

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 09.07.2020. godine, broj 9700/09, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Karakteristike distribucije funkcionalnih varijanti gena iz superfamilije citohroma P450 u stanovništvu Srbije“

kandidata Ivana Skadrića, zaposlenog u DNK laboratoriji Instituta za sudsku medicinu, Medicinskog fakulteta u Beogradu. Mentor teze je prof. dr Oliver Stojković.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Suzana Cvjetičanin, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc. dr Branislava Medić, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Viktorija Dragojević-Simić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane 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 doktorke disertacije

Doktorska disertacija kandidata Ivana Skadrića napisana je na ukupno 128 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod (od 1 do 58 strane), ciljevi rada (od 59 do 60 strane), materijal i metode (od 60 do 72 strane), rezultati (od 72 do 89 strane), diskusija (od 89 do 104 strane), zaključci (od 104 do 105 strane) i literatura (od 105 do 128 strane). U disertaciji se nalazi ukupno 15 tabela i 58 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **Uvodu** je opisan istorijski pregled izučavanja enzima citohroma P450 i njihovog uticaja na metabolizam lekova. Opisane su struktura enzima, kao i metaboličke funkcije citohroma P450, uloga i uticaj na metabolizam lekova i drugih supstanci, primena u farmakogenetici i

post mortem analizama. Detaljno su navedeni supstrati u čijem metabolizmu genetičke varijante citohroma P450 mogu dovesti do promena koje zahtevaju izmene u odabiru doze i vrste lekova. Definisane su genetičke varijante za koje postoje dokazi da dovode do izmena u funkciji enzima citohrom P450 i njihov uticaj metabolički fenotip čoveka. Napravljen je i osvrt na savremene primene molekularno genetičkih metoda u individualizaciji terapije prema genetičkom profilu pacijenata.

Koncizno je razmotrena problematika varijacija u raspodeli alelskih učestalosti funkcionalnih varijanti citohroma P450 u ljudskim populacijama, kao i posledice koje se mogu odnositi na farmakogenetička testiranja. Veoma detaljno su opisane metode za otkrivanje odstupanja od uniformnosti raspodele alelskih i genotipskih učestalosti. Određena je klasifikacija algoritama i metoda koji se mogu koristiti za otkrivanje genetičke strukturiranosti populacije. Pored metoda koje uobičajno koriste za otkrivanje genetičke strukturiranosti, navedeni su i algoritmi koji se upotrebljavaju u savremenim bioinformatičkim analizama, sa detaljnim matematičkim opisom svakoga od njih.

Ciljevi rada su precizno i jasno definisani i obuhvataju ispitivanje alelskih učestalosti funkcionalnih varijanti citohroma P450 pomoću molekularno genetičkih metoda, zatim primenu metoda populacione genetike za otkrivanje genetičke strukturiranosti u opštoj populaciji i u poređenju sa subpopulacijom koja se može smatrati kontrolom, kao i formulisanje lokusa u genima citohroma P450 koje bi trebalo razmotriti u primeni farmakogenetičkih testiranja u Srbiji.

Poglavlje **Materijali i metode** opisuju način odabira uzoraka za sprovođenje studije, metode koje su primenjene za genotipizaciju, odabir i primenu metoda za analizu genetičke strukturiranosti populacije. Uzorak iz opšte populacije je stratifikovan prema regionima Nomenklature statističkih teritorijalnih jedinica koja je određena prema geokodskom standardu Evropske Unije. Opisan je i način prikupljanja dodatnog uzorka romske subpopulacije čija je genetička struktura posebno testirana u odnosu na opštu populaciju. Svi ispitanici su dali pristanak za sprovođenje genetičkih istraživanja pre uključivanja u ovu studiju. Genotipizacija varijabilnih lokusa citohroma P450 je sprovedena primenom dveju metoda, hidrolizom fluorescentno obeležinih alel specifičnih proba tokom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu i analizom polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata. Podaci dobijeni genotipizacijom varijabilnih lokusa su analizirani na više načina, od kojih je jedan podrazumevao analizu molekulske varijanse i parametara F statistike, dok su se ostali

zasnivali na upotrebi algoritama za detekciju klastera unutar podataka, Bejzovom modelovanju i primeni algoritama zasnovanih na teoriji mreža na genetičkim podacima.

U poglavlju **Rezultati** postoji tabelarni prikaz rezultata genotipizacije ispitanika, kao i grafički prikaz rezultata analiza genetičke struktuiranosti testiranih populacija.

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

Zaključci su izvedeni koncizno i odnose se na najvažnije rezultate studije.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 345 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Genotipizacijom 11 varijabilnih pozicija u genima *CYP1A1*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4* u reprezentativnom uzorku opšte populacije (449 osoba) ostvaren je uvid u distribuciju alelskih učestalosti analiziranih genskih polimorfizama u stanovništvu Republike Srbije. Isti lokusi su genotipizirani i u uzorku osoba romske etničke grupe (59 osoba). Određena je učestalost M1 pojedinačne nukletidne varijante rs4646903 u genu *CYP1A1*, koja je iznosila 7.4% u opštoj populaciji i 15.2% u uzorku Roma. U istom genu, određena je i učestalost varijante M2 (rs1048943) koja je iznosila 6.2% u uzorku iz opšte populacije i 2.7% u grupi Roma. Statističko testiranje je pokazalo da su učestalosti M1 varijanti između Roma i osoba neromskog etniciteta različite u meri koja se može smatrati statistički značajnom, s obzirom na to da je P vrednost bila niža od uobičajenog praga značajnosti testa od 5%, korigovanog u odnosu na broj poređenja. Rezultati genotipizacije u genu *CYP2C9*, na lokusima rs1799853 i rs1057910 pokazali su učestalosti manje zastupljenih varijanti od 10.1% i 12.7% u opštoj, odnosno 12% i 7.4% u populaciji Roma. Alelske učestalosti na lokusima rs4244285 i rs12248560 u genu *CYP2C19* iznosile su 19.8% i 15.2% u opštoj populaciji, dok su u romskoj subpopulaciji te vrednosti bile slične (19.4% i 18.4%). Četiri polimorfna lokusa testirana su u genu *CYP2D6*: rs3892097, rs1065852, rs28371725 i rs28371706. Učestalosti manje zastupljenih varijanti na ovim lokusima u uzorku opšte populacije su iznosile 16.3%, 21.5%, 8.8%, dok lokus rs28371706 nije pokazao polimorfnost. U romskoj subpopulaciji, učestalosti na testiranim *CYP2D6* lokusima su iznosile 17.4%, 21.1% i 8.8%, dok je lokus rs28371706, kao i u opštoj populaciji, bio monomorfan. U genu *CYP3A4* je testiran jedan lokus na polimorfnom mestu rs2740574 i prema rezultatima studije,

učestalosti su iznosile 2.2% u opštoj populaciji i 0.8% u romskoj subpopulaciji, ali se nisu statistički značajno razlikovale.

Prikazane su učestalosti genotipova na svakom od 11 testiranih lokusa, kao i rezultati testiranja Hardi-Vajnbergove ravnoteže. Na polimorfnom mestu rs1065852 može se primetiti odstupanje dobijene od očekivane učestalosti genotipova, u smislu povećanja učestalosti heterozigotnih genotipova. U uzorku osoba neromskog etniciteta, odstupanje od očekivanja iz Hardi-Vajnbergovog modela postojalo je na još jednom lokusu u genu *CYP2D6*, rs3892097 pored rs1065852. Nikakva odstupanja nisu opažena u uzorku osoba Roma. Za svaki od 11 testiranih lokusa su prikazani i rezultati analize molekulske varijanse, prema kojima je najviša vrednost F_{ST} parametra na lokusu M1 tačkaste nukleotidne varijante rs4646903 i koja iznosi 1.1% u opštoj populaciji i 1.2% u romskoj subpopulaciji. Analizom molekulske varijanse na osnovu učestalosti haplotipova, koji su generisani na osnovu genotipskih podataka testiranih CYP varijanti, dobijene su vrednosti parametra F_{ST} za svaki od regiona Srbije iz kojih su odabrani uzorci osoba za testiranje, a najviša vrednost F_{ST} je iznosila 0.4%.

Rezultati primene algoritama za detekciju genetičke struktuiranosti populacije na podacima genotipizacije CYP i STR lokusa su prikazani grafički i tabelarno. Na osnovu CYP i STR lokusa, algoritam i istoimeni softver, STRUCTURE, nisu ukazali na postojanje klastera unutar opšte populacije, niti su u poseban klaster izdvojili uzorke iz populacije Roma u Srbiji. Primenom BAPS (Bayesian Analysis of Population Structure) algoritma, implementiranog u istoimenom softveru, na podatke dobijene genotipizacijom STR genskih lokusa, uočeno je grupisanje većeg broja Roma u jedan klaster, od onog koje bi se očekivalo na osnovu nulte hipoteze o izostanku grupisanja. Redukcijom dimenzionalnosti pomoću analize glavnih komponenti (PCA), nisu uočeni zasebni klasteri, dok je primenom tSNE algoritma za vizuelizaciju nelinearnih podataka, uočeno postojanje dva klastera, kako u opštoj populaciji, tako i u romskoj subpopulaciji, bez odstupanja od nasumičnog sortiranja genotipova prema regionalnoj ili etničkoj pripadnosti. Pokazano je da se STR genotipski podaci mogu razdvojiti na jedan klaster i 'šum' primenom DBSCAN algoritma za hijerarhijsko klasterovanje zasnovano na gustini podataka iz matrice Neijevih genetičkih distanci, ali i neočekivano raspoređivanje genotipova Roma, koji su u većoj meri bili zastupljeni u „šumu“ nego u klasteru. Nakon analize podataka i Girvan-Newman algoritmom, koji otkriva grupe čvorišta unutar mreže genetičkih podataka, određeno je 7 klastera koji su grafički prikazani. Ovi klasteri se, međutim, nisu preklapali ni sa geografskim ni sa etničkim distribucijama uzorka.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Pregledom savremene literature, može se uočiti da su podaci o učestalostima funkcionalnih varijanti u *CYP450* genima objavljeni na osnovu istraživanja sprovedenih u većem broju država, ali i to da, do ove disertacije, sveobuhvatna analiza na reprezentativnom uzorku iz Srbije još nije obavljena. Slično se može zaključiti i kada su u pitanju podaci iz susednih populacija, gde su se istraživanja učestalosti *CYP* varijanti najčešće bazirala na uzorcima hospitalizovanih pacijenata ili ispitanika za koje nije poznato geografsko poreklo unutar populacije (Szanyi *et al.*, 2012; Kuzmanovska *et al.*, 2015; Mizzi *et al.*, 2016; Krasniqi *et al.*, 2017; Pašalić and Marinković, 2017). Reprezentativnost uzorka opšte populacije Srbije u ovoj disertaciji se zasnivao na stratifikovanom i randomizovanom odabiru ispitanika, uz kontrolu uticaja neproporcionalne zastupljenosti do koje bi moglo doći ukoliko se u populaciono genetičko istraživanje ispitanici uključuju bez uzimanja u obzir gustine populacije iz koje ispitanici dolaze (Holsinger and Weir, 2009). Izbor genetičkih varijanti koje su bile predmet istraživanja je u skladu sa njihovim farmakogenetičkim značajem, dokazanim u obimnim istraživanjima sprovedenim u prethodnim decenijama (Jin *et al.*, 2005; Fer *et al.*, 2008; Mota *et al.*, 2011; Dean, 2012; Baumann, 2014; Caudle *et al.*, 2014; Werk and Cascorbi, 2014; Bell *et al.*, 2017). Distribucija učestalosti varijanti i genotipova *CYP450* u opštoj populaciji Srbije ima karakteristike koje se slične distribucijama u drugim evropskim populacijama, ali se mogu primetiti i određena odstupanja, koja su takođe opisivana i u drugim populacijama (Céspedes-Garro *et al.*, 2015; Fricke-Galindo *et al.*, 2016). Tako npr. genotipizirane varijante na svim analiziranim pozicijama u *CYP2D6* genu pokazuju blago povišene učestalosti homozigotnog stanja, što može biti uslovljeno prisustvom *5 alela (sa delecijom u ovom genu, koja nije mogla biti detektovana primenjenom metodom genotipizacije) (Bijl *et al.*, 2008), koji se u populacijama evropskog porekla javlja sa učestalošću 4-6%. Analiza molekulske varijanse i podudarnosti distribucija između *CYP* gena i STR genotipskih podataka dokumentovana je na metapopulacionom nivou (Rosenberg *et al.*, 2005). Međutim, u ovoj studiji, na osnovu uzorka iz opšte populacije Srbije, dobijeni rezultati ukazuju da se klasterovanje uzorka u odnosu na STR lokuse, koji se uobičajeno koriste za forenzičko genetičku analizu, realizuje na drugačiji način u odnosu na klasterovanje pomoću testiranih *CYP* lokusa. Kada je u pitanju analiza genetičke varijanse sa izdvojenom romskom subpopulacijom, parametri F statistike ne ukazuju na velike razlike u alelskim učestalostima između Roma i ostatka opšte populacije, izuzev varijante M1 lokusa rs4646903 (Szalai, Hadzsiev and Melegh, 2016).

Primena računarskih algoritama za detekciju genetičke struktuiranosti populacije moderni je pristup koji je nezaobilazni deo savremenih studija genetičke asocijacije, naročito GWAS studija (Sul, Martin and Eskin, 2018). U ovoj doktorskoj disertaciji upotrebljeni su različiti matematički algoritmi, od onih koji su već u širokoj upotrebi (PCA, STRUCTURE, BAPS), do algoritama koji predstavljaju poslednja otkrića u polju obrade podataka (Girvan-Newman, tSNE, DBSCAN) (Ester *et al.*, 1996; Corander, Waldmann and Sillanpää, 2003; Rosenberg *et al.*, 2003; Greenbaum, Templeton and Bar-David, 2016; Li *et al.*, 2017). Posebno se izdvajaju rezultati primene Bejzovog statističkog zaključivanja kroz modelovanje genetičke strukture populacije, koji su dobijeni BAPS algoritmom i ukazuju da je moguće izdvojiti visok procenat (77%) genotipova u zaseban klaster na osnovu svega 15 STR lokusa. Ovaj rezultat govori u prilog podacima iz publikacija koje porede efektivnost različitih pristupa u otkrivanju genetičke struktuiranosti populacije i opšte primene heurističkih algoritama na genetičkim podacima (Corander, Sirén and Arjas, 2008; Novembre, 2016; Zafar *et al.*, 2019).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Skadrić, I., Stojković, O., Defining screening panel of functional variants of CYP1A1, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4 genes in Serbian population. *Int J Legal Med* **134**, 433–439 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02234-7>

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Karakteristike distribucije funkcionalnih varijanti gena iz superfamilije citohroma P450 u stanovništvu Srbije“ kandidata Ivana Skadrića rezultat je originalnog pristupa u populaciono genetičkom istraživanju sprovedenom u populaciji Srbije, koje na više načina doprinosi razvoju nauke u našoj državi. Prvenstveno, opisivanje distribucije alelskih učestalosti CYP450 varijanti koje utiču na funkcionalnost farmakogenetički i toksikogenetički relevantnih enzima, prvo je sistematsko istraživanje u opštoj populaciji Srbije na osnovu kojeg je moguće prilagoditi buduća farmakogenetička testiranja i na taj način povećati delotvornost terapije lekovima koji se metabolišu CYP enzimima, kao i smanjiti neželjene efekte terapeutika. Podaci o učestalostima alela i genotipova svakako će uticati i na buduća istraživanja CYP gena, jer potiču iz reprezentativnog uzorka opšte populacije sa našeg prostora i predstavljaju referentne učestalosti koje su neophodne za buduće studije genetičke asocijacije. Pored toga, opisivanjem genetičke strukture opšte populacije, kao i proučavanjem razlika između geografskih regiona i etničke grupe Roma u Srbiji, ostvaren je uvid u prirodu distribucije alelskih učestalosti između potencijalnih subpopulacija. Kao što je pokazano na primeru M1 varijante u genu *CYP1A1*, veća učestalost (15.2%) u romskoj subpopulaciji može biti motivacija za izvođenje studije uticaja faktora životne sredine, a posebno zagađenosti policikličnim aromatičnim ugljovodonicima, na pojavu bolesti kod osoba romskog etničkog porekla. Potvrđena je i visoka učestalost nefunkcionalnog alela *4 u genu *CYP2D6*, koja može značajno umanjiti biološku efikasnost citostatika tamoksifena, koji se često koristi u onkološkoj kliničkoj praksi za terapiju raka dojke. Predložena doktorska disertacija se posebno ističe svojom primenom savremenih bioinformatičkih metoda u otkrivanju genetičke struktuiranosti populacije, kao i uporednim prikazom rezultata većeg broja različitih algoritama, od kojih su neki prvi put primenjeni na genetičkim podacima stanovništva Srbije. Takav pristup posebno doprinosi razvoju primene informatičkih metoda u genetici, ukazujući na mogućnost šire primene bioinformatike u medicinskim istraživanjima.

Mišljenja smo da je ova doktorska disertacija urađena u skladu sa svim principima naučnog istraživanja i metodologije. Pristup u istraživanju je bio jedinstven sa jasno određenim ciljevima i savremenom metodologijom. Rezultati rada su prikazani veoma pregledno, prožimaju se kroz diskusiju i omogućili su izvođenje jasnih zaključaka.

Uzimajući u obzir kvalitet ove disertacije, njen naučni doprinos, kao i kontinuirani naučno-istraživački rad kandidata, komisija je jedinstvenog mišljenja i predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju Ivana Skadrića i odobri javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 17.07.2020. godine

Članovi Komisije:

Prof. dr Suzana Cvjetičanin

Docent dr Branislava Medić

Prof. dr Viktorija Dragojević-Simić

Mentor:

Prof. dr Oliver Stojković
