

Биолошки факултет
Број захтева: 33/148-1
Датум: 12.6.2015.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији за кандидата на докторским студијама

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 162/11-пречишћени текст, 167/12, 172/13 и 178/14), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији:

КАНДИДАТ: **Никола М. Котур**

студент докторских студија на студијском програму Молекуларна биологија, Молекуларна биологија еукариота.

пријавио је докторску дисертацију под називом:

„Фармакогенетика 6-меркаптопурина и метотрексата у дечјој акутној лимфобластној леукемији“.

из научне области: Биолошке науке.

Универзитет је дана 27.11.2014. године, својим актом под бр. 02 Број: 61206-5345/2-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

„Фармакогенетика 6-меркаптопурина и метотрексата у дечјој акутној лимфобластној леукемији“.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 17.04.2015. год, одлуком Факултета под бр. 33/78-17.04.2015. год. у саставу:

	Име и презиме члана комисије	звање	научна област	Установа у којој је запослен
1.	др Бранка Зукић	научник сарадник	молекуларна биологија	Универзитет у Београду- Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство
2.	др Соња Павловић	научни саветник	молекуларна биологија	Универзитет у Београду- Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство
3.	др Душанка Савић- Павићевић	ванредни професор	биохемија и молекуларна физиологија	Универзитет у Београду- Биолошки факултет

Напомена: уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 12. јуна 2015. године.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

Прилог: 1. Реферат комисије са предлогом.

2. Акт Наставно-научног већа факултета о усвајању реферата

3. Примедбе дате у току стављања реферата на увид у јавности, уколико је таквих примедби било.

4. Електронска верзија.



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

33/148-12.6.2015.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 1. Статута Универзитета у Београду-Биолошког факултета, Наставно-научно веће Факултета, на VIII редовној седници одржаној 12.6.2015. године, донело је

О Д Л У К У

Прихвата се Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

Николе Котура, под називом:

„Фармакогенетика 6-меркаптопурина и метотрексата у дечјој акутној лимфобластној леукемији“.

Универзитет је дана 27.11.2014. године. својим актом под бр. 02 Број: 61206-5345/2-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

N. Kotur, B. Stankovic, K. Kassela, M. Georgitsi, A. Vicha, I. Leontari, L. Dokmanovic, D. Janic, N. Krstovski, K. Klaassen, M. Radmilovic, M. Stojiljkovic, G. Nikcevic, A. Simeonidis, G. Sivolapenko, S. Pavlovic, G. P. Patrinos, and B. Zukic, “6-mercaptapurine influences TPMT gene transcription in a TPMT gene promoter variable number of tandem repeats-dependent manner.” *Pharmacogenomics*, vol. 13, no. 3, pp. 283–95, Feb. 2012. **M21**

I. Jančić, M. Šefik-Bukilica, S. Živojinović, N. Damjanov, V. Spasovski, **N. Kotur**, K. Klaassen, S. Pavlović, B. Bufan, and N. Arsenović-Ranin, “Influence of Promoter Polymorphisms of the TNF- α (-308G/A) And IL-6 (-174G/C) Genes On Therapeutic Response To Etanercept In Rheumatoid Arthritis,” J. Med. Biochem., pp. 1–8, Jan. 2015. **M23**

Декан Биолошког факултета

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- Стручној служби Факултета.

Проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

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

На VI редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду одржаној 17.04.2015. године, прихваћен је извештај ментора др Бранке Зукић и др Соње Павловић о урађеној докторској дисертацији Николе М Котура, истраживача сарадника Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду под насловом: „Фармакогенетика 6-меркаптопурина и метотрексата у децјој акутној лимфобластној леукемији“ и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Бранка Зукић, научни сарадник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, др Соња Павловић, научни саветник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду и др Душанка Савић Павићевић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Николе Котура је оригинално истраживање које за тему има анализу различитих фармакогеномичких фактора потенцијално значајних за индивидуализацију терапије лековима 6-меркаптопурином (6-МП), метотрексатом (МТХ), бактримом и нистатином. Ови лекови су део терапије педијатријских пацијента оболелих од акутне лимфобластне леукемије (АЛЛ).

Докторска дисертација Николе Котура је урађена у Лабораторији за молекуларну биомедицину Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду.

Докторска дисертација се састоји из поглавља: Резиме (на српском и енглеском језику), Увод, Циљеви, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. Дисертација је написана на 132 стране и садржи 13 слика, 16 табела и 199 наслова у поглављу Литература који се адекватно наводе у тексту.

АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Предмет докторске дисертације је анализа генетичких варијација који модулишу метаболичке путеве лекова који се примењују у фази одржавања приликом лечења педијатријских АЛЛ пацијената и њихов фармакогеномички и молекуларно-епидемиолошки потенцијал. Узимајући у обзир фармакогеномичке принципе, размотрена је и потенцијална употреба анти-ТНФ лекова приликом лечења АЛЛ.

У поглављу УВОД разматрана су општа и савремена сазнања везана фармакогеномику лекова који се користе за лечење дечје АЛЛ у фази одржавања. Најпре су представљени модел системи болести за анализу фармакогеномичких маркера. Детаљно су описани метаболички путеви лекова 6-МП-а и МТХ-а, који чине окосницу терапије педијатријских АЛЛ пацијената у фази одржавања. Такође, представљени су гени који кодирају ензиме и транспортере укључене у фармакокинетику лекова 6-МП-а и МТХ-а, као и природних фолата. Осим тога размотрена је улога варијација у генима *ТНФ* и *ИЛ-6*, као потенцијалних фармакогеномичких маркера за лекове бактрим и нистатин, који се дају АЛЛ пацијентима током терапије одржавања, као и анти-ТНФ агенаса који се користе у лечењу РА, а потенцијално и у терапији дечје АЛЛ.

Поглавље ЦИЉЕВИ садржи јасно дефинисане циљеве овог истраживања. Прва група циљева је била да се у српској популацији педијатријских АЛЛ пацијената и у контролној групи здравих испитаника одреде учесталости варијација у генима *ТПМТ*, *ИТПА*, *ТИМС*, *МТХФР*, *ДХФР*, *СЛЦ19А1*, *АБЦБ1* и *АБЦЦ4*, да би се проценио њихов фармакогеномички потенцијал, као и улога ових варијанти као фактора ризика за развој дечје АЛЛ. Осим тога, циљ је био да се

испитају варијанте у генима *ТНФ* и *ИЛ-6* као потенцијални фармакогеномички маркери за анти-ТНФ терапију код РА пацијената да би се одредило која група педијатријских АЛЛ пацијената би могла имати користе од примене анти-ТНФ лекова. Друга група циљева је била да се испита експресија гена *ТПМТ* као фармакогеномичког маркера у дечјој АЛЛ и да се испитају фактори који могу утицати на експресију овог гена: пол, узраст и терапија одржавања АЛЛ пацијената, као и варијације у гену *ТПМТ*, са фокусом на регион променљивог броја тандемских поновака (ВНТР) у промотору овог гена. Циљ је био и да се утицај ВНТР региона у промотору гена *ТПМТ* и третман К562 ћелијске линије леком 6-МП-ом на *ТПМТ* транскрипцију испитају и *in vitro*, функционалним есејима са репортерским вектором.

У оквиру поглавља МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ прецизно је дефинисана студијска група коју су чинили педијатријски АЛЛ пацијенти, РА пацијенти и контролна група здравих испитаника. Детаљно су описане примењене методе базиране на ПЦР-у, коришћене за одређивање генетичких варијација у горе наведеним генима. Такође, описан је qRT-PCR есеј и остале методе потребне за анализу експресије гена *ТПМТ*, у узорима крви и косне сржи педијатријских АЛЛ пацијената. Представљена је и методологија за извођење функционалних САТ есеја са репортерским вектором користећи К562 ћелијску линију. За статистичку обраду података су коришћени параметријски тестови – т тест и једно и двофакторијална АНОВА, као и непараметријски статистички тестови – χ^2 , Фишеров егзактни тест, Крускал-Волисов, Ман-Витнијев и Вилкоксонов тест еквивалентних парова.

У поглављу РЕЗУЛТАТИ кандидат је изложио добијене резултате спроведеног истраживања. Први део овог поглавља приказује популациону анализу фармакогеномичких маркера, испитује фармакогеномички потенцијал изучаваних генетичких варијација и анализира ове варијације у светлу ризика за развој дечје АЛЛ. Резултати популационе студије су показали да је учесталост алела у генима *ТПМТ*, *АБЦБ1*, *ТУМС*, *МТХФР*, *СЛЦ19А1*, *ДХФР*, *ИЛ-6* и *ТНФ* слична као код других европских популација. Алел ц.94А у гену *ИТРА* има мању учесталост, док алел рс9516519, нуклеотид Г, у гену *АБЦЦ4* има већу учесталост у српској популацији у односу на друге европске популације. На основу

учесталости алела, резултати указују да за српску популацију варијанта *АБЦЦА* rs9516519 има већи, док *ИТПА* ц.94 Ц>А има мањи фармакогеномички потенцијал. Учесталости генотипова у генима *ИТПА*, *АБЦБ1*, *АБЦЦ4*, *ТУМС*, *МТХФР*, *СЛЦ19А1* и *ДХФР* који кодирају ензиме и транспортере метаболичких путева лекова 6-МП-а и МТХ-а су биле сличне у групи здравих контролних испитаника и АЛЛ пацијената. Овај резултат иде у прилог тези да изучаване варијације не учествују у етиологији дечје АЛЛ. Код носилаца комбинованог генотипа *ИЛ-6* -174 ГГ и *ТНФ* -308 ГГ терапија РА пацијената анти-ТНФ леком етанерцептом се показала најефикаснијом. Носилаца овог комбинованог генотипа у српској популацији има око 40%, те би пре свега код ове групе требало размотрити употребу анти-ТНФ агенаса, како за лечење РА, тако и потенцијално АЛЛ код пацијената код којих се болест тешко клинички контролише.

Други део поглавља РЕЗУЛТАТИ се односи на функционалну анализу ВНТР региона гена *ТПМТ* у току третмана К562 ћелија леком 6-МП-ом. Третман К562 ћелија леком 6-МП-ом у трајању од 72 сата смањује ниво *ТПМТ* транскрипције *in vitro* и то смањење је зависно од ВНТР архитектуре у промотору овог гена. ВНТР алели могу утицати на мало смањење (*АБ4Ц*), интермедијарно смањење (*А2Б3Ц*, *А4БЦ*, *АБ2Ц*, *А5БЦ*, *А2БЦ* и *А3БЦ*) и велико смањење (*А6БЦ*, *АБ5Ц*, *А3Б2Ц* и *А2Б2Ц*) транскрипције гена *ТПМТ*. Са повећањем броја А поновака ниво *ТПМТ* транскрипције се израженије смањује код К562 ћелија третираним леком 6-МП-ом. Поред тога, третман К562 ћелија леком 6-МП-ом је повезан са израженијим смањењем нивоа *ТПМТ* транскрипције код ВНТР алела који имају два Б поновака, у односу на ВНТР алеле са једним Б поновком.

Трећи део поглавља РЕЗУЛТАТИ се односи на експресиону анализу гена *ТПМТ* у узорцима крви и косне сржи АЛЛ пацијената пре хемотерапије и у току терапије одржавања. Експресија гена *ТПМТ* код дечјих АЛЛ пацијената је око 3.3 пута већа у току терапије одржавања, када они добијају лекове 6-МП и МТХ, него пре почетка хемотерапије. Повећање нивоа *ТПМТ* експресије је било најизраженије за носиоце ВНТР*5а/*5а генотипа, док је најмање повећање *ТПМТ* експресије забележено код носилаца ВНТР*7а алела. Већи број поновака типа А у оквиру ВНТР региона у промотору гена *ТПМТ* смањује ниво експресије гена *ТПМТ* у току терапије одржавања код дечјих АЛЛ пацијената. Повећање нивоа

ТПМТ експресије у току терапије одржавања зависи од дужине трајања терапије. Постоји тенденција да се током терапије одржавања *ТПМТ* експресија временом смањује, али ипак остаје виша у односу на ниво пре почетка хемотерапије. Такође, постоји тенденција да старија деца оболела од АЛЛ имају већи ниво *ТПМТ* експресије у току терапије одржавања, док пре увођења хемотерапије, узраст деце не утиче на ниво *ТПМТ* експресије. Пол педијатријских АЛЛ пацијената не утиче на ниво експресије гена *ТПМТ* ни пре почетка хемотерапије ни у току терапије одржавања.

У поглављу ДИСКУСИЈА, сходно задатим циљевима и представљеним резултатима, разматран је клинички значај добијених резултата и дат упоредни преглед са литературним подацима. Оцењен је фармакогеномички потенцијал анализираних генетичких варијација са освртом на специфичности српске популације у односу на остале европске популације. Коментарисан је значај генетичких варијација које потенцијално модулишу одговор на терапију лековима 6-МП-ом и МТХ-ом као фактора ризика за развој дечје АЛЛ. Дискутовано је повећање експресије гена *ТПМТ* забележено у току терапије одржавања код АЛЛ пацијената и његов утицај на активност *ТПМТ* ензима и одговор на терапију леком 6-МП-ом. Размотрена је улога варијација у генима *ТНФ* и *ИЛ-6* као фармакогеномичких маркера за лекове нистатин, бактрим и анти-*ТНФ* агенсе. На основу фармакогеномичке анализе варијација у генима *ТНФ* и *ИЛ-6* код РА пацијената и ефикасности анти-*ТНФ* терапије, предложено је да се размотри увођење анти-*ТНФ* терапије код педијатријских АЛЛ пацијената, носилаца специфичне комбинације варијанти у генима *ТНФ* и *ИЛ-6* код којих се болест тешко клинички контролише.

У поглављу ЗАКЉУЧЦИ, јасно је изнето 22 закључака који у потпуности произилазе из добијених резултата.

БИБЛИОГРАФИЈА

Никола Котур је публиковао 5 научних радова, учествовао са 20 саопштења на међународним научним скуповима и има 1 саопштење на скуповима националног значаја што укупно чини 26 библиографских јединица.

Сви публиковани радови и саопштења су из уже научне области дисертације, а 8 библиографских јединица је уско повезано са темом докторске дисертације, од чега су 2 рада у часописима са СЦИ листе.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Радови у часописима међународног значаја

1. **N. Kotur**, B. Stankovic, K. Kassela, M. Georgitsi, A. Vicha, I. Leontari, L. Dokmanovic, D. Janic, N. Krstovski, K. Klaassen, M. Radmilovic, M. Stojiljkovic, G. Nikcevic, A. Simeonidis, G. Sivolapenko, S. Pavlovic, G. P. Patrinos, and B. Zukic, “6-mercaptopurine influences TPMT gene transcription in a TPMT gene promoter variable number of tandem repeats-dependent manner.,” Pharmacogenomics, vol. 13, no. 3, pp. 283–95, Feb. 2012. **M21**
2. I. Jančić, M. Šefik-Bukilica, S. Živojinović, N. Damjanov, V. Spasovski, **N. Kotur**, K. Klaassen, S. Pavlović, B. Bufan, and N. Arsenović-Ranin, “Influence of Promoter Polymorphisms of the TNF- α (-308G/A) And IL-6 (-174G/C) Genes On Therapeutic Response To Etanercept In Rheumatoid Arthritis,” J. Med. Biochem., pp. 1–8, Jan. 2015. **M23**

Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја M34

1. Branka Zukic, **Nikola Kotur**, Biljana Stankovic, Lidija Dokmanovic, Dragana Janic, Nada Krstovski, Sanja Srzentic, Irena Glumac, Kristel Klaassen, Milena Ugrin, Natasa Totic, Gordana Nikcevic, Sonja Pavlovic. Transcription of TPMT Gene is Influenced by Number and Type of VNTR Repeats in the Promoter of the Gene. Up Close and Personalized, The 3rd International Congress on Personalized Medicine, 26-29 June, 2014. Prague, Czech Republic. Abstract book: p77.
2. **Nikola Kotur**, Jelena Lazic, Branka Zukic, Predrag Kalaba, Biljana Stankovic, Maja Stojiljkovic, Goran Milosevic, Nada Krstovski, Lidija Dokmanovic, Dragana Janic, Sonja Pavlovic. Association between MTHFR, TYMS, SLC19A1 and DHFR Genetic Polymorphisms and Liver Toxicity in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. Up Close and Personalized, The 3rd International Congress on Personalized Medicine, 26-29 June, 2014. Prague, Czech Republic.
3. Branka Zukic, **Nikola Kotur**, Biljana Stankovic, Lidija Dokmanovic, Dragana Janic, Nada Krstovski, Maja Stojiljkovic Petrovic, Kristel Klaassen, Milena Ugrin, Natasa Totic, Gordana Nikcevic, Sonja Pavlovic. Transcription of TPMT gene is increased during 6-MP therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia patients.

RE(ACT), 5-8 March, 2014, Basel, Switzerland.

4. **Kotur N**, Stankovic B, Dokmanovic L, Janic D, Krstovski N, Stojiljkovic Petrovic M, Klaassen K, Ugrin M, Pavlovic S, Zukic B. Six-mercaptopurine positively influences TPMT gene transcription through VNTR region. AABC, 10-12 October, 2013, Bled, Slovenia, Abstract book: p157.
5. Zukic B, **Kotur N**, Stankovic B, Stojiljkovic Petrovic M, Pavlovic S. Pharmacogenomics in Serbia. AABC, 10-12 October, 2013, Bled, Slovenia, Abstract book: p39.
6. Stankovic B, **Kotur N**, Stojiljkovic M, Nikcevic G, Kostic T, Dokmanovic L, Janic D, Krstovski N, Georgitsi M, Patrinos GP, Pavlovic S, Zukic B. Six-mercaptopurine influences thiopurine S-methyltransferase gene transcription: another evidence of pharmacogenetic potential of the promoter variable number of tandem repeats. 9th Balkan Congress of Medical Genetics, 15-17 September, 2011, Timisoara, Romania, Abstract book: p21-22.

МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу изложеног у овом Извештају сматрамо да резултати кандидата Николе Котура представљају оригиналан и значајан научни допринос у области фармакогеномике. Добијени резултати представљају допринос разумевању улоге и значаја које варијанте у генима *ТПМТ*, *ИТПА*, *ТИМС*, *МТХФР*, *ДХФР*, *СЛЦ19А1*, *АБЦЦ4*, *АБЦБ1*, *ТНФ* и *ИЛ-6* имају као потенцијални фармакогеномички маркери.

У изради дисертације, кандидат Никола Котур је показао изузетан степен познавања основне научне проблематике, самосталност у постављању хипотеза и циљева и приступању експерименталним задацима. Током израде докторске дисертације, кандидат је применио адекватне методе истраживања и обраде добијених резултата, које је критички дискутовао уз исцрпне податке из литературе.

На основу свега наведеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај Извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације Николе Котура под насловом: „Фармакогенетика 6-меркаптопурина и метотрексата у дечјој акутној лимфобластној леукемији“

Београд, 11. 05. 2015.

др Бранка Зукић, научни сарадник
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство
Универзитет у Београду

др Соња Павловић, научни саветник
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство
Универзитет у Београду

др Душанка Савић Павићевић, ванредни професор
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

