

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На V редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 10. 03. 2017. године, прихваћен је извештај ментора проф. др Биљане Јекић и проф. др Софије Павковић-Лучић о урађеној докторској дисертацији **Дубравке Т. Вејновић** под насловом „**Повезаност полиморфизама гена који кодирају ензиме фолатног циклуса са ефикасношћу и токсичношћу метотрексата код пацијената са реуматоидним артритисом**”, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: проф. др Биљана Јекић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, проф. др Софија Павковић-Лучић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, проф. др Татјана Дамњановић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, др Марија Савић Веселиновић, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Горан Радуновић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње **Дубравке Т. Вејновић** и Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду подноси следећи

### ИЗВЕШТАЈ

#### ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација **Дубравке Т. Вејновић** под насловом „**Повезаност полиморфизама гена који кодирају ензиме фолатног циклуса са ефикасношћу и токсичношћу метотрексата код пацијената са реуматоидним артритисом**” написана је на 107 нумерисаних страна, и подељена у 7 (седам) поглавља: **Увод** (35 страна), **Циљеви** (1 страна), **Материјал и методе** (19 страна), **Резултати** (16 страна), **Дискусија** (12 страна), **Закључци** (2 стране) и **Литература** (22 стране). Рад садржи 228 литературних цитата, 21 слику, 14 табела, **Садржај**, као и **Сажетак** на српском и енглеском језику.

#### АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Кандидаткиња **Дубравка Т. Вејновић** је у својој докторској дисертацији приказала резултате испитивања повезаности полиморфизама гена који кодирају ензиме фолатног циклуса са ефикасношћу и токсичношћу малих доза метотрексата које се примењују у терапији пацијената са реуматоидним артритисом.

Поглавље **УВОД** садржи седам потпоглавља. У овом поглављу, кандидаткиња детаљно и аргументовано, уз приказ најновијих података из литературе, објашњава критеријуме за дијагностиковање и праћење тока болести и приступе у лечењу реуматоидног артритиса. Посебно детаљно је описан механизам деловања метотрексата, предности и мане терапије овим леком и критеријуми за уочавање и класификовање његових евентуалних нежељених ефеката. Описани су гени који кодирају протеине посредством којих метотрексат реализује своје терапијско деловање, са посебним

нагласком на *DHFR*, *MTHFR*, *RFC-1* и *MTHFD-1* гене, у оквиру којих се налазе полиморфизми анализирани у овој докторској дисертацији. Такође, кандидаткиња у уводу објашњава појам и значај генских полиморфизама, као и значај и примену фармакогенетике.

У оквиру поглавља **ЦИЉЕВИ РАДА**, кандидаткиња као основне циљеве дисертације наводи да се код пацијената са реуматодним артритисом, лечених метотрексатом у трајању од најмање шест месеци на Институту за реуматологију Медицинског факултета Универзитета у Београду, одреде генотипови одабраних полиморфизама *DHFR* (rs3045983 и rs1650697), *MTHFR* (rs1801133 и rs1801131), *MTHFD-1* (rs2236225) и *RFC-1* (rs144320551) гена и да се испита веза између детектованих генотипова одабраних полиморфизама са ефикасношћу и са појавом нежељених ефеката метотрексата, при чему је предвиђено да се за процену ефикасности лека користе DAS28 и rDAS28 вредности EULAR (енгл. *European League Against Rheumatism*) критеријума.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** наводи се да су у истраживање укључена 243 пацијента са реуматоидним артритисом код којих је дијагноза постављена на основу EULAR критеријума, а који су лечени на Институту за реуматологију Медицинског факултета Универзитета у Београду. Истакнуто је да су сви пацијенти користили терапију метотрексатом дуже од шест месеци и да су све молекуларно-генетичке анализе урађене на Институту за хуману генетику Медицинског факултета Универзитета у Београду и Институту за хуману генетику Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. Детаљно су описане све молекуларно-генетичке методе које су коришћене у изради ове дисертације: изолација ДНК из леукоцита периферне крви методом изољавања за добијање геномске ДНК пацијената, PCR-RFLP метода (реакција ланчане полимеризације-полиморфизам дужине рестрикционих фрагмената) за одређивање генотипова полиморфизама унутар *MTHFR* (rs1801133 и rs1801131), *MTHFD-1* (rs2236225) и *RFC-1* (rs144320551) гена, вертикална електрофореза на полиакриламидним геловима за одређивање генотипова у случају rs3045983 полиморфизма у *DHFR* гену и генотипизација применом PCR методе у реалном времену (TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays, C\_27863089\_10) за детекцију генотипова rs1650697 полиморфизма *DHFR* гена. Пошто су у овом раду за клиничку процену ефикасности терапије метотрексатом коришћени EULAR критеријуми, кандидаткиња је у поглављу Материјал и методе детаљно описала како се они примењују, односно, поступак за израчунавање DAS28 вредности (енгл. *Disease Activity Score*), као и критеријуме на основу којих се, уз помоћ ових вредности, одговор на терапију метотрексатом карактерише као добар, умерен или лош. Процена клиничког одговора на метротрексат у овој тези рађена је и на основу релативне вредности DAS28 (rDAS28), па је у овом поглављу детаљно објашњено како се ова вредност израчунава. Поред тога, кандидаткиња је објаснила како су регистровани нежељени ефекти лека и који су критеријуми коришћени за њихову класификацију на благе, умерене и тешке нежељене ефекте. Резултати рада су обрађени употребом SPSS програма (верзија 16.0, SPSS, Inc. IL, USA), а кандидаткиња је за сваку урађену анализу навела тест који је коришћен.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ**, веома детаљно и прегледно су приказани демографски и клинички подаци релевантни за ово истраживање. У циљу боље прегледности и униформнијег приказа резултата, они су груписани на основу примењених молекуларно-генетичких метода, тако да овај одељак има три подгрупе резултата, на основу тога да ли је коришћена PCR-RFLP, PCR или real-time PCR метода. Од демографских података, израчуната је заступљеност пацијената по полу и просечна старост пацијената.

Одређиване су средње вредности дужине трајања болести и болест-модификујуће терапије, као и недељних доза метотрексата и кортикостероида. Приказана је заступљеност пацијената са добрим, умереним и лошим одговором на терапију метотрексатом, као и заступљеност пацијената који су примали суплементе фолне киселине и средње гDAS вредности. У овом поглављу докторске дисертације, детектоване су и поређене, одговарајућим статистичким методама, вредности параметара који омогућавају праћење активности болести на почетку и после шест месеци од почетка терапије метотрексатом. Код пацијената је уочено статистички значајно смањење активности болести после шест месеци терапије овим леком. Коришћењем дефинисаних критеријума, пацијенти су после шест месеци терапије сврстани у групу са одговором (добрим или умереним) и групу без одговора на терапију метотрексатом. Групе са и без одговора на терапију су затим међусобно поређене у односу на дозу метотрексата, при чему је утврђена статистички значајна разлика у недељној дози метотрексата између групе са и групе без одговора на терапију. Такође је, на основу поређења ових група пацијената, уочено да је примена кортикостероида, али не и суплемената фолне киселине, у корелацији са лошим одговором на терапију. Када су као критеријум за ефикасност метотрексата коришћене гDAS вредности, закључено је да не постоји веза између дозе метотрексата и одговора на терапију овим леком у трајању од шест месеци.

Детектована учесталост пацијената са благим, умереним и тешким нежељеним ефектима лека, који су се испојили после шест месеци терапије метотрексатом, у складу је са подацима из литературе. Типови уочених нежељених ефеката лека у овом раду су такође у складу са литературним подацима. Није уочена веза између појаве нежељених ефеката лека и дозе метотрексата коју су примали пацијенти.

За сваки од анализираних полиморфизама у овом поглављу постоји репрезентативна фотографија као илустрација молекуларно-генетичке анализе за детекцију генотипова. За сваки од изабраних полиморфизама испитивана је повезаност генотипова и алела са ефикасношћу терапије метотрексатом, процењиване на основу EULAR критеријума и гDAS вредности, као и са појавом нежељених ефеката метотрексата. Није утврђена статистички значајна асоцијација између било ког генотипа или алела анализираних полиморфизама и одговора на терапију метотрексатом. Уочена је већа заступљеност 677ТТ генотипа у групи пацијената која није имала добар одговор на терапију метотрексатом, али резултат није имао статистичку значајност.

Продукт алела 1 rs3045983 полиморфизма *DHFR* гена би могао да има значајан протективни ефекат против токсичних ефеката метотрексата, што је потврђено и мултиплом логистичком регресионом анализом која је укључивала године и пол пацијената, дужину трајања болести и терапије метотрексатом, недељне дозе метотрексата и примену фолата и/или ниских доза кортикостероида као коваријанте. Алел 1 је такође био мање заступљен у групи у којој су били пацијенти са озбиљним нежељеним ефектима лека. У случају rs1650697 полиморфизма *DHFR* гена уочена је статистички значајно већа учесталост алела С код пацијената са повишеним нивоом трансминаза након шест месеци терапије метотрексатом.

У поглављу **ДИСКУСИЈА**, кандидаткиња је анализирала добијене резултате у односу на улогу сваког од гена у деловању метотрексата и у односу на претпостављени ефекат датог полиморфизма на активност генског продукта. Сви резултати су дискутовани у односу на постојеће податке из литературе. Према нашем сазнању, ово је прва студија која се бавила анализом утицаја полиморфизама rs3045983 и rs1650697

*DHFR* гена на ефикасност и токсичност метотрексата код пацијената са реуматоидним артритисом.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ**, кандидаткиња је сумирала најважније закључке који су засновани на анализама добијених резултата у овој докторској дисертацији. Закључци су приказани по ставкама, за сваки ген засебно, а посебно су истакнути они полиморфизми код којих је уочена веза између одређених генотипова или алела са ефикасношћу или токсичношћу метотрексата.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи 228 библиографских јединица. Литературни извори су актуелни, адекватно су цитирани, на одговарајућим местима у тексту, и значајно доприносе разумевању садржаја ове докторске дисертације.

## **БИБЛИОГРАФИЈА**

### **Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:**

Б1. Радови у часописима међународног значаја

#### **M22:**

1. Jekić B., **Vejnović D.**, Milić V., Maksimović N., Damjanović T., Bunjevački V., Novaković I., Luković Lj., Damjanov N. and Krajinović M. (2016) Association of 63/91 length polymorphism in the *DHFR* gene major promoter with toxicity of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*, 17 (15): 1687-1691. IF 2015 = 2.710

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27636122>

#### **M23:**

1. **Vejnović D.**, Milić T., Damjanović T., Maksimović N., Bunjevački V., Luković Lj., Novaković I., Krajinović M., Damjanov N., Radunović G., Pavković-Lučić S and Jekić B. (2016). Analysis of association between polymorphisms of *MTHFR*, *MTHFD1* and *RFC1* genes and efficacy and toxicity of methotrexate in rheumatoid arthritis patients. *Genetika*, 48 (1): 395-408. IF 2015 = 0.308

<http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0534-0012/2016/0534-00121601395V.pdf>

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја (M34)

1. **Vejnović, D.**, Jekić, B., Damjanović, T., Maksimović, N., Popović, B., Milić, V. and Pavković-Lučić, S. 2015. Association of C35T polymorphism in dihydrofolate reductase gene with efficacy and toxicity of methotrexate in RA patients. *11<sup>th</sup> Balkan Congress of Human Genetics*, 17<sup>th</sup> - 20<sup>th</sup> September, Belgrade, Book of Abstracts, p. 90.

## Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација **Дубравке Т. Вејновић** под насловом: „**Повезаност полиморфизама гена који кодирају ензиме фолатног циклуса са ефикасношћу и токсичношћу метотрексата код пацијената са реуматоидним артритисом**” је савремена студија из области фармакогенетике. Обим, садржај, оригиналност и значај добијених резултата, начин на који су добијени резултати приказани и дискутовани у односу на постојећу литературу, као и адекватност цитираних литературних извора, чине да овај текст има све одлике квалитетно написане докторске дисертације. Два полиморфизма анализирана у овом раду су по први пут испитивана код пацијената са РА на терапији метотрексатом, а приказани резултати имају и велики значај у смислу потенцијалне добробити пацијентима са РА и адекватне терапије болести. Кандидаткиња је, на основу резултата истраживања и обимне литературе приказане у овом раду, демонстрирала да је способна да самостално дизајнира и изводи експерименте и дискутује резултате из области фармакогенетике, о чему говоре и публикације које су објављене на основу резултата ове докторске дисертације.

На основу увида у експериментални рад, као и на основу прегледане докторске дисертације, Комисија сматра да докторска дисертација **Дубравке Т. Вејновић**, представља значајан допринос у области фармакогенетике. На основу свега изложеног, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитиван Извештај комисије и одобри јавну одбрану докторске дисертације **Дубравке Т. Вејновић**, под називом „**Повезаност полиморфизама гена који кодирају ензиме фолатног циклуса са ефикасношћу и токсичношћу метотрексата код пацијената са реуматоидним артритисом**”.

У Београду, 21. 03. 2017. године

### КОМИСИЈА:

---

др Биљана Јекић, ванредни професор  
Универзитет у Београду - Медицински факултет

---

др Софија Павковић-Лучић, ванредни професор  
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

---

др Татјана Дамњановић, ванредни професор  
Универзитет у Београду - Медицински факултет

---

др Марија Савић Веселиновић, доцент  
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

---

др Горан Радуновић, доцент  
Универзитет у Београду - Медицински факултет