

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 28.04. 2016. godine, broj 5940/4 imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Zna aj polimorfizama u genima koji kodiraju enzime uklju ene u metabolizam metotreksata u dece sa akutnom limfoblastnom leukemijom”

kandidata mr sci. dr Jelene Lazi , zaposlene u Univerzitetskoj de joj klinici, kao lekar specijalista pedijatrije i subspecijalista hematologije. Mentor je doc. dr Nada Krstovski.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Dragana Jani , redovni profesor, Univerzitetaska de ja klinika, Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Lidija Dokmanovi , vanredni profesor, Univerzitetaska de ja klinika, Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu
3. Dr Sonja Pavlovi , nau ni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i geneti ko inženjerstvo

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakulteta slede i

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija mr sci. dr Jelene Lazi napisana je na 145 strana i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 5 slika, 34 tabele i 52 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćena imena korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je detaljno prikazana etiologija, epidemiološke karakteristike, klinička slika, lečenje i prognoza akutne limfoblastne leukemije (ALL), najčešće maligne bolesti u pedijatrijskom uzrastu, sa posebnim osvrtom na patogenetske mehanizme koji uestvuju njenom nastanku. Istaknut je značaj primene metotreksata (MTX) u savremenim terapijskim protokolima za decu obolelu od ALL. Jasno je objašnjen metabolizam MTX i na njezinu farmakodinamiku (PD) i farmakokinetiku (PK) tokom i nakon administracije leka. Navedeni su dosadašnji rezultati ispitivanja toksičnosti MTX i ukazano je na značaj rane predikcije neželjenih efekata.

Zasebno su obrađene oblasti farmakogenetike i farmakogenomike, kao najsavremeniji na njezinu toksičnosti terapije. Pojedinačno je objašnjen mehanizam učestvovanja četiri ispitana gena (*MTHFR*, *DFHR*, *SLC19A1* i *TYMS*) u kodiranju enzima uključenih u metabolizam MTX. Prikazana je potencijalna uloga ispitivanih gena u patogenezi ALL, detaljno je ukazano na mogućnost u ispoljavanju neželjenih dejstava leka na različite sisteme i organe i uticaj na stepen toksičnosti tokom primene MTX. Takođe je ukazano na korelaciju navedenih gena i ishoda lečenja dece obolele od ALL. Poseban osvrt je dat na genetičke varijante izdvojenih gena, njihov diverzitet i ulogu u pojavi recidiva osnovne bolesti.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se u ispitivanju uticaja gena koji kodiraju enzime uključenih u metabolizam MTX i njihovih varijanti na tok i ishod lečenja dece obolele od ALL. Na prvom mestu cilj doktorske disertacije je bio da se utvrdi uestalost varijanti c.677C>T i c.1289A>C u genu za *MTHFR*, -680 C>A, -675 A>G, -556 T>C, -464 A>T i -317 A>G u genu za *DFHR*, c.80G>A u genu za *SLC19A1*, 28 bp tandemski ponovak i 6 bp

delecija u genu za *TYMS*. Uestalost polimorfizama je ispitana u dece obolele od ALL i kontrolnoj grupi i jedan od ciljeva je bio poreenje incidence u bolesnih i zdravih osoba. Nezavisno od farmakogenetikih markera, cilj je bio da se ispita PK MTX i da se zatim koreliraju sa navedenim polimorfizmima. Tako e, praena je klinika i laboratorijska toksinost tokom terapije MTX i istraženo je da li postoji povezanost pojedina njih ili udruženih varijanti u ispitanim genima sa poveanom toksinoš u MTX. Na osnovu ispitanih parametara ideja je bila da se utvrdi da li postoji modulacija terapije i u kojoj meri kod prisustva pojedina njih i/ili udruženih geneti ki varijanti. Krajnji cilj je bio da se utvrdi uticaj navednih polimorfizama u genima za *DFHR*, *MTHFR*, *SLC19A1* i *TYMS* na ishod dece obolele od ALL.

U poglavlju **Materijal i metode** naznaeno je da su dijagnostika i leenje dece obolele od ALL sprovedeni u Službi za hematologiju i onkologiju Univerzitetske de je klinike (UDK) po kriterijumima i smernicama savremenih internacionalnih protokola. U istoj ustanovi su praena PK MTX, kao i laboratorijska toksinost, dok su farmakogeneti ke analize raene na Institutu za medicinsku genetiku i geneti ki inžinering u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu. Za uzorkovanje biološkog materijala su roditelji pacijenata dali pismenu saglasnost. Sve analize su odobrene od strane Eti kog odbora UDK i Eti kog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Jasno su opisane procedure detekcije varijanti u genima koji kodiraju enzime koji u estvuju u metabolizmu MTX. DNK je izolovana pomo u *QIAamp DNA Blood Mini Kita* prema uputstvu proizvo a a. Analiza DNK vršena je elektroforetskim razdvajanjem na horizontalnom agaroznom gelu, dok je za analizu DNK fragmenata koriš ena elektroforeza na poliakrilamidnom gelu. Varijante u genu *TYMS* su odre ivane PCR metodom. PCR-RFLP metoda je koriš ena za odre ivanje varijante tipa SNV, konkretno *MTHFR* c.677 C>T. Alel-specifi ni PCR je bio metoda izbora za *MTHFR* c.1298 A>C i *SLC19A1* c.80 G>A. Za detekciju varijanti u promotoru gena *DHFR* je raeno sekvenciranje PCR produkata. Statisti ka obrada podataka je vršena odgovaraju im testovima u zavisnosti od prirode posmatrane varijable.

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 152 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Istraživanje je ukazalo da ne postoji razlika u učestalosti ispitivanih genetičkih varijanti u genima za *MTHFR*, *DFHR*, *SLC19A1* i *TYMS* između dece obolele od ALL i zdravih osoba. Dokazana je niska incidenca nepovoljnih genotipova u našoj populaciji i prikazani su pojedinačni najčešći haplotipovi ispitivanih gena. Nije vidjen uticaj pola na učestalost detektovanih polimorfizama u navedenim genima, ali je pokazano da deca kod kojih je detektovan *TYMS* 6bp D/D polimorfizam kasnije obolevaju od ALL u odnosu na druge varijante u istom genu.

U odnosu na imunofenotipske karakteristike, pokazana je statistički značajna razlika među ispitivanim genima: *MTHFR* c.1298 A>C korelira sa manje povoljnim, T-ćelijskim imunofenotipom, dok se *DHFR* varijante -675 A>G, -556 T>C, -464 A>T detektuju isključivo u dece sa B-ćelijskom ALL. Nije vidjena povezanost između ekstrapredularne diseminacije bolesti, na prvom mestu u centralni nervni sistem (CNS infiltracija), i detektovanih polimorfizama. Pokazana je korelacija genetičkih varijanti u *TYMS* genu sa kompleksnim kariotipom u dece sa ALL.

Prikazana je brzina ulaska u remisiju bolesti u zavisnosti od određenih vremenskih tačaka i vidjena je povezanost određenih genetičkih varijanti sa sporijom kinetikom blata 15. dana nakon početka: *TYMS* 6bp i 28 bp i *DHFR* -680 C>A i -317 A>G. Polimorfizmi u ispitivanim genima nisu uticali na stepen remisije 33. dana terapije.

Pokazano je da su većina ukupno (kliničku i laboratorijsku) toksičnost ispoljila deca koja su primala niže doze MTX (2 g/m² vs 5 g/m²) i da se broj i stepen neželjenih efekata statistički značajno češće javljao u starijem uzrastu, posebno u desetoj godini života. Videno je da parenteralna primena MTX u intenzivnoj fazi lečenja češće dovodi do pojave kliničke toksičnosti u odnosu na peroralnu primenu u završnoj fazi terapijskog protokola, kada se u

ve em procentu detektuje laboratorijska toksi nost, na prvom mestu hepatotoksi nost. Decca kod kojih su se ispoljila neželjena dejstva terapije MTX su u najve em broju imala nizak stepen toksikosti, prema jasno definisanom gradiranju u protokolu le enja. U odnosu na PK, dokazano je da je naj eše usporenje eliminacije leka vi eno u 48. satu od po etka primene MTX i da je u najve em broju decca trajalo manje od 24h, uz dodatne terapijske mere, predvi ene terapijskim protokolom. Vi en je protektivni efekat varijante c.677 T/T u *MTHFR* genu u bolesnika koji su primali niže doze MTX: decca sa tim polimorfizmom su najre e ispoljavala toksi nost tokom primene leka u dozi od 2 g/m². Korelacijom PK i varijanti u ispitivanim genima pokazano je da su decca sa *TYMS* 6bp D/D varijantom statisti ki zna ajno eše imala povišene nivoe MTX. Tako e, decca sa varijantama *MTHFR* c.1298 C/C, *DHFR* -675 G/G, -556 C/C i -464 T/T i *SLC19A1* c.80 A/A vremenom ispoljavaju ve u toksi nost MTX pri ponavljanim ekpozicijama ve im dozama leka (5 g/m²).

Ukupno preživljavanje ispitanika u studiji je iznosilo 87%. Jasno su definisani i prikazani razli iti faktori koji uti u na prognozu, me u kojima se izdvojila varijanta -464 T/T u *DHFR* genu. Decca sa tim polimorfizmom su zna ajno eše razvila recidiv osnovne bolesti što je u toj grupi bolesnika uticalo na nepovoljan krajnji ishod le enja.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su klini ke i laboratorijske karakteristike decca obolele od ALL na dijagnozi u saglasju sa podacima iz literature (Hunger S.P. i saradnici, 2015).

Komparacija analiziranih geneti kih varijanti u genima koji kodiraju enzime koji u estvuju u metabolizmu MTX u obolele decca i u kontrolnoj grupi nije ukazala na razliku u u estalosti. Ovakav zaklju ak oponira pretpostavci da odre eni polimorfizmi u estvuju u leukemogenezi, ali su opre ni rezultati dobijeni u studijama koje su sprovedene u adultnih pacijenata sa ALL (Deligezer U. i saradnici, 2003). U studiji koja je sprovedena u našoj populaciji, a koja je ispitivala u estalost varijanti u *MTHFR* genu kod pacijenata sa trombofilijom tako e nije ukazala na razliku izme u obolelih i zdravih osoba kao kontrolne grupe (or evi V. i saradnici, 2004).

Rezultati ove studije ukazuju na korelaciju *DHFR* varijanti -675 A>G, -556 T>C, -464 A>T sa B- elijskim imunofenotipom i *MTHFR* c.1298 A>C sa T-ALL. Povezanost različitih genetičkih varijanti sa imunofenotipom je opisana u literaturi: pokazano je da *SLC19A1* gen ima veći kapacitet za vezivanje MTX kod dece sa B- elijskom u poređenju sa T- elijskom ALL (Zhang L. i saradnici, 1998). U ovom istraživanju je viđena i korelacija genetičkih varijanti u *TYMS* genu sa kompleksnim kariotipom u dece sa ALL. Slični podaci su objavljeni i od strane drugih autora: deca sa t(12;21), kod kojih je viđena povišena ekspresija *SLC19A1* gena su razvila veći otpor u rezistenciju na MTX (Wojtuszkiewicz A. i saradnici, 2015). Pacijenti sa više genetičkih rearanžmana mogu da imaju manju akumulaciju MTX poliglutamata, što bitno menja odgovor na terapiju i ukazuje na značaj individualnog genetskog profilisanja.

Uсталost, manifestacija i stepen toksičnosti MTX kod pacijenata u ovoj studiji odgovara podacima iz literature (El-Khodary N.M. i saradnici, 2012). Uticaj varijanti u genima *TYMS* 6bp i 28 bp i *DHFR* -680 C>A i -317 A>G na sporiju kinetiku blata 15. dana lečenja, koji je viđen u bolesnika u ovom istraživanju, poklapa se sa podacima iz literature (Wojtuszkiewicz A. i saradnici, 2015), gde je pokazana rezistencija leukemijski izmenjenih elija na MTX kod prisustva polimorfizama u genima *DHFR*, *SLC19A1* i *TYMS*.

Protektivan efekat varijante c.677 T/T u *MTHFR* genu u ispoljavanju toksičnosti tokom parenteralne primene MTX se može objasniti niskom aktivnošću enzima u *MTHFR* genu, uzrokovanom homozigotnom c.677T varijantom koja dovodi do redukovano stepena konverzije 5,10-metilentetrahidrofolata u 5-metiltetrahidrofolat. Visok nivo 5,10-metilentetrahidrofolata olakšava *de novo* sintezu purina i timidilata, što dovodi do smanjenja toksičnih efekata MTX (Aplenc R. i saradnici, 2005). Međutim, u literaturi se nalaze kontroverzni podaci vezani za predikciju toksičnosti MTX na osnovu prisustva ovog genotipa. Pojedini autori su objavili rezultate istraživanja gde ukazuju na upravo suprotan efekat – da se u pacijenata sa ovim polimorfizmom češće javlja toksičnost tokom terapije MTX (Yang L. i saradnici, 2012 i Araoz H.V. i saradnici, 2015). Interesantno je da je jedan od najcitiranijih radova koji je pokazao nepovoljan uticaj c.677T varijante *MTHFR* genu (D'Angelo V. i saradnici, 2011) doveden u pitanje ponovnom statističkom obradom rezultata objavljenog ispitivanja (Lopez-Lopez E. i saradnici, 2013). Tako je dokazano da je ovaj polimorfizam

povezan sa manjom toksi noš u tokom primene MTX, što je u saglasnosti sa rezultatima ovog istraživanja i odgovara podacima iz drugih studija (Kantar M. i saradnici, 2009). Kontroverzni statovi u objavljenoj stru noj literaturi se mogu objasniti razli itom distribucijom nepovoljnih haplotipova koji uti u na status ispitivanih gena i sledstveno na ispoljavanje toksi nosti u toku primene MTX (Erculj N. i saradnici, 2012).

Usporena PK MTX kod dece sa *TYMS* 6bp D/D i ve a toksi nost pri ponavljanim izlaganjima visokim dozama MTX u pedijatrijskih pacijenata sa *MTHFR* c.1298 C/C, *DHFR* -675 G/G, -556 C/C i -464 T/T i *SLC19A1* c.80 A/A geneti kim varijantama se objašnjava stepenom uticaja navedenih polimorfizama na PD ispitivanog leka (Rocha J.C. i saradnici, 2005). Mogu nost predikcije odgovora na terapiju na osnovu farmakogeneti kih markera predstavlja siguran na in doziranja potencijalno vrlo toksi nog leka, kao što je MTX.

U ovoj disertaciji je prikazano ukupno preživljavanje dece sa ALL od 87%, što je rezultat vrlo blizak procentu izle enja u razvijenim zemljama koji iznosi 90% (Pui C.H. i saradnici, 2015). Ova studija nije pokazala da prisustvo ispitivanih geneti kih varijanti direktno uti e na procenat izle enja, ali je ukazala na potencijalno loš faktor prognoze u dece sa -464 T/T varijantom u *DHFR* genu, koja su zna ajno eš e razvila recidiv ALL, što su u skorašnjim radovima objavili i drugi autori (Kodidela S. i saradnici, 2015).

D) Objavljeni radovi koji ine deo doktorske disertacije

1. **Lazi J**, Kotur N, Krstovski N, Dokmanovi L, Zuki B, Predojevi -Samardži J, Životi M, Miloševi G, ori M, Jani D, Pavlovi S. Importance of pharmacogenetic markers in the methylenetetrahydrofolate reductase gene during methotrexate treatment in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. Archives of Biological Sciences, 2016 (*in press*).

E) Zaklju ak (obrazloženje nau nog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Zna aj polimorfizama u genima koji kodiraju enzime uklju ene u metabolizam metotreksata u dece sa akutnom limfoblastnom leukemijom**” dr Jelene Lazi predstavlja originalni nau ni doprinos u razumevanju mehanizama koji u estvuju u klini kom i laboratorijskom ispoljavanju toksi nosti tokom primene MTX. Ovim

istraživanjem rasvetljeni su izvesni aspekti vezani za ulogu ispitivanih geneti kih varijanti u leukemogenezi i njihova povezanost sa ishodom dece obolele od ALL. Navedeni rezultati ove doktorske teze potkrepljuju pretpostavku da farmakogeneti ki markeri, kao individualni faktori, imaju uticaj na pojavu i stepen toksi nosti tokom parenteralne i peroralne terapije MTX. Toksi nost visokog stepena zna ajno uti e na krajnji ishod le enja, što svrstava ispitane farmakokineti ke i farmakogeneti ke markere u prognosti ke faktore od zna aja. Korelacija odre enih geneti kih varijanti sa potencijalnim recidivom osnovne bolesti je tako e ispitana i jasno prikazana. Rezultati ove doktorske disertacije bi mogli da pomognu u razumevanju leukemogeneze i da ukažu na zna aj prevencije toksi nosti kroz modulaciju terapije prema genetskom profilu pacijenta.

Doktorska disertacija je ura ena prema svim principima nau nog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, nau ni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistemati no prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovaraju i zaklju ci.

Na osnovu svega navedenog, i imaju i u vidu dosadašnji nau ni rad kandidata, komisija predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju mr sci. dr Jelene Lazi i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 24.05.2016. godine

lanovi Komisije:

Mentor:

Prof. dr Dragana Jani

Doc. dr Nada Krstovski





Prof. dr Lidija Dokmanovi



N. Sav. dr Sonja Pavlovi


