiza molekularne evolucije hantavirusa u različitim vrstama glodara“ je napisana na 155 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: Uvod, Ciljevi rada, Materijali i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci, Literatura i Prilozi. U disertaciji se nalazi ukupno 8 tabela i 33 grafička priloga. Doktorska disertacija sadrži sažetak na engleskom i srpskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji. Poglavlje Literatura sadrži spisak od 215 referenci citiranih u disertaciji i listu skraćenica.

Uvod je podeljen na sedam potpoglavlja. Prvo potpoglavlje opisuje istorijat otkrića hantavirusa, uzročnika hemoragijske groznice. U drugom potpoglavlju dat je pregled klasifikacije hantavirusa zajedno sa njihovom geografskom distribucijom. Treće potpoglavlje sadrži detaljan opis građe virusne čestice kao i karakteristike replikativnog ciklusa hantavirusa. Četvrto potpoglavlje sadrži opis patogeneze bolesti izazvanih hantavirusom, uključujući hemoragijsku groznicu sa bubrežnim sindromom (HGBS) i hantavirusni pulmonarni sindrom (HPS). Ekologija hantavirusa je predstavljena u petom potpoglavlju. Hantavirusi se ne prenose putem artropodnih vektora, već trajno cirkulišu u svojim prirodnim rezervoarima koji obuhvataju glodare, insektivore i slepe miševe. Trenutna epidemiološka situacija u zemljama Balkanskog regiona je detaljno opisana u šestom potpoglavlju. Genetički drift, resortiranje i rekombinacija, kao glavni evolucioni mehanizmi odgovorni za genetičku raznovrsnost hantavirusa koji poseduju negativnu jednolančanu RNK, su opisani u poslednjem, sedmom potpoglavlju. U ovom potpoglavlju su predstavljene i metode filogenetske analize koje se primenjuju u cilju analize evolucije hantavirusa.

Ciljevi, koji su precizno definisani obuhvataju istraživanje prisustva i genetičku karakterizaciju hantavirusa izolovanih iz raznih prirodnih rezervoara (glodara) i analizu molekularne evolucije hantavirusa primenom metoda filogenetske analize uključujući filodinamsku i filogeografsku analizu. Ispitivanje prisustva homologe rekombinacije u okviru hantavirusnog genoma je takođe bio jedan od zadatih ciljeva.

U poglavlju **Materijali i metode** dat je detaljan opis istraživanja koje je dizajnirano kao studija u kojoj su primenjene molekularna i filogenetska analiza hantavirusa detektovanih u različitim vrstama glodara.

U poglavlju **Rezultati** svi dobijeni rezultati su prikazani smišljeno i jasno. Ovo poglavlje je organizovano u osam potpoglavlja sa 29 priloga (6 tabela i 23 grafička priloga) uz propratni tekst.

U poglavlju **Diskusija** su poređeni rezultati dobijeni u prethodnim studijama sa rezultatima iz ove studije. Na osnovu ovog poglavlja, kandidat je izneo svoje jedinstvene zaključke .

U poglavlju **Zaključci** navedeni su najznačajniji zaključci, koji su izvedeni iz rezultata i zadatih ciljeva.

U poglavlju **Literatura** navedeno je 208 bibliografskih jedinica iz stranih i domaćih publikacija koje su citirane prema opšteprihvaćenim standardima.

B) KRATAK PREGLED DOBIJENIH REZULTATA

Od 110 jedinki uključenih u molekularnu analizu u šest uzoraka je identifikovano prisustvo L segmenta hantavirusa. Na osnovu BLAST analize, sekvence izolovane iz *A. flavicollis*-a, *A. agrarius*-a i *G. glis*-a su identifikovane kao Dobrava-Beograd virus (DOBV), dok je sekvenca izolovana iz *M. arvalis*-a identifikovana kao Tula virus (TULV).

Filogenetska analiza seta sekvenci za L segment potvrdila je prethodno dobijene rezultate primenom BLAST analize. Ukupna nukleotidna distanca na nivou L segmenta, izračunata na osnovu seta od 37 sekvenci L segmenta DOBV, je iznosila 10.81%. U filogenetskom stablu, konstruisanom primenom metoda Bajesove statistike, izolovane sekvence su se klasterovale zajedno sa sekvencama iz Grčke, Slovenije i Turske koje su definisane kao Dobrava genotip.

Filogenetska analiza na nivou M segmenta DOBV je obuhvatila 13 sekvenci preuzetih iz NCBI baze podataka i 3 nove sekvence izolovane iz *A. flavicollis*-a. Ukupna nukleotidna distanca iznosila je 15.07%. U filogenetskom stablu, konstruisanom primenom metoda Bajesove statistike, sva tri srpska izolata su se klasterovala takođe zajedno u okviru Dobrava genotipa.

U filogenetsku analizu seta sekvenci S segmenta DOBV bilo je uključeno 180 izolata (364nt to 855nt). U analizu je bilo uključeno 16 sekvenci iz Srbije, od kojih su četiri izolovane iz životinja (*A. flavicollis*, *A. agrarius* i *G. glis*), dok je 12 analiziranih sekvenci izolovanih iz humanog materijala preuzeto iz NCBI baze podataka. Ukupna nukleotidna distanca na nivou S segmenta iznosila je 7.95%. Sekvence koje su izolovane iz *A. agrarius* i *G. glis* su se klasterovale zajedno sa sekvencama izolovanim iz *A. flavicollis* i humanog materijala u okviru Dobrava genotipa. Kod vrste *G. glis*, kao ni bilo koje druge vrsta iz familije *Gliride*, do sada nije bilo pokazano prisustvo hantavirusne infekcije. Takođe, analizom prisustva DOBV u miševima iz roda *Apodemus* izlovljenim u regiji planine Tare u zapadnoj Srbiji, po prvi put je dokazano prisustvo ovog virusa u animalnim rezervoarima u toj regiji.

U okviru ove doktorske disertacije analizirana je i molekularna evolucija TULV (u analizu je bila uključena jedna nova sekvenca zajedno sa 65 sekvenci preuzetih sa NCBI baze podataka). Nukleotidna distanca, koja je izračunata na osnovu 21 sekvence L segmenta TULV, iznosila je 16,23%. U filogenetskom stablu, konstruisanom na osnovu seta sekvenci L segmenta, novodobijena TULV sekvenca iz Srbije se blisko klasterovala sa sekvencama iz Nemačke.

U filogenetsku analizu sekvenci S segmenta TULV, bila su uključena dva srpska izolata (jedan izolat dobijen iz *M. subterranea* i jedan izolat dobijen iz *M. arvalisa*) zajedno sa još 64 sekvence preuzete sa NCBI baze podataka. Ukupna nukleotidna distanca iznosila je 16,23%. U Filogenetskom stablu konstruisanom na osnovu 66 sekvenci, čija je dužina 570 nukleotida (400-966 nukleotida), jasno se vidi postojanje nekoliko klastera koji odgovaraju teritoriji sa koje su sekvence izolovane. Srpski izolati su se jasno klasterovali sa izolatima (Y13980 and Y13979) koji su poreklom iz istočne Slovačke.

U cilju ispitivanja potencijalne rekombinacije, set od 22 sekvence S segmenta (dužina alajmenta je bila 928 nt) je analiziran. Analiza prisustva rekombinacije bootscan metodom ukazala je da su obe sekvence iz Srbije potencijalni rekombinanti. Dobijeni rezultati su pokazali

postojanje dva rekombinaciona pika čije su butstrep vrednosti bile veće od 70% u oba srpska izolata: prvi pik koji je odgovarao regionu S segmenta na poziciji između 600 i 750 nukleotida se klasterovao zajedno sa sekvencama koje su poreklom iz Češke Republike i zapadne Slovačke i drugi pik koji je odgovarao regionu S segmenta na poziciji između 750 i 950 nukleotida se klasterovao zajedno sa sekvencama iz Rusije. Parcijalna filogenetska stabla („podstabla“), koja su konstruisana na osnovu dobijenih pikova bila su u jasnoj korelaciji sa rezultatima dobijenim bootscan analizom.

Filogenija S segmenta TULV, uključujući populacionu filodinamiku, evolucionu stopu i filogeografiju, analizirana je primenom Markovog lanca Monte Karlo koji je implementiran u program BEAST v 1.8.4. Procenjena substitucion stopa je iznosila 1.787×10^{-3} . (SE of mean = 1.72×10^{-4} ; 95% HPD interval: $8.75 \times 10^{-4} - 2.55 \times 10^{-3}$).

Na osnovu filogeografske analize, najverovatnije mesto početka širenja TULV je centralna Azija (Kazakstan). Virus se dalje širio na teritoriji Rusije, a zatim i Evrope. Takođe, filogeografska analiza je pokazala da je TULV iz Rusije jednom prešao u Evropu i zatim se lokalno širio po Evropi. Dobijeni rezultati takođe ukazuju na to da je virus ušao u Srbiju jednom iz regije Češke Republike i dalje se lokalno širio i zatim migrirao u Slovačku.

C) UPOREDNA ANALIZA DOKTORSKE DISERTACIJE SA REZULTATIMA IZ LITERATURE

Molekularno istraživanje koje je obuhvatilo 110 uzoraka glodara prikupljenih u periodu od 2007-2011 čini ovu studiju najobimnijom molekularnom studijom hantavirusa u Srbiji do sada. Ova studija je obuhvatila molekularno ispitivanje i genetičku karakterizaciju hantavirusa, izolovanih iz glodara koji pripadaju različitim podfamilijama (*Murinae*, *Arvicolinae* i *Glirinae*). Od 110 jedinki uključenih u analizu u pet uzoraka je identifikovano prisustvo DOBV (tri *A. flavicollis*-a, jedan *A. agrarius* i jedan *G. glis*), dok je u jednom uzorku (*M. arvalis*) identifikovano prisustvo TULV. Glodari koji su bili pozitivni na prisustvo DOBV su lovljeni u zapadnoj (tri *A. flavicollis*-a) i centralnoj (*A. agrarius* i jedan *G. glis*) Srbiji. *M. arvalis*, koji je bio TUL pozitivan, ulovljen je takođe u centralnoj Srbiji.

Filogenija, zasnovana na različitim setovima sekvenci za L, M i S segmenta DOBV, a koja je dobijena primenom različitih metoda filogenetske analize, se značajno podudaraju. Sve sekvence koje su poreklom iz Srbije, uključujući i one dobijene u ovom istraživanju, pripadaju Dobrava genotipu. Pozicije sekvenci u filogenetskom stablu konstruisanom za L segment, koje su izolovane iz *A. agrarius*-a i *G. glis*-a, ukazuju na mogućnost preliivanja infekcije DOBV iz jednog domaćina u drugi. U filogenetskom stablu, konstruisanom na osnovu 180 parcijalnih sekvenci S segmenta, sve sekvence poreklom iz Srbije su se klasterovale zajedno nezavisno od domaćina iz kog su izolovane kao i godine prikupljanja uzoraka. Slična topologija filogenetskog stabla, konstruisanog na osnovu S segmenta, je opisana i u prethodnim studijama (Klempa et al., 2005; Papa et al., 2006; Papa 2012; Schlegel et al., 2009).

Dobijeni rezultati, koji su zasnovani na filogenetskoj analizi sva tri segmenta DOBV, ukazuju na to da je ovaj virus jedan od glavnih cirkulišućih hantavirusa u Srbiji. Detekcija DOBV u *A. agrarius*-u i *A. faviacollis*-u je u skladu sa činjenicom da su ovi glodari iz roda *Apodemus* najzastupljeniji u Srbiji. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u prethodnim reserološkim i molekularnim studijama (Gligic et al., 1988; Papa, 2012).

Jedna od sekvenci DOBV izolovana je iz *G. glis*-a. Ranije, ova vrsta glodara kao niti bilo koja druga vrsta u okviru familije *Gliridae* do sada nije bila povezana sa DOBV. Dobijeni rezultat ukazuje na neuobičajan proces preliivanja infekcije (engl. Spillover) DOBV; dalja istraživanja će pokazati značaj preliivanja DOBV infekcije u glodare iz familije *Gliridae* u Srbiji.

U ovoj studiji je takođe opisano potencijalno novo žarište hantavirusa, koje se nalazi na planini Tara, u zapadnoj Srbiji. Sva tri hantavirus pozitivna uzorka *A. flavicollis*-a su ulovljena na planini Tari.

Filogenetska analiza setova sekvenci za L i S segment TULV pokazuje jasno postojanje klastera koji odgovaraju teritoriji sa koje su sekvence izolovane, što je prethodno pokazano za većinu hantavirusa (Avsic-Zupanc et al., 2000; Plyusnin et al., 1996)

U ovoj studiji takođe je opisano prisustvo rekombinacije na nivou S segmenta TULV u srpskim izolatima, Sličan obrazac rekombinacije je ranije opisan u izolatima TULV koji su poreklom iz istočne Slovačke (Sibold et al., 1999).

Geografska distribucija hantavirusa je istraživana u nekoliko studija do sada (Bennett et al., 2014, Torres-Perez et al., 2011, Souza et al., 2014). Rezultati neki studija su “postavili” potencijalni mesto početka širenja hantavirusa u Aziji uz dalje lokalno i globalno širenje virusa. Rezultati filogeografske analize dobijeni u ovoj studiji predpostavljaju da se mesto početka širenja TULV nalazi u centralnoj Aziji (Kazakstan). TULV se zatim lokalno širio na teritoriji Rusije i Kazakstana, a zatim je došlo do jednokratnog ulaza TULV u centralnu Evropu (Češka Republika). Ubrzo zatim, TULV je ušao u Srbiju kao rekombinantni soj i dalje se širio u dva pravca: lokalno i u istočnu Slovačku. Ovi rezultati su u skladu sa činjenicom da su srpski rekombinantni sojevi nastali kao rezultat rekombinacije sekvenci koje su poreklom iz Rusije i Češke Republike.

D) RADOVI PRIHVAĆENI ZA PUBLIKACIJU KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

1. Stamenkovic G., **Nikolic V.**, Blagojevic J., Bugarski-Stanojevic V., Adnadevic T., Stanojevic M., Vujosevic M. Genetic analysis of dobrava-belgrade virus from western serbia - a newly detected focus in the Balkan peninsula. 2015, Zoonoses and Public Health, 62(2):141-50 (M21a, IF- 2.574)
2. Stanojevic M, **Nikolic V**, Stajkovic N, Stamenkovic G, Bozovic B, Cekanac R, Marusic P, Gligic A. Genetic detection of Dobrava-Belgrade hantavirus in the edible dormouse (*Glis glis*) in central Serbia. *Epidemiol Infect.* 2015; 143(2):400-4. (M21, IF- 2.574)
3. **Nikolic V.**, Stajkovic N., Stamenkovic G., Cekanac R., Marusic P., Siljic M., Gligic A., Stanojevic M. Evidence of recombination in Tula virus strains from Serbia. *Infection, Genetics and Evolution* 2014; 21: 472-478.
4. **Nikolić, V.**, Stajković, N., Stamenković, G., Cekanac, R., Marušić, P., Jovanović, N, Krstić, M, Mladenović, J., Šiljić, M., Gligić, A., Stanojević, M. Comparative

phylogenetic analysis of dobrava-belgrade virus L and S genetic segments isolated from an animal reservoir in Serbia. Archives of Biological Sciences 2014; 66: 497-506.

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

Doktorska disertacija pod nazivom „Phylogenetic Analysis of Hantaviral Molecular Evolution in Different Rodent Species“ / „Filogenetska analiza molekularne evolucije hantavirusa u različitim vrstama glodara“ kandidata Valentine Ćirković, mastera biologije, predstavlja originalan i značajan naučni doprinos razumevanju evolucione dinamike, rekombinacije i puteva migracije hantavirusa. Sve analize urađene su primenom savremenih metoda molekularne virusologije i filogenetske analize.

U ovoj studiji je molekularna analiza hantavirusa urađena na najvećem broju uzoraka do sada u Srbiji, a prisustvo hantavirusne RNK je detektovano u četiri različite vrste glodara (*A. flavicollis*, *A. agrarius*, *G. glis* i *M. arvalis*). Ranije, *G. Glis* kao niti bilo koja druga vrsta u okviru familije *Gliridae* do sada nije bila povezana sa DOBV, ukazujući na potencijalni novi rezervoar ili moguće prelivanje infekcije (engl. spillover). Takođe, analizom prisustva DOBV u miševima iz roda *Apodemus* otkriveno je prisustvo ovog virusa u regiji planine Tare. Do sada, na teritoriji zapadne Srbije gde se i nalazi planina Tara, nije bilo detektovano prisustvo DOBV u animalnim rezervoarima. U ovoj studiji takođe je opisano prisustvo rekombinacije na nivou S segmenta TULV u sojevima iz Srbije. Iako se rekombinacija smatra retkim događajem u molekularnoj evoluciji virusa sa negativnim RNK genomom, rezultati dobijeni u ovoj studiji potvrdili su prisustvo ovog evolucionog mehanizma u geografski udaljenim regionima Evrope. Rezultati filogeografske analize sekvenci S segmenta TULV su pokazali jednokratni ulaz virusa u Evropu iz Centralne Azije sa složenim obrazcem dalje migracije, uključujući jednokratni ulazak virusa na teritoriju Srbije sa daljim lokalnim širenjem kao i u pravcu teritorije Slovačke.

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, Valentine Ćirković, master biologa, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju Valentine Ćirković, i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 19.2.2018.godine