

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA

UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 28.04. 2016. godine, broj 5940/4 imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Značaj polimorfizama u genima koji kodiraju enzime uključene u metabolizam metotreksata u dece sa akutnom limfoblastnom leukemijom”

kandidata mr sci. dr Jelene Lazić, zaposlene u Univerzitetskoj dečjoj klinici, kao lekar specijalista pedijatrije i subspecijalista hematologije. Mentor je doc. dr Nada Krstovski.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Dragana Janić, redovni profesor, Univerzitetska dečja klinika, Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Lidija Dokmanović, vanredni profesor, Univerzitetska dečja klinika, Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu
3. Dr Sonja Pavlović, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

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 mr sci. dr Jelene Lazić napisana je na 145 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 5 slika, 34 tabele i 52 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je detaljno prikazana etiologija, epidemiološke karakteristike, klinička slika, lečenje i prognoza akutne limfoblastne leukemije (ALL), najčešće maligne bolesti u pedijatrijskom uzrastu, sa posebnim osvrtom na patogenetske mehanizme koji učestvuju njenom nastanku. Istaknut je značaj primene metotreksata (MTX) u savremenim terapijskim protokolima za decu obolelu od ALL. Jasno je objašnjen metabolizam MTX i načini praćenja farmakodinamike (PD) i farmakokinetike (PK) tokom i nakon administracije leka. Navedeni su dosadašnji rezultati ispitivanja toksičnosti MTX i ukazano je na značaj rane predikcije neželjenih efekata.

Zasebno su obrađene oblasti farmakogenetike i farmakogenomike, kao najsavremeniji način praćenja toksičnosti terapije. Pojedinačno je objašnjen mehanizam učesća četiri ispitana gena (*MTHFR*, *DHFR*, *SLC19A1* i *TYMS*) u kodiranju enzima uključenih u metabolizam MTX. Prikazana je potencijalna uloga ispitivanih gena u patogenezi ALL, detaljno je ukazano na moguć značaj u ispoljavanju neželjenih dejstava leka na različite sisteme i organe i uticaj na stepen toksičnosti tokom primene MTX. Takođe je ukazano na korelaciju navedenih gena i ishoda lečenja dece obolele od ALL. Poseban osvrt je dat na genetičke varijante izdvojenih gena, njihov diverzitet i ulogu u pojavi recidiva osnovne bolesti.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se u ispitivanju uticaja gena koji kodiraju enzime uključene u metabolizam MTX i njihovih varijanti na tok i ishod lečenja dece obolele od ALL. Na prvom mestu cilj doktorske disertacije je bio da se utvrdi učestalost varijanti c.677C>T i c.1289A>C u genu za *MTHFR*, -680 C>A, -675 A>G, -556 T>C, -464 A>T i -317 A>G u genu za *DFHR*, c.80G>A u genu za *SLC19A1*, 28 bp tandemski ponovak i 6 bp

delecija u genu za *TYMS*. Učestalost polimorfizama je ispitana u dece obolele od ALL i kontrolnoj grupi i jedan od ciljeva je bio poređenje incidence u bolesnih i zdravih osoba. Nezavisno od farmakogenetičkih markera, cilj je bio da se ispita PK MTX i da se zatim koreliraju sa navedenim polimorfizmima. Takođe, praćena je klinička i laboratorijska toksičnost tokom terapije MTX i istraženo je da li postoji povezanost pojedinačnih ili udruženih varijanti u ispitanim genima sa povećanom toksičnošću MTX. Na osnovu ispitanih parametara ideja je bila da se utvrdi da li postoji modulacija terapije i u kojoj meri kod prisustva pojedinačnih i/ili udruženih genetičkih varijanti. Krajnji cilj je bio da se utvrdi uticaj navedenih polimorfizama u genima za *DFHR*, *MTHFR*, *SLC19A1* i *TYMS* na ishod dece obolele od ALL.

U poglavlju **Materijal i metode** naznačeno je da su dijagnostika i lečenje dece obolele od ALL sprovedeni u Službi za hematologiju i onkologiju Univerzitetske dečje klinike (UDK) po kriterijumima i smernicama savremenih internacionalnih protokola. U istoj ustanovi su praćena PK MTX, kao i laboratorijska toksičnost, dok su farmakogenetičke analize rađene na Institutu za medicinsku genetiku i genetički inženjering u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu. Za uzorkovanje biološkog materijala su roditelji pacijenata dali pismenu saglasnost. Sve analize su odobrene od strane Etičkog odbora UDK i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Jasno su opisane procedure detekcije varijanti u genima koji kodiraju enzime koji učestvuju u metabolizmu MTX. DNK je izolovana pomoću *QIAamp DNA Blood Mini Kit* prema uputstvu proizvođača. Analiza DNK vršena je elektroforetskim razdvajanjem na horizontalnom agaroznom gelu, dok je za analizu DNK fragmenata korišćena elektroforeza na poliakrilamidnom gelu. Varijante u genu *TYMS* su određivane PCR metodom. PCR-RFLP metoda je korišćena za određivanje varijante tipa SNV, konkretno *MTHFR* c.677 C>T. Alel-specifični PCR je bio metoda izbora za *MTHFR* c.1298 A>C i *SLC19A1* c.80 G>A. Za detekciju varijanti u promotoru gena *DHFR* je rađeno sekvenciranje PCR produkata. Statistička obrada podataka je vršena odgovarajućim testovima u zavisnosti od prirode posmatrane varijable.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 152 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Istraživanje je ukazalo da ne postoji razlika u učestalosti ispitivanih genetičkih varijanti u genima za *MTHFR*, *DFHR*, *SLC19A1* i *TYMS* između dece obolele od ALL i zdravih osoba. Dokazana je niska incidenca nepovoljnih genotipova u našoj populaciji i prikazani su pojedinačni najčešći haplotipovi ispitivanih gena. Nije viđen uticaj pola na učestalost detektovanih polimorfizama u navedenim genima, ali je pokazano da deca kod kojih je detektovan *TYMS* 6bp D/D polimorfizam kasnije obolevaju od ALL u odnosu na druge varijante u istom genu.

U odnosu na imunofenotipske karakteristike, pokazana je statistički značajna razlika među ispitivanim genima: *MTHFR* c.1298 A>C korelira sa manje povoljnim, T-ćelijskim imunofenotipom, dok se *DHFR* varijante -675 A>G, -556 T>C, -464 A>T detektuju isključivo u dece sa B-ćelijskom ALL. Nije viđena povezanost između ekstramedularne diseminacije bolesti, na prvom mestu u centralni nervni sistem (CNS infiltracija), i detektovanih polimorfizama. Pokazana je korelacija genetičkih varijanti u *TYMS* genu sa kompleksnim kariotipom u dece sa ALL.

Prikazana je brzina ulaska u remisiju bolesti u tačno određenim vremenskim tačkama i viđena je povezanost određenih genetičkih varijanti sa sporijom kinetikom blasta 15. dana lečenja: *TYMS* 6bp i 28 bp i *DHFR* -680 C>A i -317 A>G. Polimorfizmi u ispitivanim genima nisu uticali na stepen remisije 33. dana terapije.

Pokazano je da su veću ukupnu (kliničku i laboratorijsku) toksičnost ispoljila deca koja su primala niže doze MTX (2 g/m² vs 5 g/m²) i da se broj i stepen neželjenih efekata statistički značajno češće javljao u starijem uzrastu, prosečno u desetoj godini života. Viđeno je da parenteralna primena MTX u intenzivnoj fazi lečenja češće dovodi do pojave kliničke toksičnosti u odnosu na peroralnu primenu u završnoj fazi terapijskog protokola, kada se u

većem procentu detektuje laboratorijska toksičnost, na prvom mestu hepatotoksičnost. Deca kod kojih su se ispoljila neželjena dejstva terapije MTX su u najvećem broju imala nizak stepen toksičnosti, prema jasno definisanom gradiranju u protokolu lečenja. U odnosu na PK, dokazano je da je najčešće usporenje eliminacije leka viđeno u 48. satu od početka primene MTX i da je u najvećem broju dece trajalo manje od 24h, uz dodatne terapijske mere, predviđene terapijskim protokolom. Viđen je protektivni efekat varijante c.677 T/T u *MTHFR* genu u bolesnika koji su primali niže doze MTX: deca sa tim polimorfizmom su najređe ispoljavala toksičnost tokom primene leka u dozi od 2 g/m². Korelacijom PK i varijanti u ispitivanim genima pokazano je da su deca sa *TYMS* 6bp D/D varijantom statistički značajno češće imala povišene nivoe MTX. Takođe, deca sa varijantama *MTHFR* c.1298 C/C, *DHFR* -675 G/G, -556 C/C i -464 T/T i *SLC19A1* c.80 A/A vremenom ispoljavaju veću toksičnost MTX pri ponavljanim ekpozicijama većim dozama leka (5 g/m²).

Ukupno preživljavanje ispitanika u studiji je iznosilo 87%. Jasno su definisani i prikazani različiti faktori koji utiču na prognozu, među kojima se izdvojila varijanta -464 T/T u *DHFR* genu. Deca sa tim polimorfizmom su značajno češće razvila recidiv osnovne bolesti što je u toj grupi bolesnika uticalo na nepovoljan krajnji ishod lečenja.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su kliničke i laboratorijske karakteristike dece obolele od ALL na dijagnozi u saglasju sa podacima iz literature (Hunger S.P. i saradnici, 2015).

Komparacija analiziranih genetičkih varijanti u genima koji kodiraju enzime koji učestvuju u metabolizmu MTX u obolele dece i u kontrolnoj grupi nije ukazala na razliku u učestalosti. Ovakav zaključak oponira pretpostavci da određeni polimorfizmi učestvuju u leukemogenezi, ali su oprečni rezultati dobijeni u studijama koje su sprovedene u adultnih pacijenata sa ALL (Deligezer U. i saradnici, 2003). U studiji koja je sprovedena u našoj populaciji, a koja je ispitivala učestalost varijanti u *MTHFR* genu kod pacijenata sa trombofilijom takođe nije ukazala na razliku između obolelih i zdravih osoba kao kontrolne grupe (Đorđević V. i saradnici, 2004).

Rezultati ove studije ukazuju na korelaciju *DHFR* varijanti -675 A>G, -556 T>C, -464 A>T sa B-ćelijskim imunofenotipom i *MTHFR* c.1298 A>C sa T-ALL. Povezanost različitih genetičkih varijanti sa imunofenotipom je opisana u literaturi: pokazano je da *SLC19A1* gen ima veći kapacitet za vezivanje MTX kod dece sa B-ćelijskom u poređenju sa T-ćelijskom ALL (Zhang L. i saradnici, 1998). U ovom istraživanju je viđena i korelacija genetičkih varijanti u *TYMS* genu sa kompleksnim kariotipom u dece sa ALL. Slični podaci su objavljeni i od strane drugih autora: deca sa t(12;21), kod kojih je viđena povišena ekspresija *SLC19A1* gena su razvila veću rezistenciju na MTX (Wojtuszkiewicz A. i saradnici, 2015). Pacijenti sa više genetičkih rearanžmana mogu da imaju manju akumulaciju MTX poliglutamata, što bitno menja odgovor na terapiju i ukazuje na značaj individualnog genetskog profilisanja.

Učestalost, manifestacija i stepen toksičnosti MTX kod pacijenata u ovoj studiji odgovara podacima iz literature (El-Khodary N.M. i saradnici, 2012). Uticaj varijanti u genima *TYMS* 6bp i 28 bp i *DHFR* -680 C>A i -317 A>G na sporiju kinetiku blasta 15. dana lečenja, koji je viđen u bolesnika u ovom istraživanju, poklapa se sa podacima iz literature (Wojtuszkiewicz A. i saradnici, 2015), gde je pokazana rezistencija leukemijski izmenjenih ćelija na MTX kod prisustva polimorfizama u genima *DHFR*, *SLC19A1* i *TYMS*.

Protektivan efekat varijante c.677 T/T u *MTHFR* genu u ispoljavanju toksičnosti tokom parenteralne primene MTX se može objasniti niskom aktivnošću enzima u *MTHFR* genu, uzrokovanom homozigotnom c.677T varijantom koja dovodi do redukovanog stepena konverzije 5,10-metilentetrahidrofolata u 5-metiltetrahidrofolat. Visok nivo 5,10-metilentetrahidrofolata olakšava *de novo* sintezu purina i timidilata, što dovodi do smanjenja toksičnih efekata MTX (Aplenc R. i saradnici, 2005). Međutim, u literaturi se nalaze kontroverzni podaci vezani za predikciju toksičnosti MTX na osnovu prisustva ovog genotipa. Pojedini autori su objavili rezultate istraživanja gde ukazuju na upravo suprotan efekat – da se u pacijenata sa ovim polimorfizmom češće javlja toksičnost tokom terapije MTX (Yang L. i saradnici, 2012 i Araoz H.V. i saradnici, 2015). Interesantno je da je jedan od najcitiranijih radova koji je pokazao nepovoljan uticaj c.677T varijante *MTHFR* genu (D'Angelo V. i saradnici, 2011) doveden u pitanje ponovnom statističkom obradom rezultata objavljenog ispitivanja (Lopez-Lopez E. i saradnici, 2013). Tako je dokazano da je ovaj polimorfizam

povezan sa manjom toksičnošću tokom primene MTX, što je u saglasnosti sa rezultatima ovog istraživanja i odgovara podacima iz drugih studija (Kantar M. i saradnici, 2009). Kontroverzni statovi u objavljenoj stručnoj literaturi se mogu objasniti različitom distribucijom nepovoljnih haplotipova koji utiču na status ispitivanih gena i sledstveno na ispoljavanje toksičnosti u toku primene MTX (Erculj N. i saradnici, 2012).

Usporena PK MTX kod dece sa *TYMS* 6bp D/D i veća toksičnost pri ponavljanim izlaganjima visokim dozama MTX u pedijatrijskih pacijenata sa *MTHFR* c.1298 C/C, *DHFR* -675 G/G, -556 C/C i -464 T/T i *SLC19A1* c.80 A/A genetičkim varijantama se objašnjava stepenom uticaja navedenih polimorfizama na PD ispitivanog leka (Rocha J.C. i saradnici, 2005). Mogućnost predikcije odgovora na terapiju na osnovu farmakogenetičkih markera predstavlja siguran način doziranja potencijalno vrlo toksičnog leka, kao što je MTX.

U ovoj disertaciji je prikazano ukupno preživljavanje dece sa ALL od 87%, što je rezultat vrlo blizak procentu izlečenja u razvijenim zemljama koji iznosi 90% (Pui C.H. i saradnici, 2015). Ova studija nije pokazala da prisustvo ispitivanih genetičkih varijanti direktno utiče na procenat izlečenja, ali je ukazala na potencijalno loš faktor prognoze u dece sa -464 T/T varijantom u *DHFR* genu, koja su značajno češće razvila recidiv ALL, što su u skorašnjim radovima objavili i drugi autori (Kodidela S. i saradnici, 2015).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. **Lazić J**, Kotur N, Krstovski N, Dokmanović L, Zukić B, Predojević-Samardžić J, Životić M, Milošević G, Đorić M, Janić D, Pavlović S. Importance of pharmacogenetic markers in the methylenetetrahydrofolate reductase gene during methotrexate treatment in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. Archives of Biological Sciences, 2016 (*in press*).

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Značaj polimorfizama u genima koji kodiraju enzime uključene u metabolizam metotreksata u dece sa akutnom limfoblastnom leukemijom**” dr Jelene Lazić predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju mehanizama koji učestvuju u kliničkom i laboratorijskom ispoljavanju toksičnosti tokom primene MTX. Ovim

istraživanjem rasvetljeni su izvesni aspekti vezani za ulogu ispitivanih genetičkih varijanti u leukemogenezi i njihova povezanost sa ishodom dece obolele od ALL. Navedeni rezultati ove doktorske teze potkrepljuju pretpostavku da farmakogenetički markeri, kao individualni faktori, imaju uticaj na pojavu i stepen toksičnosti tokom parenteralne i peroralne terapije MTX. Toksičnost visokog stepena značajno utiče na krajnji ishod lečenja, što svrstava ispitane farmakokinetičke i farmakogenetičke markere u prognostičke faktore od značaja. Korelacija određenih genetičkih varijanti sa potencijalnim recidivom osnovne bolesti je takođe ispitana i jasno prikazana. Rezultati ove doktorske disertacije bi mogli da pomognu u razumevanju leukemogeneze i da ukažu na značaj prevencije toksičnosti kroz modulaciju terapije prema genetskom profilu pacijenta.

Doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila 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, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju mr sci. dr Jelene Lazić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 24.05.2016. godine

Članovi Komisije:

Mentor:

Prof. dr Dragana Janić



Doc. dr Nada Krstovski



Prof. dr Lidija Dokmanović



N. Sav. dr Sonja Pavlović


