

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 12.07.2024. godine, odlukom 19/XXVIII-3/3-EB imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„UTICAJ ANTIRETROVIRUSNIH LEKOVA I GENSKIH VARIJANTI TERT I MTHFR
GENA NA DUŽINU TELOMERA KOD PACIJENATA SA HIV INFEKCIJOM“

kandidata Ene Bukić, zaposlene u Bezbednosno-informativnoj agenciji.

Mentor 1 je prof. dr Gordana Dragović Lukić, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Mentor 2 je prof. dr Jelena Milašin, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Ljiljana Gojković Bukarica, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Ivana Novaković, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Jovan Ranin, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
4. Prof. dr Marija B. Stanojević, Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu
5. Prof. dr Saša Vukmirović, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu.

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija Ene Bukić napisana je na ukupno 81 strani. Disertaciju čine sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. Disertacija sadrži podatke o mentorima i članovima Komisije za ocenu završene teze, sažetke na srpskom i engleskom jeziku, 13 tabela i 35 slika.

U **uvodu** su detaljno opisani struktura genoma virusa humane imunodeficijencije (u daljem tekstu: HIV) i molekularni mehanizmi koji su osnova odvijanja životnog ciklusa HIV-a i inficiranja ćelija. Objasnjeno je kako antiretrovirusni lekovi različitim mehanizmima delovanja zaustavljaju umnožavanje virusa u različitim fazama njegovog životnog ciklusa i zašto se primenjuje kombinovana antiretrovirusna terapija (u daljem tekstu: cART).

Dugoročno lečenje HIV-om inficirane populacije i njeno starenje je prepoznato kao izazov modernog doba jer usled hronične inflamacije uzrokovane stalnim prisustvom virusa i kumulativne toksičnosti uzrokovane cART-om dolazi do progresivnih metaboličkih i fizioloških promena u organizmu i razvoja komorbiditeta povezanih sa starenjem. Istaknuta je upotreba dužine telomera kao biomarkera pomoću koga je moguće kvantifikovati biološko starenje. Pojašnjena je veza između održavanja dužine telomera i brojnih faktora koji dovode do njihovog skraćivanja, sa posebnim osvrtom na negativan uticaj HIV infekcije i cART na dužinu telomera. Skrenuta je pažnja na uticaj polimorfizama u TERT i MTHFR genima kao genetičkim i epigenetičkim faktorima koji mogu uticati na dužinu telomera. Jasno je naglašeno da nema dovoljno podataka u literaturi o uticaju pojedinih lekova u sklopu cART i polimorfizama u TERT i MTHFR genima na dužinu telomera kod HIV-om inficiranih pacijenata.

Ciljevi rada su precizno definisani: 1. Odrediti relativnu dužinu telomera (u daljem tekstu: RTL) kod pacijenata sa HIV infekcijom lečenih cART-om. 2. Odrediti učestalosti alela i genotipova rs1801133 i rs1801131 polimorfizama u MTHFR genu kod pacijenata sa HIV infekcijom lečenih cART-om. 3. Ispitati povezanost utvrđenih genotipova i RTL kod pacijenata sa HIV infekcijom lečenih cART-om. 4. Ispitati povezanost primenjenih antiretrovirusnih lekova u sastavu cART-a na RTL. 5. Ispitati zajednički uticaj genotipova rs2736100 i rs2736098 polimorfizama TERT gena, rs1801133 i rs1801131 polimorfizama MTHFR gena i primenjenih lekova u sastavu cART-a na RTL kod pacijenata sa HIV infekcijom lečenih cART-om.

U poglavlju **materijal i metode** su definisani strogi kriterijumi uključivanja i isključivanja učesnika istraživanja iz studijske grupe. U ovu studiju preseka je bilo uključeno 176 punoletnih pacijenata muškog pola i bele etničke pripadnosti, koji se leče u Centru za HIV/AIDS Klinike za infektivne i tropske bolesti u Beogradu, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, primaju cART u trajanju od minimum 16 nedelja i imaju manje od 50 kopija HIV RNK/ml krvi, kod kojih je dijagnostikovana HIV infekcija, a odsutna bilo koja druga akutna ili hronična infekcija i hroničan alkoholizam, koji ne upotrebljavaju citotoksične lekove, radioterapiju i rekreativne droge. Obrazložen je odabir mononuklearnih ćelija kao optimalnog surogata koji adekvatno reprezentuje trenutno fiziološko stanje pacijenata. Detaljno su opisane procedure izvođenja inaktivacije virusa iz krvi sakupljene venepunkcijom, ekstrakcije mononukleara, izolacije dezoksiribonukleinske kiseline (u daljem tekstu: DNK), određivanja koncentracije DNK i čistoće uzorka, utvrđivanja genotipova TERT i MTHFR gena, određivanja relativne dužine telomera i statistička obrada rezultata ispitivanja. Kako bi se na najobjektivniji način otkrile nezavisne varijable koje su značajno povezane sa zavisnom varijablom RTL, podaci su podvrgnuti i mašinskom učenju bez nadzora, korišćenjem *R* softverskih paketa '*randomForest*' i '*Boruta*'. Istraživanje je sprovedeno uz saglasnost Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu 1322/IX-24, izdatu dana 22.09.2023. godine.

U poglavlju **Rezultati** su detaljno opisani i jasno predstavljeni svi eksperimentalno dobijeni podaci koji su ilustrovani velikim brojem tabela i slika. Predstavljeni su i rezultati dobijeni analizom pomenutih podataka primenom različitih statističkih alata.

Diskusija je napisana jasno i pregledno. Dobijeni rezultati doktorske disertacije su detaljno protumačeni i sagledani uporedo sa objavljenim rezultatima drugih istraživanja.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Spisak literature se sastoji od ukupno 318 upotrebljenih referenci.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa *iThenticate* kojim je vršena provera originalnosti doktorske disertacije „UTICAJ ANTIRETROVIRUSNIH LEKOVA I GENSKIH VARIJANTI TERT I MTHFR GENA NA DUŽINU TELOMERA KOD PACIJENATA SA HIV INFEKCIJOM”, autora Ene Bukić, utvrđeno je da podudaranje teksta iznosi 4%. Podudaranje je bilo posledica navođenja široko prihvaćenih i publikovanih metodoloških procedura koje se koriste u farmakogenetičkim ispitivanjima i detaljnog opisivanja njihovih koraka (određivanje relativne dužine telomera, sekvence korišćenih PCR prajmera), zatim naziva institucija (klinika na kojoj su lečeni ispitanici studije, afilijacije mentora), kao i definicija i stručne terminologije koje su standardizovane u zvaničnoj literaturi vezanoj za konkretnu oblast ispitivanja (nazivi oboljenja, biohemijskih parametara, lekova i enzima) i prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja koji su proistekli iz njegove disertacije.

C) Kratak opis postignutih rezultata

Ukupno 176 pacijenata koji su ispunili kriterijume je uključeno u ispitivanje. Prosečna starost pacijenata u ovom uzorku je iznosila $42,70 \pm 13,18$ godina, dok je njihov prosečan BMI bio $24,51 \pm 3,49$ kg/m². Prosečan broj CD4+ T-ćelija pacijenata je iznosio $554 \pm 259,68$ ćelija/ μ l plazme. Srednja vrednost CRP-a je iznosila $5,57 \pm 5,43$ mg/l. Ukupno trajanje HIV infekcije je u proseku iznosilo $92,42 \pm 72,22$ meseca, dok su pacijenti primali cART u proseku $82,02 \pm 64,81$ meseca. Srednja vrednost RTL za celu grupu pacijenata je iznosila $2,50 \pm 1,87$. Kendalov test korelacije je pokazao da nijedna od navedenih karakteristika pacijenata nije bila u korelaciji sa RTL ($p = 0,904$, $p = 0,551$, $p = 0,536$, $p = 0,264$, $p = 0,220$ i $p = 0,095$, za starost, BMI, broj CD4+ T-ćelija, CRP, dužinu trajanja HIV infekcije i dužinu trajanja cART, respektivno).

Vrsta hiperlipidemije nije uticala na vrednost RTL kod pacijenata ($p = 0,94$), tj. razlika u dužini telomera između pacijenata bez hiperlipidemije, pacijenata sa hipertrigliceridemijom, pacijenata sa hiperholesterolemijom i pacijenata sa mešovitim tipom hiperlipidemije (pacijenti sa hipertrigliceridemijom i sa hiperholesterolemijom) nije bila statistički značajna. Nije bilo značajne međusobne razlike u RTL između pacijenata koji nisu koristili terapiju za hiperlipidemiju, pacijenata koji su koristili fibrine i pacijenata koji su koristili statine ($p = 0,342$). RTL se nije značajno razlikovala između grupe pacijenata sa normalnim nivoom glukoze u krvi u odnosu na grupu pacijenata sa povišenim nivoom glukoze u krvi ($p = 0,082$). Prisustvo dijabetesa tipa 2 nije imalo značajan uticaj na RTL ($p = 0,695$). RTL pacijenata koji su koristili insulin nije bila značajno različita u odnosu na RTL pacijenata koji nisu uzimali terapiju za dijabetes ($p = 0,272$). Pacijenti sa visokim krvnim pritiskom nisu imali značajno duže telomere u odnosu na pacijente sa normalnim krvnim pritiskom ($p = 0,889$).

Od ukupno 176 pacijenata, 53 (30,1%) su koristili lekove iz klase integraznih inhibitora (u daljem tekstu: II) u prosečnom trajanju od $18,86 \pm 18,75$ meseci, 60 pacijenata (34,1%) je koristilo lekove iz klase proteaznih inhibitora (u daljem tekstu: PI) u prosečnom trajanju od $23,60 \pm 23,03$ meseci i 63 (35,8%) su koristili lekove iz klase nenukleotidnih inhibitora transkriptaze (u daljem tekstu: NNIRT) prosečno $37,38 \pm 29,96$ meseci, zajedno sa dva leka iz klase nukleotidnih inhibitora transkriptaze (u daljem tekstu: NIRT) kao okosnicom

cART-a. Kruskal-Volisov test nije pokazao statistički značajnu razliku ($p = 0,761$) u RTL između tri terapijske grupe u okviru cART, različite po mehanizmu delovanja leka: RTL kod pacijenata koji su koristili II je bila $2,49 \pm 1,89$, kod pacijenata koji su koristili PI je iznosila $2,73 \pm 2,03$, a kod pacijenata koji su koristili NNIRT $2,30 \pm 1,62$.

Kombinaciju dva leka, u okviru klase NIRT, lamivudina i abakavira je koristilo 111 (63,1%) pacijenata. 60 pacijenata je koristilo tenofovir sa emrticitabinom i 5 (2,8%) pacijenata je koristilo lamivudin sa zidovudinom. Što se tiče klase II, dolutegravir je bio u upotrebi kod više pacijenata nego raltegravir: 40 (75,5%) u odnosu na 13 (24,5%), respektivno. U okviru klase PI, 48 (80%) pacijenata je koristilo darunavir sa farmakokinetičkim pojačivačem ritonavinom. 9 (15%) pacijenata je uzimalo fosamprenavir sa ritonavinom, dok je samo 3 (5%) pacijenta koristilo lopinavir sa ritonavinom. Što se tiče NNIRT klase lekova, efavirenz je koristilo 53 (84,1%) pacijenta, a nevirapin je koristilo 10 (15,9%) pacijenata. Rezultati Kruskal-Volisovog testiranja (poređenje RTL između tri grupe pacijenata u okviru klase cART-a) i Man-Vitnijevog testiranja (između dve grupe pacijenata u okviru klase cART-a) nisu ukazali na postojanje statistički značajne razlike između RTL pacijenata u okviru klase II ($p = 0,187$), klase PI ($p = 0,790$), kao ni u okviru klase NIRT ($p = 0,277$). Međutim, unutar klase NNIRT se javila statistički značajna razlika u dužini telomera između pacijenata koji su koristili efavirenz i onih koji su uzimali nevirapin ($p = 0,018$). RTL kod pacijenata koji su koristili efavirenz je iznosila $2,10 \pm 1,55$, dok je kod pacijenata koji su koristili nevirapin iznosila $3,33 \pm 1,63$.

27 pacijenata (15,3%) su bili nosioci GG TERT rs2736098 genotipa, 130 (73,9%) su bili nosioci GA genotipa, a 19 (10,8%) su bili nosioci AA genotipa. Dužine njihove RTL su iznosile $2,27 \pm 2,06$, $2,59 \pm 1,80$ i $2,21 \pm 2,13$ kod nosilaca GG, GA i AA genotipa, respektivno. Rezultati Kruskal-Volisovog testa nisu pokazali značajnost u razlici RTL između nosilaca različitih genotipova TERT rs2736098 (GG/GA/AA), $p = 0,119$. 92 pacijenta (52,3%) su bili nosioci AA TERT rs2736100 genotipa, 64 (36,4%) su bili nosioci AC genotipa, a 20 (11,4%) su bili nosioci CC genotipa. Dužine njihove RTL su iznosile $2,41 \pm 1,96$, $2,52 \pm 1,66$ i $2,85 \pm 2,12$ kod nosilaca AA, AC i CC genotipa, respektivno. Rezultati Kruskal-Volisovog testa nisu pokazali značajnost u razlici RTL između nosilaca različitih genotipova TERT rs2736100 (AA/AC/CC), $p = 0,384$. Dobijene i očekivane učestalosti genotipova TERT rs2736098 su se značajno razlikovale, pa se može zaključiti da genotipovi nisu u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži ($p < 0,0001$). Dobijene i očekivane učestalosti genotipova TERT rs27362100 se nisu značajno razlikovale, pa se zaključuje da genotipovi jesu u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži ($p = 0,244$). Nosioci TERT rs2736098 GG+AA genotipova su imali značajno kraće telomere ($p = 0,049$) u poređenju sa pacijentima koji su nosioci GA genotipa, tj. heterozigoti su pokazali biološku prednost u odnosu na dominantne i recesivne homozigote. U okviru TERT rs2736100 polimorfizma, s druge strane, nijedna kombinacija genotipova nije pokazala povezanost sa RTL. Treba ipak napomenuti da je postojalo postepeno povećanje RTL sa svakim C alelom, ali bez statističkog značaja.

51 pacijent (29,0%) je bio nosilac AA MTHFR rs1801131 genotipa, 93 (52,8%) su bili nosioci AC genotipa, a 32 (18,2%) su bili nosioci CC genotipa. Dužine njihove RTL su iznosile $2,58 \pm 1,93$, $2,49 \pm 1,84$ i $2,41 \pm 1,92$ kod nosilaca AA, AC i CC genotipa, respektivno. Rezultati Kruskal-Volisovog testa nisu pokazali značajnost u razlici RTL između nosilaca različitih genotipova MTHFR rs1801131 (AA/AC/CC), $p = 0,233$. 70 pacijenata (29,8%) su bili nosioci CC MTHFR rs1801133 genotipa, 92 (52,2%) su bili nosioci CT genotipa, a 14 (8,0%) su bili nosioci TT genotipa. Dužine njihove RTL su iznosile $2,42 \pm 1,93$, $2,65 \pm 1,89$ i $1,96 \pm 1,42$ kod nosilaca CC, CT i TT genotipa, respektivno. Rezultati Kruskal-Volisovog testa nisu pokazali značajnost u razlici RTL između nosilaca različitih

genotipova MTHFR rs181133 (CC/CT/TT), $p = 0,384$. Dobijene i očekivane učestalosti genotipova MTHFR rs1801131 i MTHFR rs1801133 polimorfizama se nisu značajno razlikovale, pa se zaključuje da genotipovi oba polimorfizma jesu u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži ($p = 0,618$ i $p = 0,096$, respektivno). Nijedna kombinacija genotipova MTHFR rs1801131 i MTHFR rs1801133 polimorfizama nije pokazala povezanost sa RTL. U okviru polimorfizma rs1801131 se uočava izvesno povećanje RTL sa svakim A alelom, međutim, bez statističkog značaja.

Kako bi se na najobjektivniji način otkrile nezavisne varijable koje su značajno povezane sa zavisnom varijablom RTL, podaci su podvrgnuti mašinskom učenju bez nadzora, Rezultati mašinskog učenja dobijeni korišćenjem *R* softverskih paketa '*randomForest*' i '*Boruta*', sugerisali su postojanje tri varijable sa potencijalnim značajnim uticajem na RTL: trajanje HIV-infekcije, broj CD4+ T-ćelija i cART koja sadrži NNIRT. Kendalov korelacioni test nije dokazao značajnu povezanost između trajanja HIV-infekcije i RTL ($p = 0,220$). Takođe, Kendalov korelacioni test nije uspeo da potvrdi broj CD4+ T-ćelija kao promenljivu koja je značajno povezana sa RTL ($p = 0,536$). Međutim, terapijski režim u okviru NNIRT koji su pacijenati primali bio je varijabla čiju povezanost sa RTL je potvrdio Mann-Vitnijev test. Preciznije, HIV-om inficirani pacijenti koji su koristili efavirenz imali su značajno kraće telomere ($2,10 \pm 1,55$) u poređenju sa pacijentima koji su uzimali nevirapin ($3,33 \pm 1,63$) u okviru cART-a ($p = 0,018$).

D) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Mehanizam održavanja dužine telomera u okruženju hronične virusne infekcije je predmet brojnih ispitivanja. Međutim, nema dovoljno podataka o tome kojim sve načinima HIV-infekcija doprinosi ubrzavanju kliničke starosti i o tome kako se uticaji HIV-infekcije međusobno preklapaju sa drugim mehanizmima koji se povezuju sa pojavom komorbiditeta povezanih sa starenjem koji se i inače javljaju u organizmima u odsustvu HIV-infekcije. Dok rezultati pojedinih studija ukazuju na značajnu promenu u dužini telomera u prisustvu HIV infekcije (Gonzales-Serna i sar., 2017, Breen i sar., 2022) i promenu u odnosu na vreme početka cART (Dalzini i sar., 2021), slično rezultatima ove studije, objavljeni su i rezultati koji ne povezuju RTL i vreme od postavljanja dijagnoze HIV-a, broj CD4+ T-ćelija, cART tip ili trajanje hronične inflamacije (Zanet i sar., 2014).

Rezultati ove studije nisu povezali RTL sa kliničkim karakteristikama pacijenata, uključujući BMI, hipertenziju, hiperlipidemiju, glikemijski status ili dijabetes melitus tipa 2. Nasuprot ovim rezultatima, u drugim studijama je ukazano na vezu između skraćivanja telomera i kardiovaskularnih bolesti u prisustvu povećane inflamacije i oksidativnog stresa (Yeh i sar., 2016), upotrebe statina (Alejos i sar., 2019) i hipertenzije (Tellechea i sar., 2017, Deng i sar., 2022). Međutim, objavljene su i studije u kojima nije dokazana veza između krvnog pritiska i dužine telomera (Morgan i sar., 2014, Koriath i sar. 2017, Peng i sar., 2017). Nezanemarljiva je negativna korelacija krvnog pritiska u još tri objavljene studije (Zheib i sar., 2018, Cheng i sar., 2020, Yu i sar., 2020), ali i veza povišenog krvnog pritiska sa dužim telomerama u dve studije (Bekaert i sar., 2007, Rosero-Bixby i sar., 2019). Međusobno kontradiktorni rezultati otežavaju donošenje zaključka o vezi hipertenzije i dužine telomera, što se odnosi i na vezu BMI i dužine telomera. Objavljeno je postojanje inverzne veze između BMI i dužine telomera (Gielen i sar., 2018), što je u skladu sa opšte prihvaćenim mišljenjem da veće vrednosti BMI utiču na skraćivanje telomera (Khosravaniardakani i sar., 2022, Li i sar., 2024), ali, sa druge strane, izveštavano je i o izostanku odnosa između BMI i dužine telomera kod muškaraca (Brouillette i sar., 2007, Nordfjäll i sar., 2008.). Zaključak o odnosu između lipida i dužine telomera još uvek nije generalno postignut. Telomere su povezane sa hiperholesterolemijom (Ngwa i sar., 2022). Dve studije ukazuju na vezu HDL, ukupnog

holesterola i triglicerida sa dužinom telomera (Chen i sar., 2009, Rehkopf i sar., 2016), dok jedna studija potvrđuje vezu HDL i dužine telomera, ali opovrgava vezu između triglicerida i dužine telomera (Melamed i sar., 1999). Nasuprot našim rezultatima, dijabetes je skoro univerzalno povezan sa skraćanjem telomera, što važi i za upotrebu insulina, metformina i derivata sulfonilureje (Wang i sar., 2016, Liu i sar., 2019, Zeng i sar., 2019, Cheng i sar., 2021, Verma i sar., 2022) i hiperglikemiju (Cheng i sar., 2021, Cheng i sar., 2022).

U ovoj studiji, trajanje i mehanizam delovanja cART nije uticao na RTL. Pacijenti na različitim režimima unutar jedne klase antiretrovirusnih lekova nisu imali značajno različite RTL, osim u grupi NNIRT, odnosno pacijenti koji su uzimali efavirenz, imali su značajno kraće telomere od pacijenata koji su uzimali nevirapin. Iako su studije starijeg datuma ukazivale na negativan efekat cART-a na dužinu telomera (Hukezalie i sar., 2012, Leeansyah i sar., 2013, Montejano i sar., 2017), nekoliko novijih nalaza je pokazalo da pokretanje supresivnog cART-a ima pozitivan efekat na telomere i preokreće njihovo skraćivanje (Montejano i sar., 2018, Schoep i sar., 2022), dok je prekid cART neutralisao njene dotadašnje ostvarene korisne efekte na dužinu telomera (Raffenberg i sar., 2021). Koliko nam je poznato, do danas ne postoje objavljeni podaci o poređenju dužine telomera kod pacijenata koji uzimaju efavirenz ili nevirapin u okviru cART. Poznato je samo da efavirenz utiče na iniciranje izmena u homeostazi kalcijuma, smanjivanje aktivnosti kreatin kinaze, povećanje prisustva reaktivnih vrsta kiseonika (u daljem tekstu: ROS), degradaciju proteina koji učestvuju u DNK reparacionom mehanizmu i povećavanje nivoa proinflamatornih citokina, što sve indirektno može dovesti do skraćivanja telomera (Brown i sar., 2014, O'Callaghan i sar., 2014, Tutton i sar., 2016, Babu i sar., 2019, Raffenberg i sar., 2021, Surnar i sar., 2021). S druge strane, u literaturi se navodi da je nevirapin u kultivisanim ćelijama značajno povećao ekspresiju transkripcionog faktora PAX8, poznatog aktivatora ekspresije telomeraze (Chen i sar., 2008, Shang i sar., 2020). Broj istraživanja koja su proučavala uticaj dolutegravira na dužinu telomera nije dugačak. Studija koja je pratila dužinu telomera u mikrogliji HIV-om inficiranih pacijenata je pokazala da cART koja sadrži dolutegravir može da dovede do skraćivanja telomera od 40% i do povećanja produkcije ROS i ekspresije TRF-1 proteina, koji predstavlja inhibitor telomeraze (Hsiao i sar., 2021). U studiji u kojoj je, istovremeno, jedna grupa pacijenata počela da koristi dolutegravir i lamivudin, dok je druga grupa počela da koristi 2NIRT + još jedan lek iz sklopa cART, posle 48 nedelja, primećen je porast u dužini telomera kod svih pacijenata, a porast je bio značajno veći kod pacijenata na dolutegraviru (Lombardi i sar., 2023). Posle 96 nedelja provedenih na dva različita terapijska režima, kod obe grupe pacijenata je primećena veća dužina telomera u odnosu na vrednost u početku studije, s tim što su učesnici grupe koja je primala ritonavir/darunavir/emtricitabin/TDF imali veće povećanje telomera nego učesnici grupe koja je primala darunavir/ritonavir/raltegravir (Stela-Askariz i sar., 2018). Kao u ovoj studiji, zabeleženo je u još jednoj studiji da kod pacijenata koji su uzimali PI i pacijenata koji su uzimali NNIRT nije bilo razlike u dužini telomera (Solomon i sar., 2014). U do sada dostupnoj literaturi nema podataka o uticaju amprenavira, fosamprenavira i kobicistata na dužinu telomera.

S obzirom na činjenicu da razni parametri povezani sa HIV-om i cART mogu doprineti smanjenju aktivnosti telomeraze, bilo je važno istražiti polimorfizme TERT gena koji, takođe, mogu dovesti do daljeg ometanja funkcije enzima. Dok se tenofovir direktno vezuje za telomerazu i najmoćniji je inhibitor telomeraze u poređenju sa svim drugim lekovima u okviru cART (Auld i sar., 2016), efavirenz i dolutegravir indirektno negativno regulišu aktivnost telomeraze iniciranjem oslobađanja ROS (Brown i sar., 2014, Benedicto i sar., 2021, Hsiao i sar., 2021).

Nijedna studija nije ispitivala uticaj genotipova TERT rs2736100 na RTL kod HIV-om inficiranih pacijenata u neafričkoj populaciji. Po dostupnim podacima, ovo je jedina

studija do sada koja je istraživala efekte polimorfizma rs2736098 na dužinu telomera kod HIV-om inficiranih pacijenata. Ova studija je utvrdila vezu između heterozigotnog genotipa GA TERT rs2736098 i dužine telomera, ali u literaturi postoji znatan nesklad u pogledu povezanosti rs2736098 i RTL. Oba alela, alel A polimorfizma rs2736098 (Rafnar i sar., 2009) i alel G (de Martino i sar., 2016), su identifikovani kao značajan doprinosilac skraćivanju telomera. Suprotno navedenim, studija koja je sprovedena na 865 učesnika nije dokazala vezu bilo kog polimorfizma u TERT genu, pa ni rs2736098 sa RTL (Soerensen i sar., 2012). Što se polimorfizma rs2736100 tiče, alel C je povezan sa dužim telomerama (Lan i sar., 2013), genotip CC je povezan sa dužim telomerima u odnosu na nosioce AC i AA genotipova (Rampazzo i sar., 2020), a utvrđen je i doprinos alela C od po 0,026 u produžavanju telomera (Liu i sar., 2014).

Dva najčešća polimorfizma u MTHFR genu koji kodira metilentetrahidrofolat reduktazu, ključni enzim u metabolizmu folata, rs1801131 i rs1801133, dovode do znatnog smanjenja aktivnosti pomenutog enzima, što dovodi indirektno do hiperhomocisteinemije (Forges i sar., 2007) i posledično do hipometilacije TERT promotora, što je praćeno redukcijom ekspresije iRNK i skraćanjem RTL (Zhang i sar., 2014). Do sada su objavljeni rezultati samo jedne studije koja je za cilj imala ispitivanje eventualne veze MTHFR gena i napredovanja HIV-infekcije do AIDS-a u kojoj polimorfizam rs1801133 u MTHFR genu nije pokazao povezanost sa osetljivošću na HIV-1 infekciju, razvojem AIDS-a i terapijskim ishodom (Baba i sar., 2023). Objavljen je mali broj studija koje su ispitivale povezanost polimorfizama rs1801131 i rs 801133 sa dužinom telomera. Mutirani aleli oba polimorfizma su dovedeni u vezu sa kraćim telomerama kod žena u menopauzi (Cerne i sar., 2015). Polimorfizam rs1801133 nije povezan sa dužinom telomera prilikom ispitivanja metabolizma metil donora kod starijih osoba koje su koristile suplemente vitamina B i D (Pusceddu i sar., 2017), ali je pokazana veza između mutiranog genotipa rs1801133 i dužine telomera mononuklearnih ćelija periferne krvi kod zdravih muškaraca (Paul i sar., 2009). Objavljena je i studija, čiji rezultati su u skladu sa rezultatima ove studije, u kojoj nijedan od navedena dva polimorfizma nije bio statistički značajno povezan sa RTL leukocita (Liu i sar., 2015).

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Bukic E, Dragovic G, Toljic B, Obradovic B, Jadzic J, Jevtovic D, Milasin JM. Association between Combination Antiretroviral Therapy and Telomere Length in People Living with Human Immunodeficiency Virus. *Biology*. 2023 Sep 5;12(9):1210. **(M21, IF 4.2)**

Bukic E, Milasin JM, Toljic B, Obradovic B, Jadzic J, Jevtovic D, Dragovic G. TERT single nucleotide polymorphism rs2736098 but not rs2736100 is associated with telomere length in HIV-infected patients on cART. *Mol Biol Rep*. 2024; 51(1):147. **(M23, IF 2.8)**

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „UTICAJ ANTIRETROVIRUSNIH LEKOVA I GENSKIH VARIJANTI TERT I MTHFR GENA NA DUŽINU TELOMERA KOD PACIJENATA SA HIV INFEKCIJOM“ Ene Bukić, prema našim saznanjima, bila je prva farmakogenetička studija ovakve vrste, u svetu, koja se bavila ispitivanjem uticaja polimorfizama rs1801133 i rs1801131 u MTHFR genu na relativnu dužinu telomera kod HIV-om inficiranih pacijenata, jedina u Evropi koja se bavila uticajem polimorfizama rs2736100 i rs2736098 u TERT genu da dužinu telomera i, kao takva, predstavlja originalni naučni doprinos istraživanjima koja se odnose na prevremeno starenje organizma HIV-om inficiranih pacijenata. Posebni značaj ovog istraživanja je i jedinstveni dizajn studije, sa strogo definisanim kriterijumima za uključivanje

i isključivanje, kako bi se eliminisao uticaj velikog broja pridruženih varijabli koje su mogle uticati na dužinu telomera.

Rezultati istraživanja mogu ukazati na eventualnu potrebu za farmakološkom intervencijom usmerenom ka promeni propisivačke prakse u odabiru određenog cART-a, uzimajući u obzir kraće telomere kod HIV-om inficiranih pacijenata, nosilaca GG i AA genotipa TERT rs2736098, imajući u vidu da integrasni inhibitori mogu imati slab negativan uticaj na dužinu telomera i da je efavirenz povezan sa značajno kraćim telomerama kod pacijenata koji koriste nenukleotidne inhibitore transkriptaze.

Tokom svih faza izrade ove doktorske disertacije su poštovani etički principi i principi dobre laboratorijske i kliničke prakse. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio savremen, a izabrana metodologija rada je bila odgovarajuća za opisano istraživanje. Rezultati su koncizno prikazani i detaljno diskutovani. Zaključci su ispravno izvedeni.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučno-nastavnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju Ene Bukić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 15.07.2024.

Mentori:

Prof. dr Gordana Dragović Lukić

Prof. dr Jelena Milašin

Članovi Komisije:

Prof. dr Ljiljana Gojković Bukarica

Prof. dr Ivana Novaković

Prof. dr Jovan Ranin

Prof. dr Marija B. Stanojević

Prof. dr Saša Vukmirović