

**NASTAVNO – NAUČNOM VEĆU STOMATOLOŠKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na redovnoj sednici Nastavno – naučnog veća Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu održanoj 27.03.2018. godine, imenovana je Komisija u sastavu:

Prof. dr Elena Kršljak, Stomatološki fakultet, Beograd

Prof. dr Zoran Aleksić, Stomatološki fakultet, Beograd

Doc. dr Jelena Roganović, Stomatološki fakultet, Beograd

Prof. dr Silvio De Luka, Medicinski fakultet, Beograd

Prof. dr Đorđe Jevtović, Medicinski fakultet, Beograd

za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom **UTICAJ HIV INFEKCIJE I ANTIRETROVIRUSNIH LEKOVA NA STARENJE PARODONTALNIH TKIVA**

Kandidat: dr Boško Toljić

Mentor: Prof. dr Jelena Milašin

Komentor: Prof. dr Gordana Dragović Lukić

Imenovana Komisija je proučila doktorsku disertaciju i podnosi Nastavno – naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

**IZVEŠTAJ**

Kandidat dr Boško Toljić rođen je 7.1.1984. godine u Prijepolju, Republika Srbija. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 2003. godine i diplomirao u oktobru 2009. sa prosečnom ocenom 9,36. Lekarski staž je obavio u Domu zdravlja Zemun, a državni ispit je položio u januaru 2011. godine. Doktorske studije je upisao u oktobru 2010. godine i položio sve ispite predviđene nastavnim planom i programom sa prosečnom ocenom 9,68. Od decembra 2011. godine angažovan je kao istraživač pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod nazivom “Genetička kontrola i molekularni mehanizmi u malignim, inflamatornim i razvojnim patologijama orofacijalne regije”, evidencioni broj 175075. Od školske 2011/2012. godine kandidat je bio angažovan u obavljanju praktične nastave na predmetu Opšta i oralna fiziologija, u okviru integrisanih

akademskih studija Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Od oktobra 2016. godine radi kao asistent na predmetu Opšta i oralna fiziologija.

## **A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije**

Doktorska disertacija dr Boška Toljića pod nazivom **UTICAJ HIV INFEKCIJE I ANTIRETROVIRUSNIH LEKOVA NA STARENJE PARODONTALNIH TKIVA** napisana je na 105 strana i ilustrovana sa 12 tabela i 43 slike. Disertacija sadrži: sažetak na srpskom i engleskom jeziku, uvod, ciljeve istraživanja, materijal i metode, rezultate, diskusiju, zaključke i literaturu.

U **Uvodu** kandidat opisuje karakteristike procesa starenja tkiva i organa usne duplje ali i organizma u celini, zatim teorije starenja kao i do sada poznate biomarkere ovog procesa. Poseban akcenat stavlja na sledeće biomarkere starenja - relativnu dužinu telomera i parametre metabolizma gvožđa. Opisana je struktura, uloga i mehanizam održavanja dužine telomera koje se skraćuju sa svakom ćelijskom deobom. Od parametara metabolizma gvožđa, kao mikroelementa koji se tokom života kontinuirano nakuplja u ćelijama organizma jer ne postoje adekvatni mehanizmi za njegovu eliminaciju, u studiju su uključeni i razmatrani slobodno gvožđe, ukupan kapacitet transferina za vezivanje gvožđa, saturacija transferina, kao i koncentracije transferina i feritina u serumu. U ovom poglavlju kandidat opisuje i kvalitativne i kvantitativne promene oralnog mikrobioma koje se dešavaju tokom procesa starenja. Takođe, opisani su i mehanizmi kojima infekcija virusom humane imunodeficijencije, ali i terapija antiretrovirusnim lekovima, mogu uticati na proces starenja.

U poglavlju **Ciljevi istraživanja** precizno su definisani ciljevi studije i hipoteza istraživanja. Ciljevi istraživanja su: Odrediti relativnu dužinu telomera leukocita periferne krvi kod dve grupe ispitanika (HIV-om neinficiranih osoba i osoba sa HIV-infekcijom); Odrediti serumske parametre metabolizma gvožđa kod obe grupe ispitanika; Ustanoviti mikrobiološki sastav usne duplje kod obe grupe ispitanika; Utvrditi kliničke parametre stanja parodontalnih tkiva kod obe grupe ispitanika; Ispitati povezanost između dobijenih vrednosti dužine telomera i parametara metabolizma gvožđa sa primenom različitih antiretrovirusnih lekova, parodontalnim statusom ispitanika, kao i sa statusom bakterijske flore kod obe grupe ispitanika.

Hipoteza: HIV infekcija i primena antiretrovirusne terapije utiču na proces starenja organizma što se posledično može odraziti i na stanje parodontalnih tkiva.

U poglavlju **Materijal i metode** za ovu studiju preseka, jasno su definisani dizajn studije i selekcija pacijenata, a zatim su detaljno predstavljene sve molekularno-genetičke, biohemijske i kliničke metode korišćene u istraživanju. Studija je obuhvatila dve grupe ispitanika: eksperimentalnu i kontrolnu. Eksperimentalnu grupu je sačinjavalo 105 HIV-om inficiranih osoba muškog pola lečenih na Odeljenju za HIV i AIDS Klinike za tropske i infektivne bolesti "Prof. dr Kosta Todorović" Kliničkog centra Srbije u Beogradu, dok je kontrolnu grupu sačinjavalo 100 dobrovoljnih davalaca krvi muškog pola sa Instituta za transfuziologiju Srbije u Beogradu. Pacijenti su bili podeljeni u dve starosne grupe: mlađu - do 35 godina života i stariju - preko 50 godina života. Od pacijenata je najpre dobijena pisana saglasnost za istraživanje, a zatim su prikupljeni odgovarajući anamnestički podaci, uzorci krvi i brisevi obrazne sluzokože, a urađen im je i detaljan parodontološki pregled. Iz leukocita periferne krvi izolovana je genomna DNK koja je korišćena za određivanje relativne dužine telomera, dok su iz krvi određivani parametri metabolizma gvožđa, broj CD4 pozitivnih limfocita i broj virusnih kopija. Iz briseva oralne sluzokože izolovana je bakterijska DNK koja je korišćena za određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava mikroflore usne duplje. Metodom lančane reakcije polimeraze detektovani su sledeći mikroorganizmi: *Prevotella intermedia* (Pi), *Peptostreptococcus micros* (Pm), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Eikenella corrodens* (Ec), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Tannerella forsythia* (Tf) i *Treponema denticola* (Td). Parodontološkim pregledom je procenjivano stanje potpornog aparata zuba. Statistička obrada prikupljenih podataka vršena je pomoću programskog paketa SPSS verzija 20.0.

U poglavlju **Rezultati** prvo su analizirane opšte karakteristike ispitivanih grupa, a zatim su tabelarno prikazane vrednosti relativne dužine telomera, kao i dijagrami koji opisuju vrednosti parametara metabolizma gvožđa kod ispitivanih pacijenata. Dobijeni su zanimljivi rezultati i suprotni očekivanjima. Ispostavilo se naime da su telomere kod HIV+ osoba (u obe starosne grupe) u proseku duže nego kod neinficiranih ispitanika. Pored toga, ustanovljeno je da mlađi HIV+ ispitanici koji su na antiretrovirusnoj terapiji imaju kraće telomere od onih koji nisu na terapiji. U nastavku su analizirane korelacije između broja virusnih kopija i parametara relativne dužine telomera i metabolizma gvožđa i nađene su značajne asocijacije. Zastupljenost parodontopatogenih mikroorganizama u ispitivanim grupama, kao i njihova dobno zavisna distribucija, prikazane su grafički, dok je kvantitativni sastav oralne

mikroflora prikazan tabelarno. Utvrđene su statistički značajne kvalitativne i kvantitativne razlike u distribuciji pojedinih patogenih mikroorganizama između HIV+ i HIV- ispitanika, kako posmatrano u celini, tako i posmatrano u odnosu na pripadnost različitim starosnim grupama. Na kraju ovog poglavlja analiziran je uticaj starosnog doba na parodontalni status ispitanika i ustanovljeno je da su razlike u parodontalnim parametrima izraženije između mlađih i starijih ispitanika u grupi HIV+ osoba, nego kod neinficiranih osoba.

U poglavlju **Diskusija** su razmatrani mehanizmi kojima parodontalni patogeni učestvuju u formiranju oralnog biofilma, sa posebnim osvrtom na kvalitativne i kvantitativne promene njegovog sastava tokom procesa starenja. Kandidat ističe da promene u strukturi oralnih tkiva, kao i redukcija imunog odgovora domaćina koje se javljaju sa starenjem imaju uticaja na kompoziciju oralne mikroflora. Takođe su diskutovani i faktori virulencije kojim ovi mikroorganizmi dovode do destrukcije parodontalnih tkiva. U drugom delu ovog poglavlja diskutovane su promene na tkivima usne duplje koje se javljaju kod HIV-om inficiranih osoba na antiretrovirusnoj terapiji i poređene sa dobno zavisnim promenama ovih tkiva kod HIV-om neinficiranih ispitanika. Promene su opisivane na kliničkom, histološkom i molekularnom nivou. Kandidat navodi da HIV-infekcija i starenje dovode do značajnog povećanja broja parodontopatogena kod ispitivanih grupa i da se sastav oralne mikroflora znatno menja kod starijih pacijenata, ali i kod pacijenata sa HIV-infekcijom što upućuje na brže starenje oralnih struktura kod HIV-om inficiranih osoba. Telomere, kao biomarkeri starenja, su kraće kod starijih u odnosu na mlađe ispitanike, što je u skladu sa njihovim “trošenjem” sa svakom ćelijskom deobom, ali je otkriven i iznenađujući rezultat da su telomere kod HIV-om inficiranih pacijenata duže nego kod neinficiranih ispitanika. Kandidat ovo objašnjava delovanjem virusa na aktivaciju humane telomeraze ili mogućim delovanjem reverzne transkriptaze virusa na humanu DNK. Interesantno je i to što su pacijenti sa HIV-infekcijom koji nisu primali antiretrovirusnu terapiju imali duže telomere od HIV-om inficiranih pacijenata koji su bili na različitim antiretrovirusnim terapijskim režimima što govori o potencijalno lošem uticaju ovih lekova na telomere ili ubrzanom procesu starenja organizma. Uzimajući u obzir parametre metabolizma gvožđa, pokazano je nakupljanje ovog elementa u organizmu u toku starenja što je bilo posebno naglašeno kod HIV-om inficiranih pacijenata. Dalje, parametri stanja parodontalnih tkiva imali su značajno veće vrednosti kod HIV-om inficiranih pacijenata u odnosu na neinficirane ispitanike što se može objasniti samom infekcijom, primenom antiretrovirusnih lekova ili “agresivnijom” mikroflorom koja se javlja i kod starijih neinficiranih osoba.

**Zaključci** su izneti sažeto i jasno, po redosledu prikazanih rezultata: (1) relativna dužina telomera kod pacijenata sa HIV-infekcijom je veća od relativne dužine telomera neinficiranih pacijenata što se može dovesti u vezu sa uvećanjem aktivnosti humane telomeraze pod dejstvom virusa; (2) u grupi HIV-om inficiranih pacijenata najveće dužine telomera su imali pacijenti koji nisu primali antiretrovirusnu terapiju što ukazuje na negativan uticaj ove terapije na dužinu telomera; (3) vrednosti parametara metabolizma gvožđa: serumsko gvožđe, ukupni kapacitet za vezivanje gvožđa, saturacija transferina su bile niže kod starijih ispitanika u obe ispitivane grupe; (4) koncentracija transferina je takođe bila niža kod starijih ispitanika u HIV-neinficiranoj grupi ispitanika; (5) koncentracija feritina je bila viša kod starijih osoba u obe ispitivane grupe što govori o nakupljanju ovog elementa u organizmu tokom starenja; (6) starenjem dolazi do uvećanja broja i promene zastupljenosti parodontopatogena u usnoj duplji; slična pojava je viđena, ali u nešto ranijoj životnoj dobi, i kod HIV-om inficiranih pacijenata pa ovaj nalaz sugerise da se dobnno zavisne promene u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu oralne flore ranije javljaju kod HIV-om inficiranih pacijenata; (7) oralne manifestacije HIV-infekcije su češće kod starijih HIV+ pacijenata što ukazuje na slabljenje odbrambenih snaga organizma tokom starenja; (8) parodontološki parametri su bili statistički značajno viši kod starijih u odnosu na mlađe HIV-om inficirane osobe što govori o većoj destrukciji parodontalnih tkiva kod osoba sa HIV-infekcijom u toku starenja.

Poglavlje **Literatura** sadrži spisak od 244 adekvatno citirane reference iz relevantne naučne literature.

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

Ispitivanje relativne dužine telomera pokazalo je da više telomernih ponovaka (duže telomere) imaju mlađi ispitanici u odnosu na starije i u eksperimentalnoj (0,87 naspram 0,79) i u kontrolnoj grupi (0,83 naspram 0,69), s tim što je razlika u dužini bila statistički značajna samo u grupi HIV-om neinficiranih pacijenata. Interesantan je nalaz da su telomere duže kod HIV-om inficiranih u odnosu na neinficirane pacijente u obe starosne grupe, međutim ova razlika nije dostigla statističku značajnost. Pokazano je i da su pacijenti koji su bili na različitim antiretrovirusnim terapijskim režimima imali kraće telomere ( $0,80 \pm 0,30$ ) u odnosu na pacijente bez terapije ( $1,22 \pm 0,56$ ) što je bilo statistički značajno. Podeljeno po različitim terapijskim modalitetima, najkraće telomere imali su ispitanici koji su lečeni kombinacijom proteaznih inhibitora i inhibitora integraze (0,51), dok su duže telomere imali

pacijenti na inhibitorima integraze (0,66) i pacijenti lečeni kombinacijom inhibitora reverzne transkriptaze i proteaznih inhibitora ( $0,76 \pm 0,33$ ). Najduže telomere imali su pacijenti koji su bili na kombinovanoj terapiji inhibitora reverzne transkriptaze ( $0,83 \pm 0,30$ ). Interesantan je i nalaz da postoji statistički značajna pozitivna korelacija između dužine telomera i broja virusnih čestica u krvi HIV-om inficirane osobe. Uzimajući u obzir parametre metabolizma gvožđa kao biomarkere starenja pokazano je da je serumska koncentracija gvožđa niža kod starijih u odnosu na mlađe ispitanike i u eksperimentalnoj ( $90,36 \pm 25,60$  naspram  $98,62 \pm 39,93 \mu\text{g/dl}$ ) i u kontrolnoj grupi ( $92,82 \pm 28,80$  naspram  $118,72 \pm 38,04 \mu\text{g/dl}$ ). HIV-om inficirani pacijenti su imali niže koncentracije serumskog gvožđa u odnosu na ispitanike kontrolne grupe i u mlađoj i u starijoj populaciji. Statistička značajnost je uočena samo među kontrolnim ispitanicima različite starosne dobi. Ukupni kapacitet vezivanja gvožđa bio je niži kod starijih ispitanika u odnosu na mlade, ali i kod HIV-om inficiranih pacijenata u odnosu na neinficirane. Statistički značajna razlika je uočena u vrednostima ukupnog kapaciteta vezivanja gvožđa između starijih ( $328,97 \pm 38,58 \mu\text{g/dl}$ ) i mlađih ( $362,12 \pm 50,44 \mu\text{g/dl}$ ) neinficiranih pacijenata. Vrednosti saturacije transferina su takođe bile niže kod starijih u odnosu na mlađe ispitanike. Vrednosti saturacije transferina su bile niže i kod mlađih HIV-om inficiranih pacijenata u odnosu na mlađe neinficirane osobe, dok su stariji HIV-om inficirani pacijenti imali više vrednosti saturacije transferina u odnosu na neinficirane osobe iste starosne dobi. Ispitivanjem koncentracije transferina pokazano je da je ovaj nosač gvožđa manje prisutan u krvi HIV-inficiranih u odnosu na neinficirane ispitanike mlađe i starije životne dobi. Ova razlika je bila statistički značajna kod mlađih ispitanika ( $26,77 \pm 7,61 \mu\text{mol/l}$  naspram  $33,38 \pm 4,57 \mu\text{mol/l}$ ). Mlađi neinficirani ispitanici imali su značajno veće koncentracije serumskog transferina u odnosu na starije neinficirane ispitanike ( $33,38 \pm 4,57 \mu\text{mol/l}$  naspram  $30,48 \pm 4,36 \mu\text{mol/l}$ ). Suprotno, u eksperimentalnoj grupi više koncentracije transferina pokazane su kod starijih osoba (u odnosu na mlađe) ali to nije bilo statistički značajno. Konačno, parametar metabolizma gvožđa koji govori o njegovom nakupljanju u organizmu, feritin, je u skladu sa očekivanjima pokazao više vrednosti kod starijih osoba u obe ispitivane grupe. Dobno zavisna razlika u koncentraciji transferina bila je statistički značajna kod osoba sa HIV-infekcijom. Koncentracije feritina su bile statistički značajno veće kod HIV-om inficiranih pacijenata u odnosu na neinficirane i u mlađoj ( $134,03 \pm 121,88 \mu\text{g/l}$  naspram  $80,24 \pm 74,13 \mu\text{g/l}$ ) i u starijoj ( $161,64 \pm 95,89 \mu\text{g/l}$  naspram  $84,73 \pm 59,02 \mu\text{g/l}$ ) dobnoj grupi. Rezultati ove studije su pokazali i da su najzastupljeniji mikroorganizmi u svim ispitivanim grupama bili *P. intermedia* i *P. micros* dok je najređe detektovana bakterija bila *T. denticola*. Svi ispitivani mikroorganizmi su bili zastupljeniji kod starijih u odnosu na mlađe ispitanike. Zastupljenost parodontopatogena kod HIV-om inficiranih pacijenata je bila

veća kod starijih nego kod mlađih ispitanika. Razlika je bila statistički značajna između zastupljenosti *P. intermedia*-e, *E. corrodens*-a i *P. gingivalis*-a. U kontrolnoj grupi nije bilo statistički značajnih razlika u zastupljenosti ispitivanih parodontopatogena između starijih i mlađih osoba. Prevalenca parodontopatogenih mikroorganizama je bila statistički značajno veća kod HIV-om inficiranih pacijenata u odnosu na ispitanike kontrolne grupe, izuzev *T. denticola*-e. Distribucija bakterija kod neinficiranih ispitanika je opadala od *P. intermedia*-e do *T. denticola*-e u sledećem nizu  $Pi > Pm > Pg > Aa > Ec > Tf > Td$ , dok je kod HIV-om inficiranih pacijenata opadajući niz bio  $Pi > Pm > Ec > Pg > Tf > Aa > Td$ . Ukupan broj oralnih bakterija je bio veći kod starijih u odnosu na mlađe ispitanike i u eksperimentalnoj i u kontrolnoj grupi. Takođe, ukupan broj oralnih bakterija bio je veći kod HIV-om inficiranih osoba u odnosu na neinficirane parnjake u obe starosne grupe. U ovoj studiji je pokazano i da su oralne manifestacije HIV-infekcije, izuzev linearnog gingivalnog eritema koji je karakterističan za rane faze infekcije, češće kod starijih pacijenata. Kod pacijenata iz ove studije nisu uočeni nekrotizirajući stomatitis, čupasta leukoplakija i Kapoši sarkom. Svi parodontalni parametri su bili statistički značajno veći kod starijih u odnosu na mlađe pacijente eksperimentalne grupe. Nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima parodontalnih parametara između starijih i mlađih ispitanika neinficirane grupe iako su kod starijih ispitanika vrednosti parodontalnih parametara bile više. Sve izmerene vrednosti parodontalnih parametara, sa izuzetkom dubine parodontalnog džepa, su bile statistički značajno veće kod HIV-om inficiranih osoba u odnosu na neinficirane ispitanike.

### **C. Uporedna analiza doktorske disertacije sa podacima iz literature**

Ova studija je, prema našem saznanju, prva koja u istraživanju procesa starenja koristi biomarker delećih ćelija – telomere i biomarker starenja za ćelije koje se ne dele – parametre metabolizma gvožđa. Kombinacija ova dva, relativno lako dostupna, nezavisna biomarkera mogla bi bude jedna od metoda u izučavanju procesa starenja. Dalje, ovo je prva studija koja je pokazala duže telomere u leukocitima periferne krvi kod HIV-om inficiranih pacijenata u odnosu na neinficirane ispitanike iste starosne dobi. Ovaj rezultat je u skladu sa *in vitro* studijom iz 2012. godine koja navodi da virus humane imunodeficijencije podstiče telomeraznu aktivnost makrofaga i prezervira telomere štiteći ih od oksidativnog stresa (Reynoso, Wieser et al. 2012). Autori ovo objašnjavaju kao mehanizme kojima HIV čuva svoj rezervoar u organizmu. Nasuprot našem istraživanju nalaze se studije koje pokazuju ubrzano skraćivanje telomera kod osoba sa HIV-infekcijom (Côté, Soudeyns et al. 2012, Liu, Leung et al. 2015), kao i kod osoba koje su na antiretrovirusnoj terapiji (Smith, de Boer et al.

2012). U ovoj studiji je pokazano da pacijenti na kombinovanoj antiretrovirusnoj terapiji imaju kraće telomere u odnosu na “naivne” HIV-om inficirane pacijente i da dužina telomera opada idući od inhibitora reverzne transkriptaze, preko proteaznih inhibitora, kombinacije proteaznih inhibitora i inhibitora integraze, zatim inhibitora integraze, sve do kombinacije proteaznih inhibitora i inhibitora integraze. Ovo je u skladu sa istraživanjima Leeansyah-a i saradnika koji su kod mononuklearnih leukocita periferne krvi pronašli značajno skraćanje telomera nakon dodavanja antiretrovirusnih lekova u kulturu ćelija (Leeansyah, Cameron et al. 2013). Nasuprot ovom, dve studije iz 2014. godine ukazuju na to da antiretrovirusna terapija nema uticaja ni na telomeraznu aktivnost niti na dužinu telomera kod HIV-om inficiranih pacijenata (Solomon, Tennakoon et al. 2014, Zanet, Thorne et al. 2014).

Za objašnjenje mehanizma starenja kod ćelija koje se ne dele, kao npr. kod ćelija koje su zaustavljene u  $G_0$  fazi ćelijskog ciklusa, u ovoj studiji su praćeni parametri metabolizma gvožđa. Gvožđe je mikroelement neophodan za svaku ćeliju, ali zbog svoje reaktivnosti, višak gvožđa može da dovede do produkcije slobodnih radikala i na taj način da ošteti ćeliju (Emerit, Beaumont et al. 2001). Zbog toga se gvožđe u organizmu u najvećoj meri nalazi vezano za proteinske nosače koji umanjuju njegov štetan uticaj. “Viškovi” gvožđa se usled neadekvatnog mehanizma za izbacivanje ovog elementa iz organizma deponuju unutar ćelije i vezuju za intracelularni protein feritin koji predstavlja rezervu gvožđa u telu (Jacobs, Miller et al. 1972). Mehanizmi kojima feritin prelazi u cirkulaciju još uvek nisu detaljno razjašnjeni ali je jedan od najverovatnijih prelazak u krv oštećenje ćelije (Wesselius, Nelson et al. 1994). Pošto postoji dobra korelacija između intraćelijskog i serumskog feritina, određivanje koncentracije feritina iz krvi u dobroj meri odražava status rezervi gvožđa u organizmu (Jacobs, Miller et al. 1972). Rezultati ove studije su pokazali više vrednosti feritina u serumu starijih osoba u odnosu na mlađe ispitanike i u eksperimentalnoj i u kontrolnoj grupi. Ovo je u skladu sa drugim istraživanjima koja pokazuju porast nivoa feritina uporedo sa starenjem (Zacharski, Ornstein et al. 2000). Dodatno, nivoi feritina su bili značajno veći kod HIV-om inficiranih osoba u odnosu na neinficirane ispitanike i u mlađoj i u starijoj dobnoj grupi. Pretpostavka ove studije je da akumulacija rezervi gvožđa u organizmu predstavlja odraz ubrzanog starenja kod HIV-om inficiranih osoba. Sa druge strane, postoje i istraživanja koja ukazuju na pad depoa gvožđa nakon infekcije HIV-om (Drakesmith and Prentice 2008). U skladu sa ovim, jedno istraživanje je pokazalo nagli pad u koncentraciji feritina u krvi ispitanika nakon prekida antiretrovirusne terapije i sledstvenog uvećanja broja virusnih partikula (Boom, Kösters et al. 2007). Objašnjenje za ova stanja verovatno treba tražiti u povećanim zahtevima za gvožđem od strane novo-inficiranih ćelija. Dalja istraživanja su neophodna kako bi se rasvetlili ovi mehanizmi.



Promene u sastavu oralne mikroflore javljaju se uporedo sa starenjem tkiva i organa usne duplje (Zapata and Quagliariello 2015). Ove promene su precizno sinhronizovane sa promenama u strukturi oralnih tkiva, ali i funkcije prirodnog i stečenog imuniteta usne duplje tokom starenja. Pretpostavka ove studije je bila da će se kvalitativne i kvantitativne promene sastava oralne mikroflore, koje su inače odraz dobno zavisnih promena karakterističnih i za fiziološki proces starenja usne duplje kod neinficiranih pacijenata, kod HIV-om inficiranih osoba javiti ranije. Pokazano je da HIV-infekcija značajno uvećava “opterećenje” usne duplje mikroorganizmima i menja obrasce njihovog sastava. Najčešće detektovani oralni mikroorganizam u ovoj studiji bila je *P. intermedia*. Ovaj nalaz je u skladu sa ranijim istraživanjima rađenim na HIV-om inficiranim i neinficiranim pacijentima (Brito, Escalona et al. 2008, Li, Saxena et al. 2014). Ovaj mikroorganizam je bio statistički značajno više zastupljen u HIV-om inficiranoj grupi u odnosu na neinficirane ispitanike, ali i kod starijih u odnosu na mlađe HIV-om inficirane ispitanike. Drugi mikroorganizam po zastupljenosti bio je *P. micros*. Nevelik broj studija je pokazao prisustvo i potencijalno patogeni uticaj *P. micros*-a u HIV-infekciji iako ovaj mikroorganizam kod imunokompromitovanih pacijenata može biti veoma opasan. Prisustvo *P. micros*-a u subgingivalnoj niši HIV-om inficiranih pacijenata prvi put je opisano 1991 (Rams, Andriolo et al. 1991). U odnosu na tu studiju, mi smo pokazali veći porast u zastupljenosti *P. micros*-a u poređenju sa *P. intermedia*-om kod HIV-om inficiranih u odnosu na neinficirane pacijente. Demonstrirana je i jednaka distribucija *P. micros*-a između različitih dobnih grupa što je bilo u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije (Rams, Feik et al. 1992). Prevalenca *P. gingivalis*-a u usnoj duplji naših ispitanika se povećavala sa godinama što je dovedeno u vezu sa nakupljanjem gvožđa u organizmu tokom starenja, jer je poznato da metabolizam *P. gingivalis*-a u velikoj meri zavisi od ovog mikroelementa (Olczak, Simpson et al. 2005). U našoj studiji pokazana je i veća zastupljenost *P. gingivalis*-a i *T. forsythia*-e kod HIV-om inficiranih u odnosu na neinficirane ispitanike što je u skladu sa nalazima drugih (John, Xavier Graham Stephen et al. 2012, Pereira, Pavan et al. 2014). Eksperimentalni modeli pokazali su da prisustvo *P. gingivalis*-a u oralnom biofilmu dovodi i do veće zastupljenosti *P. intermedia*-e, *E. corrodens*, *P. micros*-a i pojave *A. actinomycetemcomitans*-a (Hasturk, Kantarci et al. 2007). *A. actinomycetemcomitans* je u našoj studiji bio zastupljeniji kod HIV-om inficiranih u odnosu na neinficirane ispitanike, i detekcija ovog mikroorganizma je opadala idući ka starijim pacijentima. *E. corrodens*, kao mikroorganizam čiji je metabolizam veoma zavisian od jona gvožđa, je po rezultatima ove studije povećavala prisustvo u usnoj duplji ispitanika idući ka starijoj životnoj dobi u skladu sa postepenim nakupljanjem gvožđa u ćelijama domaćina što se može povezati sa radovima koji su pokazali sličan efekat kod *P. gingivalis*-a. U ovoj

studiji pokazano je i veće prisustvo *T. denticola*-e kod starijih neinficiranih pacijenata u odnosu na starije HIV-om inficirane pacijente što bi po nalazima drugih autora moglo da se objasni uključivanjem mangana u metabolizam bakterija, umesto gvožđa, u vreme kada je ovaj drugi mikroelement obilno iskorišćavan od strane drugih parodontopatogena, ali i HIV-a (Jakubovics and Jenkinson 2001). Zastupljenost *T. forsythia*-e, prema ovoj studiji se povećava do polovine sedme decenije života, a onda naglo pada što se može povezati sa malnutricijom, hroničnim bolestima i delovanjem lekova na depoe gvožđa u organizmu (Lee 1983, Mascitelli and Goldstein 2013, Frangos, Trombetti et al. 2016)

Promene parodontalnih tkiva opisane u ovoj studiji su u skladu sa većinom studija koje se bave starenjem parodontalnih tkiva. Ove promene nastaju usled smanjene otpornosti tkiva na spoljašnje uticaje, izmena u celularnoj i vezivnoj komponenti oralnih tkiva i poremećaja u funkciji imunog odgovora domaćina (Van der Velden 1984, Huttner, Machado et al. 2009, Andreescu, Mihai et al. 2013). Kod osoba sa HIV-infekcijom ove promene su izraženije i ranije se javljaju nego kod neinficiranih osoba, što govori u prilog ubrzanom starenju ovih tkiva, mada ne treba izuzimati i uticaj smanjenog imunog odgovora i posledično veće destrukcije parodontijuma od strane parodontopatogena. Slabljenje imunog odgovora nakon inficiranja HIV-om se ogleda na nivou, kako prirodnog tako i stečenog imuniteta. HIV-infekcija se karakteriše i stalnom aktivacijom T- i B-limfocita što dovodi do iscrpljivanja i stečenog imunog odgovora (Colonna-Romano, Bulati et al. 2009, Larbi and Fulop 2014). Ovakvo “iznurivanje” imunog sistema, koje se viđa i kod starijih neinficiranih osoba, opisuje se terminom imunosenescencija.

Oralne promene detektovane u ovoj studiji, a koje su karakteristične za HIV-infekciju u eri antiretrovirusne terapije, su u skladu sa drugim istraživanjima (Leao, Ribeiro et al. 2009, Pakfetrat, Falaki et al. 2015).

#### **D. Objavljeni rad koji čini deo doktorske disertacije**

**Toljić B**, Trbovich A, Matić Petrović S, Yousif Kannosh I, Dragović G, Jevtović Dj, De Luka S, Ristić-Djurović J, Milašin J. Ageing with HIV – a periodontal perspective. *New Microbiologica*, 2018; 41(1):61-6. (M23)

### **Saopštenja sa međunarodnog skupa štampano u izvodu:**

**Toljić B**, Trbovich A, Matic Petrovic S, Yousif Kannosh I, Dragovic Lukic G, Jevtovic Dj, De Luka S, Ristic Djurovic J, Milasin J. Ageing and oral bacteria in HIV-infected patients, 1<sup>st</sup> Congress of Molecular Biologists of Serbia, September 20-22. 2017, Belgrade, Serbia.

**Toljić B**, Dimitrijevic B, Nikolic N, Carkic J, Simonovic J, De Luka S, Trbovic A, Dragovic Lukic G, Milasin J. Relative telomere length as a biomarker of aging in HIV infected patients, 11th Balkan Congress of Human Genetics, September 17-20. 2015, Belgrade, Serbia.

### **Saopštenje sa domaćeg skupa štampano u izvodu:**

**Toljić B**. Uticaj starenja na promenu sastava oralne mikroflore kod zdravih i HIV-om inficiranih osoba, Naučni skup povodom obeležavanja 67. godišnjice Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu "Dostignuća i stremljenja u stomatologiji", 17-19. jun 2015, Beograd, Srbija.

### **E. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija **UTICAJ HIV INFEKCIJE I ANTIRETROVIRUSNIH LEKOVA NA STARENJE PARODONTALNIH TKIVA** dr Boška Toljića predstavlja značajan i originalan naučni doprinos u ispitivanju procesa starenja kod HIV-om inficiranih pacijenata. Ova tema do sada nije analizirana u domaćoj literaturi, a retki su i inostrani radovi koji su se bavili ovim problemom. Ovo se naročito odnosi na promene koje se dešavaju u usnoj duplji i parodontalnim tkivima pacijenata sa HIV-infekcijom.

Doktorska disertacija dr Boška Toljića urađena je prema svim principima naučnog i kliničkog istraživanja, sa precizno postavljenim ciljevima, originalnim naučnim pristupom, savremenom metodologijom rada, adekvatno prikazanim i diskutovanim rezultatima i jasno uobličenim zaključcima.

Nakon uvida u dostavljeni tekst komisija je jednoglasno ocenila da doktorska disertacija pod nazivom **UTICAJ HIV INFEKCIJE I ANTIRETROVIRUSNIH LEKOVA NA STARENJE PARODONTALNIH TKIVA** dr Boška Toljića predstavlja originalno, samostalno i dobro dokumentovano istraživanje.

Doktorska disertacija ispunjava sve kriterijume propisane Zakonom o Univerzitetu i statutima Univerziteta i Stomatološkog fakulteta u Beogradu.

Na osnovu svega napred navedenog, Komisija predlaže Nastavno – naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Boška Toljića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka stomatologije.

U Beogradu, 17.04.2018. godine

Članovi Komisije:

---

Prof. dr Elena Kršljak  
Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

---

Prof. dr Zoran Aleksić  
Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

---

Doc. dr Jelena Roganović  
Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

---

Prof. dr Silvio De Luka  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

---

Prof. dr Đorđe Jevtović  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu