

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 11.03.2020. godine, broj 9700/07-GM, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„ Uticaj polimorfizama gena značajnih za farmakokinetiku 6-merkaptopurina na lečenje akutne limfoblastne leukemije u dece“

kandidata dr Gorana Miloševića, zaposlenog u Univerzitetnoj dečjoj klinici u Beogradu.

Mentor je prof. dr Lidija Krivokapić Dokmanović a komentor je prof. dr Milica Bajčetić

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Dragana Janić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Nada Krstovski, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Nina Žigon, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
4. N. sav. dr Sonja Pavlović, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd
5. Prof. dr Vladimir Jurišić, profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu

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 Gorana Miloševića napisana je na ukupno 64 strane i podeljena je na poglavlja uvod, ciljevi, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključak i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno pet tabela, 19 grafikona i 6 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** je jasno definisano šta je to akutna limfoblastna leukemija, kakva je epidemiologija bolesti uz osvrt na etiologiju i faktore rizika. Precizno je objašnjena klinička slika bolesti, dijagnostički postupci, definisanje grupa rizika i osnovni principi terapije. Opisani su terapijski protokoli koji se koriste u lečenju akutne limfoblastne leukemije kod dece, kao i prognoza

bolesti. S obzirom na predmet doktorske disertacije, u daljem toku je definisan pojam farmakogenomike i farmakogenetike, kao i značaj koji ove discipline imaju u planiranju terapije u mnogim granama medicine, naročito u pedijatrijskoj hematologiji. U sledećem poglavlju su definisani tiopurinski lekovi, koji su značajan deo hemioterapijskih protokola u lečenju akutne limfoblastne leukemije kod dece. Objasnjeno je mehanizam dejstva i metabolizam ovih lekova kao i uticaj genskih polimorfizama na efikasnost i neželjene efekte terapije. Definisani su enzimi koji su od značaja za metabolizam tiopurnskih lekova: tiopurin S-metiltransferaza (TPMT) i inozin trifosfat pirofosfataza (ITPA) kao i transportni proteini važni za transport tiopurinskih lekova i njihovih metabolita iz ćelije: P-glikoprotein, kodiran od strane *ABCC4* gena i Multidrug Resistance Protein 4, kodiran od strane *ABCBI* gena. Objasnjena je njihova potencijalna uloga u individualizovanju terapije akutne limfoblastne leukemije dečjeg doba.

Ciljevi rada su precizno definisani i sastoje se od ispitivanja učestalosti genetičkih varijanti u genima *TMPT*, *ITPA*, *MRP4* i *ABCBI* kao i njihove povezanosti sa pojavom toksičnosti kod dece obolele od akutne limfoblastne leukemije. Takođe je kao cilj rada navedeno ispitivanje uticaja ovih polimorfizama na ishod lečenja dece obolele od akutne limfoblastne leukemije.

U poglavlju **materijal i metode** su navedene demografske karakteristike ispitanika, način izvođenja studije: da je studija sprovedena u Univerzitetnoj dečjoj klinici u Beogradu, vremenski period u kome je studija sprovedena, način prikupljanja podataka kao i način prikupljanja biološkog materijala za analize koji je potom obrađivan u Institutu za molekularnu genetiku i genetički inženjering u Beogradu. Precizno je definisana terapija koju su bolesnici primali kao i korekcije doza lekova u skladu sa relevantnim kontrolnim analizama. U ovom poglavlju je prikazano da je studija odobrena je od strane Etičkog odbora Univerzitetske dečje klinike i Etičkog odbora, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Roditelji ili staratelji svih bolesnika su dali pisani pristanak pre uključenja u studiju. Jasno su definisane sve metode korišćene u studiji, pozivajući se na ranije objavljene radove i doktorske disertacije. Definisane su i statističke metode korišćene za deskripciju i analizu prikupljenih podataka.

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 82 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Doktorska disertacija je potvrdila, do sada poznate podatke da bolesnici koji boluju od akutne limfoblastne leukemije i nosioci su za neaktivni *TPMT* alel, zahtevaju redukciju doze 6-MP u toku terapije održavanja, zbog izražene mijelotoksičnosti. U kohorti ispitivanih bolesnika detektovana su četiri bolesnika sa varijantom u *TPMT* genu, što iznosi 5,8%. Tri od ta četiri bolesnika su nosioci *TPMT*3A* a jedan bolesnik je bio nosilac *TPMT*3C* varijante. Statistička analiza nije pokazala postojanje razlika u toksičnosti u odnosu na *TPMT* genotip, što je i bilo očekivano jer su doze 6-merkaptopurina već bile prilagođene genotipu. Varijanta u genu *ITPA* kod ispitivanih bolesnika je detektovana u pet bolesnika što iznosi 7%, a analiza nije pokazana povezanost ove varijante sa povećanim toksičnim efektima 6-MP. Genetička varijanta u genu *ABCC4* takođe nije pokazala povezanost sa povećanom toksičnošću. Varijante *ABCC4* c.*1372GG i *ABCC4* c.*1372TG su detektovane u 5% odnosno 35% u ispitivanoj grupi bolesnika. Nosioci varijante u genu *ABCB1* su imali izraženiju hepatotoksičnost u odnosu na nosioce *wild type* alela. Varijante *ABCB1*c.2677TT i *ABCB1*c.2677GT su bile prisutne u 19% odnosno 38% bolesnika. Primenom predikcionih modela u kojima su korišćene gore nabrojane genske varijante kao ulazne varijable, omogućila je istraživaču prepoznavanje bolesnika koji su u povećanom riziku da razviju izražene toksične efekte tokom terapije 6-merkaptopurinom u 71% slučajeva.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

TPMT genotip bolesnika obolelog od akutne limfoblastne leukemije je pre više od jedne decenije uveden u primenu i individualizaciju doze 6-MP (Relling et al, 2013). Dosadašnje studije i kliničke opservacije su pokazale da korekcija doze shodno *TPMT* genotipu ne uspeva kod svih bolesnika da eliminiše ili redukuje pojavu toksičnih efekata

6-MP, što je dovelo da zaključka da *TPMT* polimorfizmi ne mogu da objasne interindividualne razlike u ispoljavanju toksičnosti kod svih bolesnika (Stocco et al, 2013).

Učestalost varijantnog alela u *ITPA* genu, *ITPA* c.94CA, u ispitivanoj grupi bolesnika bila je 7%, što se slaže sa do sada objavljenim podacima iz literature za pripadnike bele rase 5-7% (Marsh et al, 2009). Učestalost je značajno veća kod Azijske populacije i kreće se u rasponu od 19% do 28% (Marsh et al, 2009; Wan Rosalina et al, 2012). Wan Rosalina i saradnici su pokazali da su nosioci varijantnih alela u *ITPA* genu, u većem riziku da razviju povišenu telesnu temperaturu, kao znak infekcije, i hepatotoksičnost tokom primene 6-MP u toku terapije održavanja, što nije dokazano u ispitivanoj grupi bolesnika. Studija sprovedena u Japanu od strane Tanake i saradnika, pokazala je da *ITPA* genotip ima značajan uticaj na pojavu hepatotoksičnosti (Tanaka et al, 2012), dok je Stocco sa saradnicima pokazao da su bolesnici koji su nosioci varijantnog alela u *ITPA* genu u većem riziku da razviju febrilnu neutropeniju, ali samo ukoliko im je doza 6-MP već prilagođena *TPMT* genotipu (Stocco et al, 2009). Iako je učestalost pojave febrilne neutropenije bila povećana kod ovih bolesnika, to nije uticalo na smanjenje EFS (eng. event free survival), jer su sve epizode febrilne neutropenije promptno i agresivno lečene, primenom odgovarajućih antibiotika te je prekid u primeni 6-MP bio minimalan. Iako je u našoj grupi, doza 6-MP bila prilagođena prethodno određenom *TPMT* genotipu, rezultati se ne slažu sa rezultatima navedene studije Stocco i grupe autora. U našoj studiji, nije zabeležena ni jedna epizoda febrilne neutropenije, što je verovatno posledica malog broja ispitanika. Naime, u ispitivanoj kohorti je bilo svega četiri *TPMT* pozitivna bolesnika, od kojih je samo jedan bio nosilac varijantnog alela u *ITPA* genu. Izražena toksičnost kod bolesnika koji su nosioci varijantnog alela u *ITPA* genu, koja je prisutna samo kod *TPMT* pozitivnih bolesnika se uklapa u dosadašnja saznanja da je *TPMT* dominantan način inaktivacije tiopurinskih lekova, i da se tek kod bolesnika koji su deficijentni za *TPMT*, aktiviraju, odnosno postaju dominantni drugi putevi inaktivacije tiopurinskih lekova, kao što je put preko *ITPA*. Ovo objašnjava, zašto varijante u *ITPA* genu ne utiču značajno na inaktivaciju 6-MP kod one dece kod kojih je očuvan primarni put inaktivacije – *TPMT*. U prilog povećane toksičnosti kod bolesnika koji su nosioci varijantnog alela u genu *ITPA*, govori i povećana intracelularna koncentracija toksičnih 6-MP metabolita koja je uočena u studiji de Beaumais i saradnika. Međutim, neke studije nisu pokazale postojanje povezanosti između varijanti u

genu za ITPA i toksičnih efekata terapije (Hawwa et al, 2008). Rezultati našeg ispitivanja su pokazali da ne postoji povezanost između varijantnih alela u genu za ITPA, tj. da varijante *ITPA* gena ne mogu biti nezavisni prediktor toksičnosti uzrokovane 6-MP, bilo u smislu mijelotoksičnosti ili hepatotoksičnosti. Kontradiktorni podaci u literaturi, pa i naše studije u odnosu na druge, mogu biti posledica relativno malog broja ispitanika, s obzirom da se radi o retkom oboljenju. Takođe, način na koji se definiše toksičnost tj. varijable koje se koriste kao markeri toksičnosti mogu u značajnoj meri uticati na tumačenje rezultata.

ABCC4 gen kodira protein MRP4 čija je fiziološka uloga u organizmu da iz ćelija izbacuje štetna jedinjenja, u koja se ubrajaju i citostatici. Studije na životinjskim modelima su pokazale da je niska ekspresija *ABCC4* gena odgovorna za povećanu osetljivost na tiopurinske lekove i povećanu mijelotoksičnost (Lopez-Lopez et al, 2013). Studija Ansarija i saradnika je pokazala da povećana ekspresija *ABCC4* gena može biti odgovorna za terapijski neuspeh u lečenju ALL kod dece (Ansari et al, 2009). Ta studija je pokazala da su varijante u *ABCC4* genu koje povećavaju ekspresiju MRP4 povezane sa smanjenim EFS kod dece obolele od ALL. Naša studija nije pokazala povezanost varijantnih alela sa povećanom toksičnošću, niti sa lošijim preživljavanjem kod naših pacijenata.

ABCB1 transporter ili P-glikoprotein, kao efluks pumpa štiti ćeliju od toksičnih efekata ksenobiotika i značajno utiče na efikasnost terapije i ispoljavanje terapijskih efekata lečenja. Učestalost varijanti u *ABCB1* genu, *ABCB1*c.2677GT i *ABCB1* c.2677TT u Koreanskoj populaciji dece sa ALL je 36% i 9% (Kim et al, 2012). U našoj grupi ispitanika učestalosti istih varijanti su bile 38% i 19%. U istoj studiji, Kim i saradnici nisu uspela da dokažu povezanost varijantnih alela u *ABCB1* genu sa povećanom mijelotoksičnošću i ishodom. Naši rezultati su u saglasnosti sa ovom studijom, jer nismo uspeli da dokažemo postojanje povezanosti varijanti u *ABCB1* genu i povećanog rizika za razvoj toksičnosti, tj. nismo uspeli da potvrdimo da bi ova varijanta mogla da bude nezavisan prediktor mijelotoksičnosti. U našoj studiji je pokazano da postoji povećana incidenca pojave hepatotoksičnosti kod bolesnika koji su nosioci varijantnih alela *ABCB1* gena, što nije pokazano u do sada objavljeni studijama. Ovaj rezultat se verovatnije može objasniti istovremenom primenom metotreksata, nego kao neželjeni efekat primene 6-MP (Lopez-Lopez et al, 2019). Gregers i saradnici su ispitivali povezanost varijanti u *ABCB1* genu i mijelotoksičnosti i hepatotoksičnosti i nisu uspeli da dokažu povezanost

*ABCB1*c.2677GT i *ABCB1* c.2677TT varijanti sa hepatotoksičnošću ali su pokazali povećanu učestalost mijelotoksičnosti kod nosioca varijantnih alela (Gregers et al, 2015). Univarijantna analiza naših bolesnika nije uspjela da pokaže povezanost posmatranih genskih varijanti sa povećanom mijelotoksičnošću, osim za dobro poznatu povezanost u varijantama u *TPMT* genu.

Do sada nije bilo studija koje su analizirale 6-MP toleranciju ili toksičnost koristeći prediktivne modele u kojima su ulazne varijable specifične genske varijante. Ova studija je prva, u kojoj su korišćene specifične genske varijante za predikciju toksičnosti koristeći prediktivne modele. Najbolja predikcija je postignuta upotrebom Neural net algoritam, kojim je postignuto da se jasno izdvoje bolesnici koji će imati dobru toleranciju, odnosno lošu toleranciju u 71% slučajeva.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Milosevic G, Kotur N, Lazic J, Krstovski N, Stankovic B, Zukic B, Janic D, Jurisic V, Pavlovic S, Dokmanovic L. Influence of variants in folate metabolism genes on 6-mercaptopurine induced toxicity during treatment for childhood acute lymphocytic leukemia. *J BUON*. 2019 24(5):2075-2083. M23, IF 1.379
2. G. Milosevic, N. Kotur, N. Krstovski, J. Lazic, B. Zukic, B. Stankovic, D. Janic, T. Katsila, G. P. Patrinos, S. Pavlovic, and L. Dokmanovic, Variants in *TPMT*, *ITPA*, *ABCC4* and *ABCB1* genes as predictors of 6-mercaptopurine induced toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Med Biochem*. 2018;37(3):320-327. M23, IF 2.000

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Uticaj polimorfizama gena značajnih za farmakokinetiku 6-merkaptopurina na lečenje akutne limfoblastne leukemije u dece“ dr Gorana Miloševića, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u razmevanju farmakogenomike 6-merkaptopurina. Ova doktorska disertacija ima značajan doprinos u dizajniranju panela farmakogenomskih markera za predviđanje 6-MP indukovane toksičnosti kod dece obolele od ALL, što bi omogućilo maksimalnu personalizaciju terapije i povećanje preživljavanja.

Doktorska disertacija, dr Gorana Miloševića 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 dr Gorana Miloševića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 30.4.2020. godine

Članovi Komisije:

Prof. dr Dragana Janić

Prof. dr Nada Krstovski

Prof. dr Nina Žigon

N. sav. dr Sonja Pavlović

Prof. dr Vladimir Jurišić

Mentor:

Prof. dr Lidija Krivokapić Dokmanović

Komentor:

Prof. dr Milica Bajčetić
