

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 23.3.2021. godine, broj 9700/13-MG, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Uticaj polimorfizama gena koji kodiraju adenozijske receptore na efikasnost i toksičnost monoterapije metotreksatom kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom“

kandidatkinje dr Milke Grk, zaposlene na Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta u Beogradu. Mentor je vandredni prof. dr Biljana Jekić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Suzana Cvjetičanin, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc. dr Predrag Ostojić, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Gordana Šupić, vanredni profesor Medicinskog fakulteta VMA

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 dr Milke Grk napisana je na ukupno 59 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 10 tabela, 6 grafikona i 6 slika. Doktorska disertacija sadrži

sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

Uvod je podeljen na više delova. Prvi deo je posvećen epidemiologiji i etiologiji reumatoidnog artritisa (RA). Posebna pažnja posvećena je genetičkoj osnovi oboljenja. U drugom delu pažnja je posvećena kliničkim aspektima bolesti, dijagnostici, terapiji i proceni odgovora na terapiju. Zatim se pažnja fokusira na patogenezu oboljenja sa detaljnim osvrtom na ulogu adenzina i adenzinskih receptora u razvoju bolesti. U narednom delu detaljno su opisani molekularni mehanizmi dejstva metotratsata (MTX) kao i njegov uticaj na adenzinski metabolički put. U završnom delu uvoda opisani su geni koji kodiraju adenzinske receptore (*ADORA_{2A}* i *ADORA₃*) i inozin trifosfatazu (*ITPA*). Pored toga, istaknuta su saznanja iz dosadašnjih istraživanja o značaju polimorfizma ovih gena na njihovu ekspresiju i funkciju. Dostupni podaci o uticaju polimorfizama u genima za adenzinske receptore na efikasnost i toksičnost terapije MTXom kod osoba sa RA veoma oskudni, ali i kontradiktorni. Zbog svega navedenog i mogućeg značaja najčešćih polimorfizama gena koji kodiraju adenzinske receptore i *ITPA* na efikasnost i toksičnost terapije MTXom kod pacijenata obolelih od RA postavljeni su i jasno i precizno definisani **ciljevi** studije:

1. Utvrditi učestalost genotipova i alela polimorfizama gena za adenzinske receptore i enzime adenzinskog puta (4 polimorfizma u genu za *ADORA_{2A}*, 3 polimorfizama u genu za *ADORA₃* i jedan polimorfizam u genu za *ITPA*).
2. Ispitati povezanost odabranih polimorfničkih genskih varijanti sa efikasnošću metotratsata, koja će se procenjivati prema EULARovim (European League Against Rheumatism) kriterijumima.
3. Analizirati povezanost odabranih polimorfničkih genskih varijanti sa neželjenim dejstvima metotratsata.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o panel studiji koja je sprovedena na Institutu za reumatologiju i Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta u Beogradu. Detaljno je opisan način pregleda pacijenata, kriterijumi za uključenje u studiju, kao i kriterijumi za isključenje bolesnika iz studije. Aktivnost bolesti procenjivana je korišćenjem DAS28 indeksa, dok je efikasnost terapije utvrđivana na osnovu EULAR kriterijuma za procenu odgovora na terapiju koji se baziraju na promeni aktivnosti bolesti merene DAS28 indeksom nakon šest meseci monoterapije MTXom. Oboleli sa dobrim i umerenim

odgovorom su klasifikovani kao grupa bolesnika koja „pokazuju odgovor na terapiju”, dok su oboleli bez odgovora činili grupu koja „ne pokazuju odgovor na terapiju”. Neželjeni efekti su prikupljeni tokom šestomesečnog praćenja bolesnika. Izolacija DNK izvršena je modifikovanom metodom izolovanja po Mileru iz limfocita periferne krvi. Genotipizacija je izvedena primenom KASP eseja.

Istraživanja su sprovedena u skladu sa Helisinškom deklaracijom i odobreno je od strane Etičkog odbora Instituta za reumatologiju i Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Svi pacijenti su dali pisani pristanak pre uključivanja u studiju.

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 190 referenci.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Doktorska disertacija kandidatkinje dr Milke Grk, poslata je 17.02.2021. na softversku proveru originalnosti korišćenjem programa iThenticate. Rezultati provere originalnosti doktorske disertacije dostavljeni su dana 18.02.2021. Izveštaj je pokazao indeks podudarnost od 7%. Uvidom u Izveštaj utvrđena su podudaranja sa 54 primarna izvora. Podudaranje sa dva izvora je bilo 1%, a sa ostalim izvorima manje od 1%. Podudaranje se najvećim delom odnosilo na standardno prisutne delove doktorskih disertacija (navođenje citata, uobičajenih skraćenica, stručnih termina, opštih fraza, institucija, opštih mesta i podataka), što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18). Uvidom u Izveštaj potvrđena je originalnost rezultata kandidata. Kada se sve izneto uzme u obzir, izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije pod naslovom “Uticaj polimorfizama gena koji kodiraju adenozične receptore na efikasnost i toksičnost monoterapije metotreksatom kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom” kandidatkinje dr Milke Grk, tako da se propisani postupak pripreme za njenu odbranu može nastaviti.

C) Kratak opis postignutih rezultata

Od uključenih 127 pacijenata na terapiju je odgovor pokazalo 112 (88,2%) bolesnika. Koštane erozije je razvilo 82 (64,6%) bolesnika. Neželjeni efekti su bili prijavljeni kod 31 (24,4%) bolesnika. Pre započinjanja terapije metotreksatom bolesnicima je, pomoću DAS28 indeksa, procenjena aktivnost bolesti. Prosečna vrednost DAS28 određena pre početka terapije iznosila je $7,4 \pm 0,9$, a nakon 6 meseci terapije primećeno je njeno značajno sniženje ($4,5 \pm 1,5$, $p < 0,001$). U studiji je učestvovalo 94 (74%) žena. Pol nije statistički značajno uticao na efikasnosti i toksičnosti monoterapije metotreksatom.

Nakon izvršene genotipizacije utvrđeno je da su učestalosti genotipova i alela kod pacijenata sa RA lečenih monoterapijom MTX za sve ispitivane polimorfizme u saglasnosti sa prijavljenim učestalostima u NCBI bazi. U studiji nije uočena statistički značajna povezanost između genotipova i alela izabranih polimorfizama i efikasnosti i toksičnosti MTXa kod pacijenata sa RA. Izvršena je analiza *ADORA_{2A}* i *ADORA₃* haplotipova i njihove povezanosti sa efikasnošću i toksičnošću monoterapije MTXom. *ADORA₃* TAA haplotip bio je češći kod obolelih sa erozijama kostiju (29% prema 15,6%, $p = 0,023$), kao i kod bolesnika sa hepatotoksičnošću (51,3% prema 21,6%, $p = 0,013$).

D) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Prema preporukama EULAR iz 2016. godine metotreksat treba primenjivati kao lek prvog izbora za lečenje RA i ranih artritisa. MTX je i dalje zlatni standard u terapiji RA zbog dobrog bezbednosnog profila, mogućnosti prilagođavanja doze, ali i niske cene (Smolen *et al.*, 2017). Veliki značaj u kontroli bolesti ima i pravovremena, rana primena bolest-modifikujućih lekova. Ovaj terapijski prozor otvoren je relativno kratko i traje šest meseci od pojave prvih simptoma (Farragher *et al.*, 2009; Mesko, 2013). Bez pravovremene i adekvatne terapije, progresivno oštećenje sinovijskih zglobova kod bolesnika sa reumatoidnim artritisom vodi ka invalidnosti i preranoj smrti (Aletaha *et al.*, 2010; Aletaha, Alasti and Smolen, 2015). Iako se MTX koristi u terapiji RA preko 30 godina, još uvek se ne može predvideti efikasnost terapije ovim lekom. Trenutno lečenje se sprovodi po principu pokušaja i greške, što za posledicu ima da se kod bolesnika propušta period terapijskog prozora, a oni se izlažu većem riziku od neželjenih efekata, bržoj progresiji bolesti, duže trpe bolove i imaju lošiji kvalitet života (Sutcliffe *et al.*, 2020). Oko 30% bolesnika nema zadovoljavajući odgovor na monoterapiju metotreksatom, dok se kod oko 20% obolelih terapija prekida zbog pojave neželjenih efekata (Ling and Bluett, 2020). Predviđanje odgovora na terapiju bi značajno unapredilo lečenje i omogućilo dugoročno očuvanje kvaliteta života obolelih od RA (Kłak *et al.*, 2016; Smolen *et*

al., 2017). Međutim, jedna od osnovnih prepreka za primenu personalizovane medicine u lečenju bolesnika sa RA je nedostatak pouzdanih biomarkera (Eektimmerman *et al.*, 2019; Ling and Bluett, 2020). Genske varijante bi bile izuzetno korisni biomarkeri imajući u vidu da su stabilne i nepromenljive, prisutne kod svakog bolesnika i pre započinjanja terapije. Dodatno, testiranja je moguće sprovesti brzo i jeftino (Mesko, 2013; Sutcliffe *et al.*, 2020). Dosadašnja istraživanja pokazuju da adenzinski put igra važnu ulogu u kontroli zapaljenja, dok je istovremeno za dejstvo metotreksata neophodno prisustvo adenzinskih receptora, nekoliko farmakogenetičkih studija je ispitivalo uticaj polimorfizama gena za adenzinske receptore na ishod terapije kod osoba obolelih od RA (Montesinos *et al.*, 2003; Hider *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2009). Polimorfizmi u genima koji kodiraju enzime adenzinskog puta ili su uključeni u *de novo* sintezu purina mogu uticati na sintezu adenzina i samim tim uticati na ishod terapije MTXom kod obolelih od RA (Owen *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017).

Uticaj polimorfizama u *ADORA_{2A}* i *ADORA₃* genima ispitivan je u malom broju studija koje su se bavile efikasnošću i toksičnošću MTXa kod pacijenata obolelih od RA. Hider i saradnici su u svojoj studiji, uočili da je T alel rs2298383 polimorfizma *ADORA_{2A}* gena povezan sa neželjenim reakcijama na lek. Ova razlika je registrovana između grupe bolesnika koji su ispoljili neželjene efekte i grupe bolesnika sa dobrim odgovorom na terapiju. U ovoj studiji odgovor na terapiju MTXom procenjivan je promenom vrednosti SE, pri čemu nije uočen uticaj rs2298383 polimorfizama na efikasnost terapije merene na ovaj način. U istoj studiji CC genotip rs2236624 polimorfizma *ADORA_{2A}* gena češće je bio prisutan kod obolelih koji imaju odgovor na terapiju nego kod osoba sa neželjenim efektima terapije (Hider *et al.*, 2008). U studiji koju su sprovedli Skoup i saradnici uočena je češća pojava reumatoidnih nodula kod nosioca C alela rs2298383 polimorfizma, ali nisu primetili značajnu razliku u učestalosti pojave reumatoidnih nodula kod nosilaca različitih alela/genotipova rs2236624 polimorfizma *ADORA_{2A}* gena tokom terapije metotreksatom (Soukup *et al.*, 2017). U svojoj studiji koja je uključila 233 bolesnika sa RA, Lima i saradnici nisu uočili povezanost ovog polimorfizma sa efikasnošću terapije MTXom i neželjenim efektima leka. Istovremeno se u ovoj studiji navodi da postoji povezanost haplotipa TC (rs2267076/rs2298383) sa neželjenim efektima MTX (Lima *et al.*, 2016). Sharma i saradnici su u svom istraživanju pokazali da je *ADORA_{2A}* rs5751876 T alel vezan za lošiji ishod terapije MTX kod bolesnika sa RA, međutim, u ovoj studiji C alel se ređe pojavljivao u populaciji obolelih osoba, što je u suprotnosti sa rezultatima doktorske disertacije dr Milke Grk, ali i sa očekivanim učestalostima alela ovog polimorfizma

u evropskoj populaciji (Sharma *et al.*, 2009). Stamp i saradnici, u svojoj studiji koja je obuhvatila 225 osoba obolelih od RA, navode da je *ADORA₃* rs1544223 polimorfizam skoro u kompletnom LD sa rs1544224, kao i da *ADORA₃* rs1544224 polimorfizam nije uticao na aktivnost RA, ali je pokazao slabu povezanost sa gubitkom kose i zaboravnošću (Stamp *et al.*, 2012). Sa druge strane, Kobold i saradnici nisu uočili povezanost polimorfizama *ADORA_{2A}* gena (rs2298383, rs2236624, rs5751876, rs17004921), kao ni polimorfizama *ADORA₃* gena (rs2298191, rs1544223, rs3393) sa efikasnošću terapije MTXom kod 212 obolelih od RA. U istoj studiji pokazan je uticaj rs2298383, rs2236624, rs5751876 polimorfizama *ADORA_{2A}* gena na pojavu neželjenih efekata terapije. Potrebno je napomenuti da je u ovoj studiji pojava neželjenih efekata detektovana značajno češće (69,8%) nego u drugim studijama kao i kod obolelih uključenih u studiju dr Milke Grk. Moguće je da je ovako visoka učestalost pojave neželjenih efekata terapije posledica činjenice da je manje od polovine bolesnika lečeno MTXom u monoterapiji, dok su ostali bili na kombinovanoj terapiji (Kobold *et al.*, 2019). U doktorskoj disertaciji dr Milke Grk, analiza haplotipova je pokazala da je haplotip TAA *ADORA₃* gena bio značajno više zastupljen kod bolesnika koji su razvili erozije kostiju u odnosu na bolesnike koji nisu ispoljili ovu manifestaciju (p=0,023), kao i kod bolesnika koji su razvili hepatotoksičnost u odnosu na bolesnike koji nisu ispoljili hepatotoksičnost (p=0,013). Iako pojedinačni polimorfizmi nisu pokazivali povezanost sa ispitivanom varijablom, značaj haplotipova sastavljenih od njih, mogao bi se objasniti zbirnim dejstvom suptilnih uticaja. Uticaj rs1127354 polimorfizama *ITPA* gena na ishod terapije MTXom kod obolelih od RA ispitivan je u nekoliko studija, ali su rezultati i dalje nejasni. Neki od autora su pronašli povezanost mutiranog A alela i lošeg odgovora na terapiju MTXom (Dervieux *et al.*, 2009; Wessels *et al.*, 2006). Istovremeno Lee i saradnici nisu pronašli ovakvu vezu kod 120 bolesnika na monoterapiji MTXom (Lee *et al.*, 2009). Dervieux i saradnici prijavili su postojanje povezanosti *ITPA* rs1127354 polimorfizma sa pojavom gastrointestinalnih neželjenih efekata kod 255 bolesnika sa RA lečenih MTXom, koju mi u svojoj studijom nismo potvrdili (Dervieux *et al.*, 2009).

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Grk M, Milic V, Dolzan V, Maksimovic N, Damnjanovic T, Pjevic MD, Pesic M, Novakovic I; Jekic B. Analysis of association of *ADORA_{2A}* and *ADORA₃* polymorphisms genotypes/haplotypes with efficacy and toxicity of methotrexate in patients with Rheumatoid arthritis. The Pharmacogenomics Journal. 2020;20(6):784-791.

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Uticaj polimorfizama gena koji kodiraju adenoziinske receptore na efikasnost i toksičnost monoterapije metotreksatom kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom“ kandidata dr Milke Grk, predstavlja originalni naučni doprinos razumevanju uticaja nasledne osnove na terapijski odgovor i pojavu neželjenih efekata kod pacijenata lečenih monoterapijom metotreksatom kod obolelih od reumatoidnog artritisa u populaciji Srbije. Treba imati u vidu da je ovo jedna od prvih farmakogenetičkih studija u svetu koje se bave uticajem genskih polimorfizama i haplotipova adenoziinskih receptora i inozin trifosfataze na efekte metotreksata kao monoterapije kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom, kao i pojavu metotreksatom indukovanih neželjenih događaja.

Predviđanje odgovora na terapiju bi značajno unapredilo lečenje i omogućilo dugoročno očuvanje kvaliteta života obolelih od RA. Genske varijante bi bile izuzetno korisni biomarkeri. Kao stabilne i nepromenljive, prisutne su kod svakog bolesnika i pre započinjanja terapije i pri tome testiranja je moguće sprovesti brzo i jeftino pre samog početka lečenja, dok bi se na osnovu dobijenih rezultata mogla usmeriti terapija za svakog obolelog.

Rezultati doktorske disertacije dr Milke Grk su ukazali da su određeni haplotipovi izabranih polimorfizama povezani sa pojavom hepatotoksičnosti i koštanih erozija kod pacijenata sa RA, ali ne i sa efikasnošću terapije MTXom, tačnije haplotip TAA *ADORA*₃ gena je bio značajno više zastupljen kod bolesnika koji su razvili hepatotoksičnost i koštane erozije u odnosu na bolesnike koji nisu ispoljili ove manifestacije. S obzirom na da je hepatotoksičnost jedan od najčešćih neželjenih efekata terapije MTXom, dok je pojava erozija na kostima jedan od znakova lošeg ishoda terapije, rezultati ove studije, ukoliko se potvrde, mogli bi značajno uticati na bolji izbor terapije za svakog pacijenata na samom početku bolesti. Preventivno određivanje ciljanih genskih polimorfizama ili posebno haplotipova koji su povezani sa neželjenim ishodima terapije značajno bi ubrzalo uspostavljanje dobre kontrole bolesti na samom početku lečenja, poboljšalo kvalitet života, ali i sprečilo pojavu neželjenih efekata MTXa kod pacijenata sa određenim genotipom.

Rezultati prikazani u doktorskoj disertaciji dr Milke Grk mogu biti korisni za dalja istraživanja u ovoj oblasti, ispitivanjem uticaja drugih polimorfizama na efikasnost i pojavu neželjenih efekata monoterapije MTXom, imajući u vidu da je ovo lek izbora kojim se započinje lečenje kod pacijenata sa RA.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su precizno definisani, naučni pristup je originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je 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 dr Milke Grk i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 12.4.2021.

Članovi Komisije:

Prof. dr Suzana Cvjetićanin

Doc. dr Predrag Ostojić

Prof. dr Gordana Šupić

Mentor:

Prof. dr Biljana Jekić
