

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА  
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

На IV редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 20.01.2023. године, на основу молбе ментора, др Бранке Зукић и др Милоша Бркушанина, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Бојана М. Ристивојевића, истраживача сарадника на Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду под насловом: **“Фармакогенетички маркери одговора на терапију тиопуринским лековима, метотрексатом и винкристином код деце са акутном лимфобластном леукемијом”** у саставу: проф. др Горан Брајушковић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, члан; проф. др Наташа Чоловић, ванредни професор, Медицински факултет, Универзитет у Београду, члан; др Никола Котур, виши научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, члан.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду, подноси следећи

**ИЗВЕШТАЈ**

**1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ**

Докторска дисертација Бојана Ристивојевића **“Фармакогенетички маркери одговора на терапију тиопуринским лековима, метотрексатом и винкристином код деце са акутном лимфобластном леукемијом”** представља оригинално истраживање које за тему има откривање фармакогенетичких и фармакотранскриптомских маркера одговора на лекове који представљају окосницу терапијских протокола лечења деце оболеле од дечје акутне лимфобластне леукемије (АЛЛ) у Србији.

Ова докторска дисертација је урађена у Лабораторији за молекуларну биомедицину Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду.

Докторска дисертација садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Податке о менторима и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику са

кључним речима, Садржај, Текст по поглављима, Списак литературе и Прилоге. Докторска дисертација написана је на 77 страница, садржи 22 слике и 14 табела. Дисертација је подељена на 7 поглавља: **Увод** (1-17. страна), **Циљ рада** (18-19. страна), **Материјали и методе** (20-32. страна), **Резултати** (33-53 страна), **Дискусија** (54-63. страна), **Закључци** (64-65. страна) и **Литература** (66-77. страна). У прилозима се налазе: Одлука етичког одбора Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство о сагласности са спровођењем истраживања у оквиру докторске тезе, Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

## 2. АНАЛИЗА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

**Увод** ове докторске дисертације садржи четири потпоглавља.

Прво потпоглавље представља кратак осврт на важности фармакогенетике и осталих фармако-омика у савременој медицини и перспективе које она може имати у будућем развоју лечења различитих болести.

У другом потпоглављу дат је кратак опис патологије, демографских и генетичких карактеристика дечје АЛЛ, са детаљнијим освртом на терапијски протокол лечења ове болести у Србији. Истакнута је важност примене лекова који су предмет проучавања у овој тези.

Треће потпоглавље посвећено је досадашњим фармакогенетичким истраживањима у дечјој АЛЛ. Први део овог поглавља односи се на истраживања посвећена фармакогенетичким аспектима одговора на примену тиопуринаских лекова у терапији дечје АЛЛ. Представљен је метаболички пут ових лекова у организму, са детаљним описом структуре и улоге гена нудикс хидроксилаза 15 (*NUDT15*). Описана су претходна фармакогенетичка истраживања везана за овај ген и истакнуте су најважније познате варијанте у овом гену. Други део овог поглавља односи се на истраживања посвећена фармакогенетичким аспектима одговора на примену лека метотрексата у терапији дечје АЛЛ. Описан је механизам дејства овог лека и дат је преглед најважнијих гена и ензима који учествују у његовом метаболизму у организму. Детаљно је представљена структура и улога гена који кодира протеин из породице транспортера органских анјона, члан 1Б1 (*SLCO1B1*) и гена за метилен тетраhydrofolat редуктазу (*MTHFR*). Истакнуте су варијанте у овом генима које су од највећег значаја. Трећи део овог поглавља односи се на

истраживања посвећена фармакогенетичким аспектима одговора на примену лека винкристина у терапији дечје АЛЛ. Описан је механизам дејства овог лека, са освртом на настанак нежељених ефеката његове примене и настанак винкристином индуковане периферне неуропатије (ВИПН). Детаљно је описана структура и улога 5 гена (*CYP3A5*, *CEP72*, *ACTG1*, *MIR3117* и *MIR4481*) и њихових варијантних алела који би могли да буду укључени у фармакокинетику и фармакодинамику винкристина и настанак и развој ВИПН.

У четвртом потпоглављу описан је полигенски скор ризика и могућност његове употребе у развоју предикционих модела. Дат је преглед савремених истраживања из сродних области у којима је полигенски скор ризика коришћен у моделирању развоја испитиваног фенотипа, са посебним освртом на примену у фармакогенетичким истраживањима.

У поглављу **Циљеви рада** јасно су дефинисани главни научни циљеви докторске дисертације. Они су подељени у четири групе циљева.

У првој групи циљева дефинисани су циљеви везани за фармакогенетичке и фармакотранскриптомске аспекте одговора на терапију тиопуриносним лековима код деце оболеле од АЛЛ у Србији. Истраживања везана за овај циљ су обухватила:

1. Детекцију варијанти у кодирајућим и околним регионима гена *NUDT15* код деце оболеле од АЛЛ у Србији и одређивање фармакогенетичког потенцијала детектованих варијанти
2. Одређивање фармакогенетичког потенцијала експресије гена *NUDT15* у мононуклеарним ћелијама у тренутку постављања дијагнозе код деце оболеле од АЛЛ у Србији

Други део циљева се односио на фармакогенетичке аспекте одговора на терапију леком метотрексатом код деце оболеле од АЛЛ у Србији. Истраживања везана за овај циљ су обухватила:

1. Испитивање варијанте rs4149056 у гену *SLCO1B1* као маркера фармакокинетице и токсичности лека метотрексата.

Трећи део циљева се односио на фармакогенетичке аспекте одговора на терапију леком винкристином код деце оболеле од АЛЛ у Србији. Истраживања везана за овај циљ су обухватила:

1. Испитивање варијанти у генима *CEP72* (rs924607), *ACTG1* (rs1135989), *CYP3A5* (rs776746), *MIR3117* (rs12402181) и *MIR4481* (rs7896283) као потенцијалних фармакогенетичких маркера за појаву ВИПН.

Четврти део циљева посвећен је развоју предиктивних фармакогенетичких модела. Истраживања везана за овај циљ су обухватила:

1. Конструисање предиктивног фармакогенетичког модела одговора на терапију, употребом напредних статистичких алата.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** описане су савремене методе молекуларне генетике коришћене у реализацији наведених циљева.

У првом потпоглављу описани су оболели од деце АЛЛ који су били укључени у истраживање и представљени су сурогат маркери који су коришћени за праћење одговора на терапију за сваки испитивани лек. У ретроспективној студији одговора на терапију тиопуринским лековима било је укључено 48 деце оболеле од АЛЛ, анализираних у фази одржавања. Као сурогат маркери токсичности коришћени су број епизода леукопеније, проценат недеља које су оболели проводили без терапије тиопуринским лековима, проценат недеља током којих су оболели добијали снижену дозу 6-меркаптопурина (6-МП) и просечна доза 6-МП. У ретроспективној студији одговора на терапију метотрексатом било је укључено 139 деце оболеле од АЛЛ, анализираних у фази консолидације. Као сурогат маркери токсичности коришћени су појава и градус оралног мукозитиса, гастроинтестиналних токсичности и хепатотоксичности. Као сурогат маркер фармакокинетики метотрексата коришћен је број епизода успорене елиминације метотрексата. У ретроспективној студији одговора на терапију метотрексатом било је укључено 139 деце оболеле од АЛЛ, анализираних у фази консолидације. У ретроспективној студији одговора на терапију винкристином било је укључено 56 деце оболеле од АЛЛ. Као сурогат маркер коришћена је појава ВИПН.

Етички одбор ИМГГИ је дао сагласност за коришћење узорака свих испитаника укључених у ову студију.

У другом потпоглављу описан је процес изолације ДНК из узорака периферне крви, затим ланчана реакција полимеразе (ПЦР) и анализа ПЦР продуката електрофорезом на агарозном гелу. Даље је описана метода пречишћавања ПЦР продуката и секвенцирање Сангеровом методом.

У трећем потпоглављу описан је процес изолације моноклеарних ћелија, као и изолација РНК из њих. Затим је описана метода реверзне транскрипције и дат опис поступка одређивања нивоа експресије гена *NUDT15* методом *real-time* ПЦР.

У четвртом потпоглављу приказане су примењене методе и статистички алати који су коришћени за обраду добијених резултата.

У петом потпоглављу описан је начин на који је полигенски скор ризика израчунат и коришћен у моделовању предикције појаве хепатотоксичности повезане са применом високих доза метотрексата у фази консолидације терапије.

У поглављу **Резултати**, у четири потпоглавља су приказани резултати истраживања уз приказ слика и табела са коментарима и објашњењима.

У првом потпоглављу су приказани резултати дела тезе који се односио на ретроспективну клиничку студију одговора на терапију тиопуринским лековима у српској популацији деце оболеле од АЛЛ. Прво су приказане демографске и основне клиничке карактеристике испитаника. Затим су представљени резултати детекције и учесталост варијанти у кодирајућим и околним регионима гена *NUDT15* за групу од 48 болесника. Ови резултати добијени су методологијом базираном на ПЦР и Сангеровом секвенцирању. Детектовано је 5 варијанти: rs61746486, p.Pro12, у екзону 1, варијанте rs79687000, rs45465203 и rs41284205 у интрону 1 и варијанта rs61973267 у 3'-некодирајућем региону. Даље су описани резултати одређивања нивоа експресије гена *NUDT15* у моноклеарним ћелијама у тренутку успостављања дијагнозе и корелације експресије овог гена са сурогат маркерима одговора на тиопуринску терапију током вазе одржавања. У овај део истраживања укључено је 24 испитаника. Подаци су добијени *real-time* ПЦР методом. Резултати овог дела студије нису показали статистички значајну корелацију нивоа експресије гена *NUDT15* у моноклеарним ћелијама у тренутку успостављања дијагнозе са сурогат маркерима одговора на терапију тиопуринским лековима (број леукопенијских епизода, проценат недеља без терапије 6-МП, проценат недеља са смањеном дозом 6-МП, просечна примљена доза 6-МП).

У другом потпоглављу су приказани резултати дела тезе који се односио на ретроспективну клиничку студију одговора на терапију метотрексатом у српској популацији деце оболеле од АЛЛ. Приказане су демографске и основне клиничке карактеристике испитаника. Затим су приказани резултати генотипизације варијанте rs4149056 у гену *SLCO1B1* у испитиваној групи, српској и европској популацији. Подаци о генотипизацији варијанте rs4149056 у гену *SLCO1B1* у испитиваној групи добијени су

методологијом базираном на ПЦР и Сангеровом секвенцирању. Подаци о учесталости ове варијанте у српској популацији добијени су из постојећих резултата анализе клиничког егзома 134 особе српског порекла (*TruSight One Sequencing* панел гена, *MiSeq* платформа), употребом софтвера *VariantStudio*. Учесталост ове варијанте у европској популацији добијена је из Пројекта 1000 генома (*1000 Genome Project*), преко базе података *Ensembl*. Даље је извршена асоцијација варијанте rs4149056 у гену *SLCO1B1* са нивоима метотрексата у плазми током фазе консолидације за 41 испитаника, који су лечени гранама протокола са већом дозом метотрексата (М и ХР протоколи). Добијени резултати нису показали статистички значајну асоцијацију између варијанте rs4149056 у гену *SLCO1B1* и броја епизода успорене кинетике метотрексата. Затим су представљени резултати асоцијације појаве токсичности услед примене метотрексата у фази консолидације са варијантом rs4149056 у гену *SLCO1B1*. Токсичност је за све испитанике укључене у овај део студије (N=121) процењивана после сваке примљене дозе, а у обзир су узети орални мукозитис, гастроинтестиналне токсичности и хепатотоксичност. Примењеним статистичким тестовима није било могуће проценити асоцијацију испитиване варијанте са појавом хепатотоксичности и оралног мукозитиса. Резултати анализе асоцијације варијанте rs4149056 у гену *SLCO1B1* са појавом гастроинтестиналне токсичности нису показали статистичку значајност.

У трећем потпоглављу су приказани резултати дела тезе који се односио на ретроспективну клиничку студију одговора на терапију винкрестином у српској популацији деце оболеле од АЛЛ. Прво су приказане демографске и основне клиничке карактеристике 56 испитаника који су били укључени у овај део студије. Затим су представљени резултати детекције и учесталост генетичких варијанти које су биле предмет истраживања у овом делу студије (*CEP72*: rs924607, *ACTG1*: rs1135989, *CYP3A5*: rs776746, *MIR3117*: rs12402181 i *MIR4481*: rs7896283). Генотипизација испитиваних варијанти изведена је методологијом базираном на ПЦР и Сангеровом секвенцирању. Учесталости испитиваних варијанти у европској популацији добијене су коришћењем базе података *gnomAD*. Применом статистичких метода није показана повезаност између генетичких варијанти у испитиваним генима и настанка ВИПН код оболелих од дечје АЛЛ.

У четвртном потпоглављу приказани су резултати конструисања предикционог модела развоја хепатотоксичности услед примене метотрексата у фази консолидације терапије деце оболеле од АЛЛ у Србији. Предикциони модел заснован је на полигенском скору ризика, који је укључивао варијанте rs1801133 у гену *MTHFR* и rs4149056 у гену

*SLCO1B1*. Вредности количника вероватноће за ове варијанте добијене су из адекватних метастудија. Развијени модел указује на то да полигенски скор ризика базиран на варијантама rs1801133 и rs4149056 не показује статистички значајну асоцијацију са развојем хепатотоксичности услед примене метотрексата током консолидационе фазе терапије деце оболеле од АЛЛ.

У поглављу **Дискусија**, добијени резултати су критички дискутовани сходно задатим циљевима. Клинички значај резултата студије разматран је контексту најновијих податка из литературе, са посебним освртом на резултате претходних фармакогенетичких студија деце АЛЛ у Србији. Дискусија је подељена у три целине.

У првој целини дискутоване су фармакогенетичке варијанте од значаја за терапију тиопуринским лековима, метотрексатом и винкрестином у децјој АЛЛ. Ова целина подељена је на 3 дела.

Први део представља осврт на фармакогенетички потенцијал варијанти детектованих у гену *NUDT15*. Ген *NUDT15* по први пут је био предмет испитивања у српској популацији, те су подаци добијени у оквиру ове студије и од популационог значаја. За варијанте детектоване у овој студији досадашњим истраживањима није показано да имају функционалан значај. Дискутована је потреба да се резултати добијени у овој студији валидирају у репликативним студијама већег обима и свебухватнијим техникама.

У другом делу дискутован је фармакогенетички потенцијал варијанте rs4149056 у гену *SLCO1B1*. Лек метотрексат је био предмет проучавања већег броја студија и у свету и у српској популацији, али не постоји маркер који је у употреби у клиничкој пракси као предиктор одговора на терапију овим леком. Више студија указало је да варијанта rs4149056 у гену *SLCO1B1* има велики фармакогенетички потенцијал у предикцији нежељених ефеката примене високих доза метотрексата у лечењу деце АЛЛ. Резултати ове студије, међутим, указују да у српској популацији деце оболеле од АЛЛ то није случај, што је резултат који је добијен и у сличним студијама других истраживачких група. Дискутована је потреба да се разлози за разлике у добијеним резултатима потраже у другим генетичким и негенетичким факторима.

Трећи део представља дискусију о фармакогенетичком потенцијалу варијанти у генима *CEP72* (rs924607), *ACTG1* (rs1135989), *CYP3A5* (rs776746), *MIR3117* (rs12402181) и *MIR4481* (rs7896283) као потенцијалних фармакогенетичких маркера за појаву ВИПН. Релативно мали број студија је проучавао генетичке маркере одговора на примену

винкрестина у децјој АЛЛ, међу којима не постоји консензус у резултатима. Резултати добијени у оквиру ове тезе не указују на асоцијацију испитиваних генетичких варијанти и развоја ВИПН код деце оболеле од АЛЛ у Србији. Дискутован је значај проучавања ове проблематике и начини како да се будуће фармакогенетичке студије унапреде и превазиђу разлике у добијеним резултатима међу истраживачким групама.

У другој целини дискутована је могућност коришћења нивоа експресије гена *NUDT15* у тренутку постављања дијагнозе као фармакотранскриптомског маркера одговора на терапију тиопуринаским лековима код деце са АЛЛ. Ово је прва студија која се бавила овом проблематиком. Добијени резултати не указују на везу између нивоа експресије овог гена пре примене било какве терапије и појаве нежељених ефеката терапије тиопуринаским лековима у фази одржавања. Дискутовани су разлози за овакве резултате и потреба да се сличне студије спроведу у већем обиму и у другим контролним тачкама током терапије.

У трећој целини дискутовани су резултати добијени употребом полигенског скорa ризика у моделовању предикције хепатотоксичности до које долази услед примене високих доза метотрексата у фази консолидације. Такође, дискутовани су и адекватно образложени разлози за избор овог начина моделовања. Овај модел није показао статистички значајну везу варијанти које су биле укључене у рачунање полигенског скорa ризика са развојем хепатотоксичности услед примене високих доза метотрексата у фази консолидације, али је потврдио резултате који су добијени независним испитивањем ових варијанти. Указана је потреба да се у будућности оваква истраживања спроведу у већем обиму, како би велики потенцијал оваквог моделовања био што боље искоришћен.

У поглављу **Закључци**, на јасан начин је изнето више закључака који у потпуности произилазе из добијених резултата. У складу са приказаним резултатима, изведени су следећи закључци:

1. Ниво експресије гена *NUDT15* у тренутку постављања дијагнозе не може бити коришћен као фармакотранскрипциони маркер појаве нежељених ефеката до којих долази услед примене тиопуринаских лекова у терапији одржавања код деце оболеле од децје АЛЛ у Србији.
2. Варијанта rs4149056 у гену *SLCO1B1* тренутно не може бити коришћена као фармакогенетички маркер одговора на примену метотрексата у фази консолидације терапије деце оболеле од АЛЛ у Србији.



3. Генетичке варијанте испитиване у оквиру ове студије тренутно не показују потенцијал да буду коришћене као фармакогенетички маркери појаве ВИПН код деце оболеле од АЛЛ у Србији.
4. Развијени предикциони модел показује да не постоји статистички значајна повезаност између полигенског скорa ризика који укључује варијанте rs1801133 у гену *MTHFR* и rs4149056 у гену *SLCO1B1* и развоја хепатотоксичности услед примене метотрексата у фази консолидације код деце лечене од АЛЛ у Србији.

У поглављу **Литература**, наведен је списак од 171 цитираних страних и домаћих научних часописа и књига. Коришћена литература је адекватна, актуелана и довољно широка да покрива све аспекте истраживања. Навођења литературе у самом тексту дисертације су примерена и по садржају и по месту.

### 3. БИБЛИОГРАФИЈА

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

##### Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Ristivojević, B.**, Kotur, N., Stanković, B., Gašić, V., Lazić, J., Pavlović, S., & Zukić, B. (2022). The pharmacogenomics of vincristine-induced peripheral neuropathy in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients in Serbia-a single center experience. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*, 150(1-2), 53-58.

**M23** doi: <https://doi.org/10.2298/SARH210813099R>

<http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?id=0370-81792100099R#.Y91QOHbMJEY>

2. Kotur, N., Lazić, J., **Ristivojević, B.**, Stanković, B., Gasić, V., Dokmanović, L., ... & Pavlović, S. (2020). Pharmacogenomic markers of methotrexate response in the consolidation phase of pediatric acute lymphoblastic leukemia treatment. *Genes*, 11(4), 468.

**M22** doi: <https://doi.org/10.3390/genes11040468>

<https://www.mdpi.com/2073-4425/11/4/468>

## **Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја**

1. Vladimir Gašic, Nikola Kotur, Biljana Stankovic, **Bojan Ristivojevic**, Dragana Janic, Lidija Dokmanovic, Jelena Lazic, Branka Zukic, Jelena Peric, Sonja Pavlovic. 24th Congress of the European Hematology Association, Amsterdam, The Netherlands. Novel pharmacogenomic and pharmacotranscriptomic markers in pediatric acute lymphoblastic leukemia, 13-16 June 2019. 267235; Abstract book: PS934. **(M34)**

2. **Bojan Ristivojević**, Nikola Kotur, Biljana Stanković, Vladimir Gašić, Đorđe Pavlović, Marina Jelovac, Sonja Pavlović, Branka Zukić. ESHG Pharmacogenetics Course, Portorož, Slovenia. The pharmacogenomics of vincristine-induced peripheral neuropathy in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients in Serbia, 22-24 September 2022. Abstract book: COBISS.SI-ID 122119427 ISBN 978-961-267-220-1 **(M34)**

## **Провера оригиналности докторске дисертације**

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „**Фармакогенетички маркери одговора на терапију тиопуринским лековима, метотрексатом и винкристином код деце са акутном лимфобластном леукемијом**“, кандидата Бојана М. Ристивојевића, утврђено подударане текста износи 12%. Овај степен подударности претежно је последица навођења научних звања и афилијација чланова комисије, коришћења стручних израза и назива гена, генетичких варијанти, ензима, описа делова методолошких протокола за које су јасно наведене референце, као и препознавања делова реченица за које је очигледно да нису преузети из других извора, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

#### 4. МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Докторска дисертација кандидата Бојана М. Ристивојевића под насловом: **“Фармакогенетички маркери одговора на терапију тиопуринским лековима, метотрексатом и винкрестином код деце са акутном лимфобластном леукемијом”** представља оригиналан научни рад који се бави откривањем фармакогенетичких маркера одговора на терапију тиопуринским лековима, метотрексатом и винкрестином код деце оболеле од АЛЛ. Теза се одликује јасно дефинисаним циљевима и адекватно планираним и успешно реализованим истраживачким поступком.

Остварени резултати објављени су у оквиру два оригинална научна рада, што потврђује актуелност и значајност добијених резултата. Такође, текст дисертације је прошао проверу оригиналности.

На основу увида у експериментални рад, постигнуте резултате као и написану докторску тезу, Комисија закључује да су задаци постављени у циљевима испуњени, тако да позитивно оцењује докторску тезу и има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати позитивну оцену докторске дисертације Бојана М. Ристивојевића и омогући кандидатз јавну одбрану рада.

У Београду, 6. фебруара 2023. године

#### КОМИСИЈА:

---

проф. др Горан Брајушковић, редовни професор,  
Биолошки факултет, Универзитет у Београду, члан

---

проф. др Наташа Чоловић, редовни професор,  
Биолошки факултет, Универзитет у Београду, члан

---

др Никола Котур, виши научни сарадник, Институт за  
молекуларну генетику и генетичко инжењерство,  
Универзитет у Београду (ИМГГИ), члан