

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Bojan M. Ristivojević

FARMAKOGENETIČKI MARKERI ODGOVORA  
NA TERAPIJU TIOPURINSKIM LEKOVIMA,  
METOTREKSATOM I VINKRISTINOM KOD  
DECE SA AKUTNOM LIMFOBLASTNOM  
LEUKEMIJOM

Doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Bojan M. Ristivojević

PHARMACOGENETIC MARKERS OF RESPONSE  
TO THERAPY WITH THIOPURINE DRUGS,  
METHOTREXATE, AND VINCRISTINE IN  
CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC  
LEUKEMIA

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023.

---

**MENTORI:**

**dr Branka Zukić**, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

**dr Miloš Brkušanin**, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

**ČLANOVI KOMISIJE:**

**prof. dr Goran Brajušković**, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

**prof. dr Nataša Čolović**, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

**dr Nikola Kotur**, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Datum odbrane: \_\_\_\_\_ 2023. godine

---

---

## Zahvalnica

*Ova doktorska disertacija osmišljena je i u potpunosti realizovana u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu.*

*Posebnu zahvalnost dugujem svojoj mentorki, dr Branki Zukić. Branka, hvala ti što si, pored nesebičnog rada i velikog truda, za mene imala i veliko strpljenje, razumevanje i prijateljsku podršku kada je bilo teško.*

*Zahvalan sam i mentoru dr Milošu Brkušaninu, na korisnim savetima i pomoći u izradi ove disertacije.*

*Veoma sam zahvalan i članovima komisije, prof. dr Goranu Brajuškoviću, prof. dr Nataši Čolović i dr Nikoli Koturu na vremenu i trudu koje su posvetili čitanju ove teze i davanju konstruktivnih kritika kako bi ona izgledala što bolje.*

*Svim kolegama iz Laboratorije za molekularnu biomedicinu zahvalan sam na nesebičnoj pomoći i korisnim savetima. Hvala vam na svakodnevno lepoj radnoj i prijateljskoj atmosferi i na srdačnom prihvatanju u kolektiv. Posebnu zahvalnost dugujem dr Sonji Pavlović, rukovodiocu Laboratorije. Sonja, beskrajno sam Vam zahvalan na pruženoj šansi da se bavim naukom, kao i na poverenju u radu koje ste mi ukazivali sve ovo vreme.*

*Zahvalan sam i saradnicima iz odeljenja za hematologiju i onkologiju Univerzitetske dečje klinike u Beogradu, bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć.*

*Zahvalio bih se svim prijateljima koji su bili uz mene tokom izrade ove teze, a naročito Anđi, Aniti i Nemanji. Hvala vam na svim lepim trenucima i što ste verovali u mene i bodrili me kada mi je to bilo najpotrebnije.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima i bratu, koji su mi tokom celog školovanja bili apsolutna i bezrezervna podrška. Hvala Vam na bezuslovnoj ljubavi koja me je gurala kroz život.*

Bojan

---

---

# Farmakogenetički markeri odgovora na terapiju tiopurinskim lekovima, metotreksatom i vinkristinom kod dece sa akutnom limfoblastnom leukemijom

## Sažetak

Akutna limfoblastna leukemija (ALL) je najčešći malignitet dečjeg doba. Napredak u lečenju usmeren je ka smanjenju pojave neželjenih efekata terapije, primenom principa farmakogenetike.

U ovoj studiji istraživanje je bilo usmereno ka otkrivanju farmakogenetičkih i farmakotranskriptomskih markera odgovora na lekove koji su okosnica terapijskih protokola lečenja dece obolele od ALL (tiopurinski lekovi, metotreksat i vinkristin).

Analizirani su uzorci krvi i koštane srži 139 dece sa ALL. Varijante u ispitivanim genima detektovane su metodom *PCR*-a i Sangerovim sekvenciranjem. Nivo ekspresije *NUDT15* u mononuklearnim ćelijama određen je *real-time PCR*-om. Korelacija farmakomarkera sa kliničkim parametrima vršena je statističkim testovima.

Odgovor na ispitivane lekove procenjivan je u retrospektivnim kliničkim studijama. Pokazano je da nivo ekspresije *NUDT15* na prezentaciji bolesti ne korelira sa pojavom neželjenih efekata terapije tiopurinskim lekovima. U ispitivanoj grupi detektovano je 5 varijanti u genu *NUDT15* koje nemaju patogeni efekat. Varijanta rs4149056 u genu *SLCO1B1* je izučavana kao marker farmakokinetike i toksičnosti metotreksata. U ovoj studiji nije potvrđen njen klinički značaj. Analiziran je farmakogenetički potencijal varijanti u genima *CYP3A5*, *CEP72*, *ACTG1*, *MIR3117* i *MIR4481* kao markera odgovora na terapiju vinkristinom. Nije potvrđena korelacija ovih varijanti sa nastankom perifernih neuropatija kod dece sa ALL. Razvijen je predikcioni model za hepatotoksičnost izazvanu metotreksatom, zasnovan na poligenском skoru rizika.

Ova studija je doprinela znanjima koja vode ka personalizaciji lečenja dece obolele od ALL.

**Ključne reči:** farmakogenetika, dečja akutna limfoblastna leukemija, tiopurinski lekovi, metotreksat, vinkristin, poligeniski skor rizika, nudiks hidroksilaza 15 (*NUDT15*), vinkristinom indukovana periferna neuropatija (*VIPN*)

**Naučna oblast:** Molekularna biologija eukariota

**Uža naučna oblast:** Molekularna genetika

---

---

# Pharmacogenetic markers of response to therapy with thiopurine drugs, methotrexate, and vincristine in children with acute lymphoblastic leukemia

## Summary

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood malignancy. Treatment progress is aimed at reducing the occurrence of side effects of therapy, by applying the principles of pharmacogenetics.

The aim of this study was to discover pharmacogenetic and pharmacotranscriptomic markers of response to drugs that are the backbone of therapeutic protocols for the treatment of children with ALL (thiopurine drugs, methotrexate and vincristine).

Blood and bone marrow samples of 139 children with ALL were analysed. Variants in the tested genes were detected by PCR and Sanger sequencing. The expression level of *NUDT15* in mononuclear cells was determined by real-time PCR. The correlation of pharmacomarkers with clinical parameters was performed using statistical tests.

The response to the investigated drugs was evaluated in retrospective clinical studies. It was shown that the level of *NUDT15* expression at the presentation of the disease does not correlate with the occurrence of side effects of thiopurine drug therapy. In this study 5 variants in the *NUDT15* gene were detected, which do not have a pathogenic effect. The rs4149056 variant in the *SLCO1B1* gene was assessed as a marker of methotrexate pharmacokinetics and toxicity. Its clinical significance was not confirmed in this study. The pharmacogenetic potential of variants in *CYP3A5*, *CEP72*, *ACTG1*, *MIR3117* and *MIR4481* genes as markers of response to vincristine therapy was analysed. The correlation of these variants with the onset of peripheral neuropathies in children with ALL has not been confirmed. A predictive model for methotrexate-induced hepatotoxicity based on the polygenic risk score was developed.

This study contributed to the knowledge that leads to the personalization of the treatment of children with ALL.

**Key words:** pharmacogenetics, childhood acute lymphoblastic leukemia, thiopurine drugs, methotrexat, vincristine, polygenic risc score, nudix hydroxylase 15 (*NUDT15*), vincristine-induced peripheral neuropathy (VIPN)

**Scientific field:** Molecular biology of eukaryotes

**Scientific subfield:** Molecular genetics

---

---

## LISTA SKRAĆENICA

**6-MP-** 6-merkaptopurin

**6-TG-** 6-tioguanin

**ABCB1-** ATP vezujuća kasetna supfamilija B, član 1 (eng. *ATP binding cassette subfamily B member 1*)

**ACTG1-** Gama aktin (eng. *Actin gama 1*)

**ALL-** Akutna limfoblastna leukemija

**BFM-** Berlin-Frankfurt-Munster

**CEP72-** Centrozomalni protein 72 (eng. *Centrosomal protein 72*)

**CPIC-** Konzorcijum za kliničku implementaciju farmakogenetike (eng. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*)

**CPNDS-** Kanadska farmakogenomička mreža za bezbednost lekova (eng. *Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety*)

**CYP3A5-** citohrom P450, familija 3, supfamilija A, član 5 (eng. *Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 5*)

**ddNTP-** Didezoksiribonucleotid fosfat

**DHFR-** Dihidrofolat reduktaza

**dNTP-** Dezoksinukleotid trifosfat

**DPWG-** Holandska farmakogenetička radna grupa (eng. *Dutch Pharmacogenetics Working Group*)

**GAS5-** Duga nekodirajuća RNK, faktor zaustavljanja rasta 5 (eng. *growth arrest specific 5*)

**GMPS-** Guanozin monofosfatf sintetaza

**GWAS-** Studije genomskih asocijacija (eng. *Genome-Wide Association Studies*)

**HPRT1-** Hipoksantin fosforibozil transferaza

**HR-** Visok rizik

**IMPDH1-** Inozin monofosfat dehidrogenaza

**IR-** Srednji rizik

**ITPA-** Inozin trifosfataza

**MAF-** Učestalost manje zastupljenog alela (eng. *Minor allele frequencies*)

**me6-MP-** Metil 6-merkaptopurin

**me6-TG-** Metil 6-tioguanin

**meTGMP-** Metil tioguanozin monofosfat

**meTIMP-** Metil 6-tioinozin-5'-monofosfat

**MIR3117-** Gen za mikro RNK 3117

**MIR4481-** Gen za mikro RNK 4481

**miRNK-** Mikro RNK

**MRB-** Minimalna rezidualna bolest

---

---

**MTHFR**- Metilentetrahidrofolat reduktaza

**MTX**- Metotreksat

**NCI**- Američki nacionalni nstitut za rak (engl. *National Cancer Institute*)

**NDPK**- Nukleotid difosfat kinaza

**NR3C1**- Jedarni receptor iz supfamilije 3, grupe C, član 1 (eng. *Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1*)

**NUDT15**- Nudiks hidroksilaza 15, sinonim MTH2

**PCR**- Lančana reakcija polimerizacije (eng. *Polimerase Chain Reaction*)

**PharmGKB**- Farmakogenomička baza znanja (eng. *The Pharmacogenetics Knowledge Base*)

**PharmVar**- Konzorcijum za farmakogenetičke varijacije (eng. *The Pharmacogenetic Variation Consortium*)

**pre-miRNK**- Prekursor mikro RNK

**pri-miRNK**- Primarni transkript gena za mikro RNK

**PRS**- Poligenski skor rizika, (eng. *Polygenic Risk Score*)

**RNR**- Ribonukleotid reduktaza

**RT-PCR**- Reverzna transkripcija

**SAM**- S-adenozil metionin

**SLC19A1**- Transporter iz superfamilije integralnih membranskih proteina (eng. *Solute carrier family 19 member 1*) sinonim RFC-1

**SLCO1B1**- Transporter iz porodice transportera organskih anjona, član 1B1 (eng. *Solute carrier organic anion transporter family member 1B1*)

**SR**- Standardni rizik

**TdGDP**- Tiodezoksiguanin nukleotid difosfat

**TdGMP**- Tiodezoksiguanozin monofosfat

**TdGTP**- Tiodezoksiguanin nukleotid trifosfat

**TGDP**- Tioguanin nukleotid difosfat

**TGMP**- Tioguanozin monofosfat

**TGN**- Tioguaninski nukleotidi

**TGTP**- Tioguanin nukleotid trifosfat

**THF**- Tetrahidrofolat

**TIMP**- 6-tioinozin-5'-monofosfat

**TITP**- 6-tioinozin trifosfat

**TPMT**- Tiopurin S-metiltransferaza

**TXMP**- Tioksantozin monofosfat

**TYMS**- Timidilat sintetaza

**VCR**- Vinkristin

**VIPN**- Vinkristinom indukovana periferna neuropatija

**VNTR**- Varijabilni broj tandemskih ponovaka (eng. *Variable number tandem repeats*)

---



---

## Sadržaj

<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
1.1. Farmakogenetika i farmako-omike u personalizovanoj medicini .....	2
1.2. Dečja akutna limfoblastna leukemija.....	5
1.2.1. Lečenje dečje ALL.....	5
1.3. Farmakogenetička istraživanja u dečjoj ALL.....	6
1.3.1 Farmakogenomika tiopurinskih lekova .....	7
1.3.2. Farmakogenetika metotreksata .....	11
1.3.3. Farmakogenetika vinkristina.....	13
1.4. Poligenski skor rizika kao prediktivni model.....	15
<b>2. Ciljevi.....</b>	<b>18</b>
<b>3. Materijal i metode .....</b>	<b>20</b>
3.1 Ispitanici.....	21
3.2 Metode za detekciju genetičkih varijanti .....	21
3.2.1 Izolacija DNK iz periferne krvi .....	21
3.2.2 Umnožavanje regiona DNK od značaja metodom PCR .....	22
3.2.3 Analiza produkata PCR reakcije na agaroznom gelu.....	25
3.2.4 Prečišćavanje produkata PCR reakcije.....	26
3.2.5 Sekvenciranje Sangerovom metodom .....	26
3.3. Metode za izučavanje genske ekspresije.....	28
3.3.1. Izolacija mononuklearnih ćelija .....	28
3.3.2. Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija .....	28
3.3.3. Reverzna transkripcija (RT-PCR).....	28
3.3.4. Merenje nivoa ekspresije gena <i>NUDT15</i> metodom <i>real-time</i> PCR.....	30
3.4. Statistička obrada podataka.....	31
3.5. Računanje poligenskog skora rizika .....	32
<b>4. Rezultati.....</b>	<b>33</b>
4.1. Retrospektivna klinička studija odgovora na terapiju tiopurinskim lekovima u srpskoj populaciji dece obolele od ALL .....	34
4.1.1. Demografske i osnovne kliničke karakteristike ispitanika .....	34
4.1.2. Detekcija i učestalost varijanti u kodirajućim i okolnim regionima gena <i>NUDT15</i> .....	35
4.1.3. Rezultati merenja nivoa ekspresije gena <i>NUDT15</i> .....	37
4.2. Retrospektivna klinička studija odgovora na terapiju metotreksatom u srpskoj populaciji dece obolele od ALL .....	42

---

---

4.2.1. Demografske i osnovne kliničke karakteristike ispitanika .....	42
4.2.2. Zastupljenost varijante rs4149056:T>C u genu <i>SLCO1B1</i> u ispitivanoj grupi, srpskoj i evropskoj populaciji.....	44
4.2.3. Asocijacija kinetike metotreksata u fazi konsolidacije sa varijantom rs4149056:T>C u genu <i>SLCO1B1</i> .....	45
4.2.4. Asocijacija razvoja toksičnosti usled primene metotreksata u fazi konsolidacije sa varijantom rs4149056:T>C u genu <i>SLCO1B1</i> .....	46
4.3. Retrospektivna klinička studija odgovora na terapiju vinkristinom u srpskoj populaciji dece obolele od ALL .....	47
4.3.1. Demografske i osnovne kliničke karakteristike ispitanika .....	47
4.3.2. Zastupljenost potencijalnih farmakogenetičkih varijanti u ispitivanoj grupi i evropskoj populaciji.....	50
4.3.3. Povezanost potencijalnih farmakogenetičkih markera sa razvojem VIPN .....	52
4.4. Poligenski skor rizika u predikciji pojave hepatotoksičnosti usled primene metotreksata u fazi konsolidacije .....	53
<b>5. Diskusija .....</b>	<b>54</b>
5.1. Farmakogenetičke varijante od značaja za terapiju tiopurinskim lekovima, metotreksatom i vinkristinom u dečjoj ALL.....	55
5.1.1. Farmakogenetički potencijal varijanti u genu <i>NUDT15</i> .....	57
5.1.2. Farmakogenetički potencijal varijante rs4149056 u genu <i>SLCO1B1</i> .....	57
5.1.3. Potencijalni farmakogenetički markeri nastanka vinkristinom indukovane periferne neuropatije .....	58
5.2. Nivo ekspresije gena <i>NUDT15</i> u trenutku postavljanja dijagnoze kao farmakotranskriptomski marker .....	61
5.3. Poligenski skor rizika u modelovanju predikcije hepatotoksičnosti usled primene visokih doza metotreksata u fazi konsolidacije.....	62
<b>6. Zaključci .....</b>	<b>64</b>
<b>Literatura .....</b>	<b>66</b>
<b>PRILOZI .....</b>	<b>78</b>

---

# **1. Uvod**

## 1.1. Farmakogenetika i farmako-omike u personalizovanoj medicini

Savremeni napori medicinske prakse sve više su usmereni na personalizovani, odnosno precizni pristup lečenju bolesnika. Ovakav pristup, zasnovan na dokazima (eng. *evidence based medicine*), podrazumeva prilagođavanje strategija terapije ili prevencije bolesti specifičnostima bolesnika, uzimajući u obzir genetičke karakteristike, sredinske i fiziološke faktore [1].

Farmakogenetika predstavlja jednu od osnovnih komponenti prersonalizovane medicine i rastuće je polje biomedicinskih istraživanja. Pojam farmakogenetika prvi put je upitrebio Frederik Vogel još 1959. godine sa ciljem da ukaže na koncept da su reakcije na lekove pod kontrolom gena, kao i na to da različite osobe mogu da reaguju značajno drugačije na primenu istog leka u zavisnosti od genetičkog materijala koji poseduju [2]. Danas se zna da genetičke varijacije, odnosno farmakovarijante, mogu dovesti do razlika u farmakokinetici leka na nivou apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije, kao i u farmakodinamici leka, utičući na proteine uključene u mehanizam njegovog dejstva (receptori, jonski kanali, transporteri, enzimi...) ili regulaciju imunskog odgovora [3]. Krajnji cilj farmakogenetike je individualizacija terapije za svakog bolesnika, odnosno primena adekvatnog leka, u adekvatnoj dozi u adekvatnom trenutku terapije [4].

Postoje dva glavna pristupa u farmakogenetičkim istraživanjima. Jedan pristup odnosi se na studije koje se bave ispitivanjem asocijacija varijanti u određenim genima kandidatima, koji su po pravilu uključeni u metabolički put određenog leka, sa nekim aspektom odgovora na terapiju tim lekom. Drugi pristup baziran je na proučavanju celog genoma, odnosno studijama genomskih asocijacija (eng. *Genome-Wide Association Studies, GWAS*) u cilju pronalaženja novih farmakogenetičkih markera. Oba pristupa imaju svoje prednosti i nedostatke. Studije na genima kandidatima imaju veliku statističku jačinu, ali im je nedostatak to što ne omogućuju otkrivanje novih relevantnih gena. Sa druge strane, studije genomskih asocijacija omogućuju otkrivanje novih farmakogenetičkih markera čak i ako njihova funkcija nije poznata od ranije. Međutim, njihov nedostak je mala statistička jačina [5].

Termini farmakogenetika i farmakogenomika se vrlo često koriste sa istim značenjem, premda većina autora termin farmakogenomika koristi da ukaže na farmakogenetičke principe na nivou celog genoma [6]. Eksplozivan razvoj molekularno bioloških tehnika doprineo je i razvoju novih „farmako-omika“ kao što su farmakotranskriptomika, farmakoproteomika i farmakometabolomika. Farmakotranskriptomika i farmakoproteomika proučavaju promene u ekspresiji gena i proteina u zavisnosti od primene leka, dok se farmakometabolomika bavi uticajem leka na nivoe metabolita u tkivima, ćelijama i telesnim tečnostima [7]. Dalji razvoj „farmako-omika“ doprineće preciznijoj identifikaciji biomarkera, razumevanju mehanizama u koje su uključeni i proceni njihove terapijske efikasnosti.

U poslednjih nekoliko decenija farmakogenetičkim istraživanjima identifikovana je povezanost između genetičkih faktora i bezbednosti i efikasnosti brojnih terapeutika. Rezultati ovih istraživanja sve više nalaze mesto u rutinskoj kliničkoj praksi. Institucije kao što su Konzorcijum za kliničku implementaciju farmakogenetike (eng. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium, CPIC*), Holandska farmakogenetička radna grupa (eng. *Dutch Pharmacogenetics Working Group, DPWG*) i Kanadska farmakogenomička mreža za bezbednost lekova (eng. *Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety, CPNDS*) bave se davanjem preporuka za parove gen-lek za koje postoji dovoljno dokaza koji podržavaju razmatranje genetičkih podataka prilikom donošenja odluke o izboru najbolje strategije lečenja [8–10]. Sve brži napredak farmakogenetike u 21. veku zahtevao je i efikasno skladištenje, organizovanje, i jednostavan pristup akumuliranom znanju, što je dovelo do uspostavljanja farmakogenetičkih baza podataka, među kojima su najznačajnije Farmakogenomička baza znanja (eng. *The Pharmacogenetics Knowledge*

*Base, PharmGKB*) i Konzorcijum za farmakogenetičke varijacije (eng. *The Pharmacogenetic Variation Consortium, PharmVar*) [11,12].

Primere uspešne primene farmakogenetičkih znanja moguće je naći u lečenju širokog dijapazona bolesti, koje uključuju, ali nisu ograničene na kardiovaskularne bolesti, onkološka oboljenja, psihijatrijske i infektivne bolesti. CPIC trenutno u svojoj bazi podataka nudi preporuke za 25 različitih polimorfnih gena, povezanih sa 93 različita leka (Tabela 1). Brojni drugi parovi lek-gen se nalaze u različitim fazama evaluacije, a postojeće preporuke se redovno dopunjuju novim saznanjima [13].

Tabela 1. Parovi gen-lek za koje CPIC propisuje preporuke za korišćenje u kliničkoj praksi

<b>Gen</b>	<b>Lek</b>
<i>HLA-B</i>	abakavir, alopurinol, karbamazepin, fosfenitoin, okskarbazepin, phenitoin
<i>MT-RNR1</i>	amikacin, gentamicin, kanamicin, paromomicin, plazomicin, streptomycin, tobramicin
<i>CYP2C19, CYP2D6</i>	amitriptilin, citalopram, klopidogrel, escitalopram, lansoprazol, omeprazol, pantoprazol, vorikonazol, klomipramin, dekslansoprazol, doksepin, imipramin, sertralin, trimipramin, esomeprazol, rabeprazol
<i>UGT1A1</i>	atazanavir
<i>SLCO1B1</i>	atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin, simvastatin
<i>NUDT15, TPMT</i>	azatioprin, merkaptopurin, tioguanin
<i>DPYD</i>	kapecitabin, fluorouracil, tegafur
<i>HLA-A</i>	karbamazepin, okskarbazepin
<i>CYP2C9</i>	celekoksib, flurbiprofen, fluvastatin, fosfenitoin, lornoksikam, ibuprofen, meloksikam, fenitoin, piroksikam, tenoksikam, varfarin, aceklofenak, aspirin, diklofenak, indometacin, lumirakoksib, nabumeton, naproksen
<i>CACNA1S, RYR1</i>	desfluran, enfluran, halotan, izofluran, methoksifluran, sevofluran, sukcinilholin
<i>CYP2B6</i>	efavirenz
<i>CFTR</i>	ivakaftor
<i>IFNL3, IFNL4</i>	peginterferon alfa-2a, peginterferon alfa-2b
<i>G6PD</i>	rasburikaza
<i>ABCG2</i>	rosuvastatin
<i>CYP3A5</i>	takrolimus
<i>CYP4F2</i>	varfarin
<i>VKORC1</i>	varfarin
<i>COMT, OPRM1</i>	alfentanil, buprenorfine, kodein, fentanil, hidrokodon, hidromorfon, levometadon, methadon, morfin, naltrekson, oksikodon, remifentanil, sufentanil, tramadol
<i>CYP2C8</i>	diklofenak, ibuprofen

## 1.2. Dečja akutna limfoblastna leukemija

Dečja akutna limfoblastna leukemija (ALL) je hematološki kancer koji se karakteriše klonskom ekspanzijom maligno izmenjenih limfoblasta. U odnosu na poreklo izmenjenih limfoblasta, ALL se dele na B-ćelijsku i T-ćelijsku liniju. Tokom progresije bolesti dolazi do nagomilavanja malignih blasta u koštanoj srži, usled čega dolazi do remećenja njene normalne funkcije. Kao posledica dolazi do razvoja anemija, neutropenija i trombocitopenija, pa su oboleli podložni infekcijama i krvarenjima. Sa daljim razvojem bolesti dolazi do nagomilavanja limfoblasta i u drugim organima, a najčešće u limfoidnim organima, jetri i centralnom nervnom sistemu, što dovodi do poremećaja u njihovom radu [14].

ALL je češća u dečjem uzrastu nego kod odraslih osoba. Predstavlja oko 30% svih kancera dečjeg uzrasta, što je čini najčešćim malignitetom kod dece [15]. Godišnje, oko 5000 dece u Evropi oboli od ove bolesti [16]. U Srbiji se ALL godišnje dijagnostikuje kod oko 60 dece [17]. Najčešće oboljevaju deca uzrasta između 2 i 5 godina. ALL se češće sreće kod dečaka, pogotovo u pubertetskom uzrastu, dok se u prvoj godini života ALL češće javlja kod devojčica [18]. Epidemiološke studije su pokazale da je najveća incidenca pojave ALL u zapadnim, ekonomski razvijenim zemljama, a najmanja u severnoafričkim populacijama i na Bliskom istoku [19].

Etiologija dečje ALL uglavnom nije dovoljno poznata, iako je preovladavajući stav da do nastanka ALL dolazi sadejstvom različitih genetičkih i sredinskih faktora. Pokazano je da se ALL češće javlja kod dece sa genetičkim bolestima kao što su Daunov sindrom [20], Fankonijeva anemija [21], Blumov sindrom [22], ataksija telangiektazija [23] i dr. Nastanak ALL se dovodio i u vezu sa izlaganjem jonizujućem zračenju [24] i infekcijama pojedinim virusima, kao što su Epštajn-Bar i HIV [25,26]. Takođe, sve je više dokaza da kod određenog broja obolelih, pre svega onih koji razviju simptome u prvoj godini života, do nastanka leukemijskih klonova dolazi još tokom intrauterinog razvoja [27].

Hromozomske aberacije su česta pojava u dečjoj ALL i imaju veliki značaj kao prognostički markeri i prilikom stratifikacije pacijenata. Najčešće numeričke aberacije hromozoma su hiperploidija (kariotip sa više od 50 hromozoma), čije prisustvo ukazuje na povoljan ishod terapije [28], dok hipodiploidija (kariotip sa manje od 45 hromozoma) ukazuje na lošu prognozu [29]. Od strukturnih hromozomskih aberacija najčešće se sreću translokacije. Translokacija t(12;21), koja daje fuzioni transkript *ETV6-RUNX1*, povezana je sa povoljnim ishodom terapije [29]. Translokacija t(1;19) čiji je fuzioni transkript *TCF3-PBX1* dovodi se u vezu sa srednjim rizikom od relapsa, dok su translokacija t(9;22) sa *BCR-ABL1* fuzionim transkriptom, kao i brojni *MLL* rearanžirani faktori prognoze lošeg ishoda terapije [29,30]. Osim hromozomskih aberacija, u dečjim ALL sreće se i veliki broj mutacija, pre svega u genima odgovornim za procese proliferacije, diferencijacije i programiranje ćelijske smrti [31].

### 1.2.1. Lečenje dečje ALL

Lečenje dečje ALL danas je veoma uspešno. Ishod lečenja poboljšan je pre svega razvojem dijagnostičkih metoda i modifikacijama postojećih protokola zasnovanim na stratifikaciji bolesnika u odnosu na rizik od relapsa [32]. Petogodišnje preživljavanje u zapadnim zemljama dostiže i 90%, ali je u delovima sveta koji nemaju pristup najmodernijim uslovima lečenja preživljavanje manje [33]. U Srbiji je petogodišnje preživljavanje obolelih od dečje ALL 73,1% [34].

Dečja ALL se u Srbiji leči prema internacionalnom, multimodalnom Berlin-Frankfurt-Munster (BFM) protokolu. Do 1. aprila 2010. godine u Srbiji je korišćena ALL IC-BFM 2002 verzija protokola, koja je nakon toga zamenjena ALL IC-BFM 2009 verzijom [35]. Osnova ove dve

verzije protokola se ne razlikuje u velikoj meri. Terapija BFM protokolom je precizno definisana za svaku grupu rizika. Stratifikacijom se oboleli dele u 3 grupe: bolesnike sa standardnim, srednjim i visokim rizikom od relapsa. Prognostički faktori koji se pri tome uzimaju u obzir su uzrast obolelih, broj leukocita pre početka terapije, broj blasta u perifernoj krvi 8. dana terapije, citogenetičke karakteristike blasta i udeo minimalne rezidualne bolesti (MRB) u koštanoj srži 15. i 33. dana terapije [15]. Terapija obolelih u svim grupama rizika podeljena je po fazama i njeno predviđeno trajanje je 104 nedelje (24 meseca) [36].

Indukcija remisije je prva faza lečenja. Tokom ove faze teži se brzom smanjenju broja limfoblasta u perifernoj krvi i koštanoj srži. Lekovi koji se primenjuju tokom faze indukcije su prednizon, vinkristin, daunorubicin i L-asparaginaza. U slučaju da je bolest zahvatila i CNS, primenjuje se i metotreksat, intratekalno. Na kraju faze indukcije svi bolesnici su stratifikovani na osnovu rizika i pristupa se daljem lečenju [36].

Indukciju remisije prati faza rane intenzifikacije. Tokom ove faze oboleli primaju lekove ciklofosamid, 6-merkaptopurin i citarabin. Slično kao i u fazi indukcije, ukoliko je bolest prisutna i u CNS-u terapija se proširuje i intratekalnom primenom metotreksata. Oboleli sa srednjim i visokim rizikom koji su lečeni verzijom protokola ALL IC-BFM 2009 su randomizovani u cilju unapređenja protokola. U obe grupe rizika, deo pacijenata je lečen standardnim režimom (standardna grana), dok je deo lečen pojačanim režimom (uvećana grana, eng. *augmented*) koji je pored navedenih lekova uključivao još i vinkristin i L-asparaginsku [36].

Sledeća faza u lečenju je faza konsolidacije, tokom koje oboleli primaju lekove 6-merkaptopurin i metotreksat, uz dodatnu intratekalnu primenu metotreksata kod bolesnika kod kojih je CNS i dalje zahvaćen bolešću. Tokom ove faze bolesnici sa srednjim rizikom lečeni prema ALL IC-BFM 2009 protokolu su randomizovani u dve grane: „mM granu“ koja je primala metotreksat u dozama kao i grupa standardnog rizika ( $2\text{g/m}^2/24\text{h}$ ) i „M granu“ koja je primala visoku dozu metotreksata ( $5\text{g/m}^2/24\text{h}$ ). Bolesnici sa visokim rizikom tokom faze konsolidacije primaju još i deksametazon, vinkristin, ciklofosamid, citarabin, L-asparaginsku, ifosfamid, daunorubicin i etopozid, raspoređene u 3 bloka. Budući da svi bolesnici u ovoj fazi dobijaju visoke doze metotreksata primenjuje se i leukovorin (aktivna forma folata), kako bi se sprečila pojava i smanjila ozbiljnost neželjenih efekata primene ovog leka [36].

Nakon konsolidacije sledi faza reindukcije. Ova faza je podeljena na dva dela. U prvom delu primenjuju se deksametazon, vinkristin, doksorubicin i L-asparaginaza. Ukoliko je opšte stanje obolelog dobro, ulazi se u drugi deo reindukcije tokom koga oboleli dobija ciklofosamid, 6-tioguanin i citarabin. U slučaju da je CNS i dalje zahvaćen bolešću, sprovodi se intratekalna primena metotreksata [36].

Terapija održavanja je poslednja faza BFM protokola. Tokom ove faze bolesnici dobijaju dnevne doze 6-merkaptopurina i nedeljne doze metotreksata. Ovi imunosupresivni lekovi se daju oralno. Kontrole krvne slike se sprovode u dvonedeljnim intervalima u cilju eventualne potrebe za prilagođavanjem doze lekova, kako bi se izbegli opasni neželjeni efekti ili pojava recidiva [36].

### 1.3. Farmakogenetička istraživanja u dečjoj ALL

Zajednička karakteristika svih hemoterapija je da su veoma toksične. Citostatici i drugi lekovi koji se koriste u lečenju maligniteta daju se u dozama koje su blizu doza koje dovode do toksičnosti, kako bi se postigla najveća stopa izlečenja. Dečja ALL je istovremeno i kancer sa najvećom stopom izlečenja i sa najvećim brojem smrtnih ishoda u pedijatrijskom uzrastu. Takođe, oko tri četvrtine obolelih doživi neki od neželjenih efekata tokom terapije, a smrtni ishod usled neželjenih efekata terapije se sreće kod 1-3% obolelih [32]. Ovolika učestalost neželjenih efekata



posledica je male specifičnosti lekova, uskog terapijskog indeksa i velikih kumulativnih doza [37]. Tegobe sa kojima se deca obolela od ALL suočavaju usled primene terapije najčešće su reakcije hipersenzitivnosti, gastrointestinalne toksičnosti, različite vrste neuroloških i nefroloških tegoba, kao i mijelosupresije koje mogu biti i životno ugrožavajuće [38].

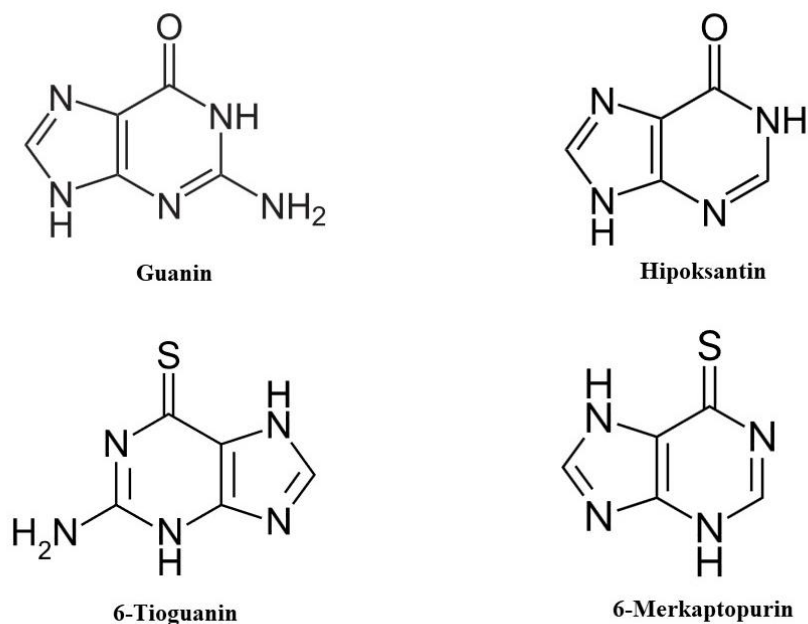
Odgovor na terapiju dečje ALL zavisi od mnogih faktora, kao što je stadijum bolesti u trenutku započinjanja terapije, interakcije među lekovima koji se koriste, uzrast, pol, sredinski, fiziološki i genetički faktori. U poslednjih nekoliko decenija sve više pažnje se poklanja ulozi genetičkih faktora, odnosno farmakogenetičkim istraživanjima. U tom pogledu treba razlikovati genetičke faktore sadržane u genomu zdravih ćelija obolelog i genetičke faktore poreklom od maligno transformisanih ćelija, koje ulaze u sastav genoma tumora. Genetički faktori zdravih ćelija odnose se na interindividualne razlike u farmakokinetici i farmakodinamici primenjenog leka, dok je varijabilnost u tumorskom genomu odgovorna za pojavu rezistencije na hemoterapiju [39]. Farmakogenetičkim istraživanjima moguće je identifikovati biomarkere na osnovu kojih bi bilo moguće predvideti pojavu toksičnosti ili smanjenje efikasnosti nekog leka i pristupiti individualizaciji terapije i pre njenog početka.

Dečja ALL je odličan model za farmakogenetička istraživanja iz nekoliko razloga. Različiti protokoli lečenja dečje ALL su u velikoj meri slični i standardizovani, primenjuju se sa velikom efikasnošću duže vreme i u različitim populacijama. Većina lekova koji se koriste u lečenju ima uzak terapijski indeks i ozbiljne neželjene efekte. Lekovi od ključne važnosti u terapiji dečje ALL, tiopurinski lekovi, metotreksat i glukokortikoidni lekovi, koriste se i u lečenju drugih bolesti, zbog čega rezultati dobijeni istraživanjima u dečjoj ALL potencijalno mogu biti primenljivi i u lečenju tih bolesti [40].

Lekovi koji se koriste u lečenju dečje ALL prema BFM protokolu, a koji su predmet istraživanja ovog rada, su tiopurinski lekovi, metotreksat i vinkristin.

### 1.3.1 Farmakogenomika tiopurinskih lekova

Tiopurinski lekovi 6-merkaptopurin (6-MP), azatioprin i 6-tioguanin (6-TG) su među antitumorskim lekovima koji su najduže u medicinskoj upotrebi [41]. Iako sva tri leka imaju slične efekte, u kliničkoj praksi se uglavnom koriste za različite namene: 6-TG se najčešće koristi u lečenju mijeloidnih leukemija, 6-MP se predominantno koristi u lečenju limfoidnih maligniteta, dok se azatioprin uglavnom koristi za ostvarivanje imunosupresivnog efekta prilikom transplantacija organa ili u lečenju inflamatornih i autoimunskih bolesti, kao što su inflamatorna bolest creva (eng. *Inflammatory Bowel Disease*) i reumatoidni artritis [42]. Tiopurinski lekovi su analozi purina (Slika 1.1) koji u ćeliji bivaju metabolički transformisani u tioguaninske nukleotide (TGN) i kao takvi se ugrađuju u nukleinske kiseline. Ovo je njihov glavni mehanizam dejstva i on dovodi do indukcije programirane ćelijske smrti [43].

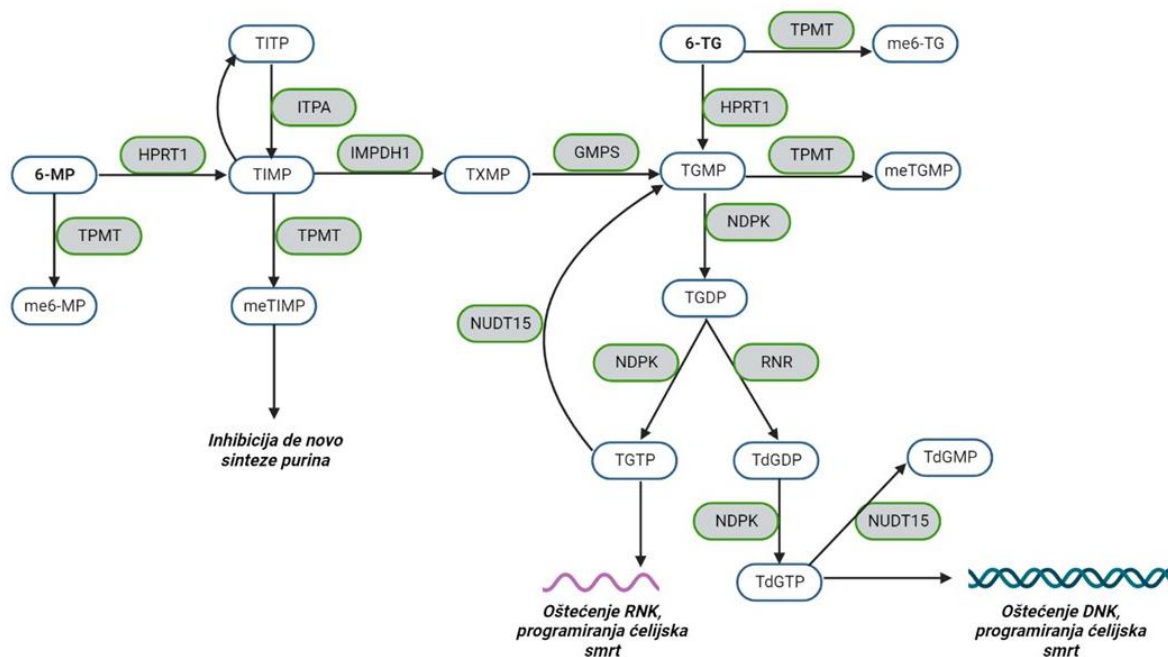


Slika 1.1. Strukturne formule tiopurinskih lekova i njihovih ćelijskih purinskih analoga. Preuzeto i modifikovano sa [wikipedia.org](http://wikipedia.org)

U terapiji dečje ALL najviše se koristi 6-MP, i to uglavnom u terapiji održavanja, dok se 6-TG prema BFM protokolu primenjuje samo u fazi reindukcije. 6-TG prolazi kroz manje koraka metaboličke transformacije u ćeliji, zbog čega dovodi do veće toksičnosti u odnosu na 6-MP, pri čemu ne ostvaruje bolje efekte u lečenju. Za razliku od 6-MP, 6-TG takođe dovodi i do pojave venookluzivne bolesti [44]. Zbog toga je 6-MP lek izbora za dugotrajna lečenja tiopurinima, kao što je slučaj sa terapijom održavanja [45].

6-MP i 6-TG su prolekovni koji sami po sebi nemaju citotoksičan efekat i da bi ostvarili svoje terapeutsko dejstvo moraju biti metabolisani. Po ulasku u ćeliju, 6-MP delovanjem hipoksantin fosforibozil transferaze (HGPRT1) prelazi u 6-tioinozin-5'-monofosfat (TIMP), koji pod dejstvom inozin monofosfat dehidrogenaze (IMPDH1) postaje tioksantozin monofosfat (TXMP). Od ovog jedinjenja pod dejstvom guanozin monofosfat sintetaze (GMPS) nastaje tioguanozin monofosfat (TGMP). Za razliku od 6-MP, 6-TG pod dejstvom HGPRT1 direktno prelazi u TGMP. Od TGMP, u nizu reakcija koje uključuju aktivnost ćelijskih ribonukleotid reduktaza (RNR) i kinaza (NDPK), nastaju aktivni metaboliti, tioguanin nukleotid trifosfat (TGTP), koji potom može biti ugrađen u RNK i TdGTP, koji može biti ugrađen u DNK [46]. Ugradnja tioguaninskih nukleotida u nukleinske kiseline dovodi do inhibicije nekoliko enzima uključenih u mehanizme reparacije i replikacije DNK [47]. Ugradnja ovih nukleotida dovodi i do direktnih oštećenja DNK molekula, u vidu jednolančanih prekida i formiranja kovalentnih veza između DNK i proteina (eng. *DNA-protein crosslinks*, *DPCs*) [48,49]. Na ovaj način, 6-MP i 6-TG ostvaruju svoje glavno citotoksično dejstvo i dovode do programirane ćelijske smrti [43].

Delovanjem TPMT na 6-MP i 6-TG nastaju metilmerkaptopurinski produkti (MMP). Budući da ova jedinjenja ne podležu dejstvu HGPRT1, ne ulaze u procese sinteze nukleotida, nemaju antileukemijsko dejstvo i proces njihovog nastanka je u kompeticiji sa anaboličkim putem tipurina [50]. Međutim, TPMT može da metiluje intermedijere u anaboličkom putu tiopurina, pre svega TIMP, dajući sekundarno metilovane nukleotide (meTIMP) koji mogu da imaju citotoksični efekat kroz inhibiciju *de novo* sinteze purina [51] (Slika 1.2).



Slika 1.2. Metabolički put 6-merkaptopurina (6-MP) i 6-tioguanina (6-TG). TIMP- 6-tioinozin-5'-monofosfat; TITP- 6-tioinozin trifosfat; TXMP- tioksantozin monofosfat; TGMP- tioguanozin monofosfat; TGDP- tioguanin nukleotid difosfat; TGTP- tioguanin nukleotid trifosfat; TdGMP- tiodezoksiguanozin monofosfat; TdGDP- tiodezoksiguanin nukleotid difosfat; TdGTP - tiodezoksiguanin nukleotid trifosfat; me6-MP- metil 6-merkaptopurin; meTIMP- metil 6-tioinozin-5'-monofosfat; me6-TG- metil 6-tioguanin; meTGMP- metil tioguanozin monofosfat; HPRT1- hipoksantin fosforibozil transferaza; ITPA- inozin trifosfataza; IMPDH1- inozin monofosfat dehidrogenaza; GMPS- guanozin monofosfatf sintetaza; NDPK- nukleotid difosfat kinaza; RNR- ribonukleotid reduktaza; TPMT- tiopurin S-metiltransferaza; NUDT15- nudiks hidroksilaza 15

Predmet proučavanja ovog istraživanja su genetičke varijacije u genu nudiks hidroksilaza 15 (eng. *nudix hydrolase 15*, *NUDT15*), koje mogu biti od velikog značaja za individualizaciju terapije tiopurinskim lekovima u fazi održavanja terapije dečje ALL.

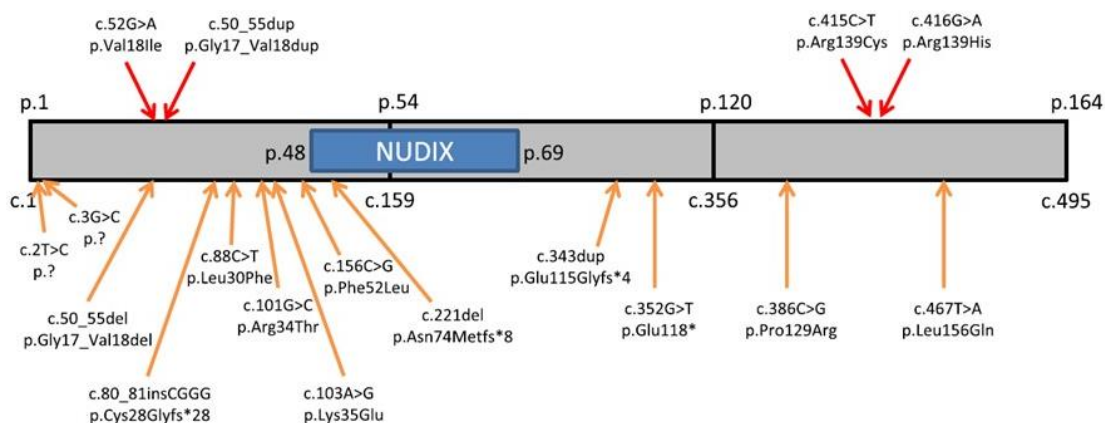
## Gen *NUDT15*

Gen *NUDT15*, ranije poznat i kao *MTH2*, sadrži 15.8 kb. Lociran je na dugom kraku 13. hromozoma (13q14.2) i sastoji se od 3 egzona. Proteinski produkt ovog gena sastavljen je od 164 aminokiseline i formira homodimer koji je eksprimiran u velikom broju tkiva [52].

*NUDT15* je citoplazmatični enzim, član superfamilije nudiks hidroksilaza koje katalizuju hidrolizu nukleozid difosfata. Među supstrate ovih enzima ubrajaju se i produkti oksidativnih oštećenja (npr. 8-okso-dGTP) koji mogu dovesti do pogrešnog sparivanja baza tokom replikacije DNK i nastanka transferzionih mutacija. Kao i ostali članovi ove superfamilije, *NUDT15* sadrži visoko konzerviran proteinski motiv, nudiks blok (eng. *nudix box*), koji je sastavljen od 23 aminokiseline i odgovoran za enzimsku aktivnost ovog proteina [53].

NUDT15 je direktno uključen u metabolički put tiopurina, tako što prevodi aktivne tiopurinske metabolite, TGTP i TdGTP, u manje toksične forme, TGMP i TdGMP (Slika 1.2). Na ovaj način sprečava se ugradnja toksičnih metabolita u RNK i DNK molekule, zbog čega je *NUDT15* važan regulator nivoa tiopurinskih metabolita u ćeliji, a time i efekata terapije tiopurinskim lekovima [54].

Velika GWA studija je 2014. godine pokazala da je varijanta c.415C>T (p.Arg139Cys) u genu *NUDT15* povezana sa ranom pojavom leukopenije usled primene tiopurinskih lekova kod obolelih od IBC [55]. Ubrzo je utvrđena i korelacija između ove varijante i pojave teške leukopenije izazvane primenom tiopurinskih lekova kod dece obolele od ALL u Japanu [56]. U nezavisnoj GWA studiji pokazano je da deca obolela od ALL koja su homozigotni nosioci za varijantu c.415C>T (TT) mogu da tolerišu samo 8.3% standardne doze 6-merkaptopurina tokom terapije održavanja [57]. U kliničkoj studiji koja je obuhvatala tri kohorte sa ukupno 270 dece obolele od ALL iz Singapura, Gvatemale i Japana osim varijante c.415C>T identifikovane su još tri kodirajuće varijante u ovom genu: c.416G>A (p.Arg139His), c.52G>A (p.Val18Ile) i c.36\_37insGGAGTC (p.Gly17\_Val18dup). Efekat ovih varijanti je bio gubitak funkcije enzima između 74.4% i 100%, a diplotipovi koji su sadržali varijante sa gubitkom funkcije asociirani su sa netolerancijom na tiopurinske lekove u sve tri kohorte [58]. Prema podacima dostupnim u *PharmVar* bazi podataka, trenutno je identifikovano 20 alela gena *NUDT15*, od kojih 3 alela (*NUDT15*\*2, *NUDT15*\*3 i *NUDT15*\*9) prema kliničkim kriterijumima CPIC konzorcijuma imaju posebnu važnost [59]. Budući da ovi aleli daju nefunkcionalne proteinske produkte, za nosioce ovih varijantnih alela CPIC propisuje preporuke o doziranju i načinu primene tiopurinskih lekova [60].

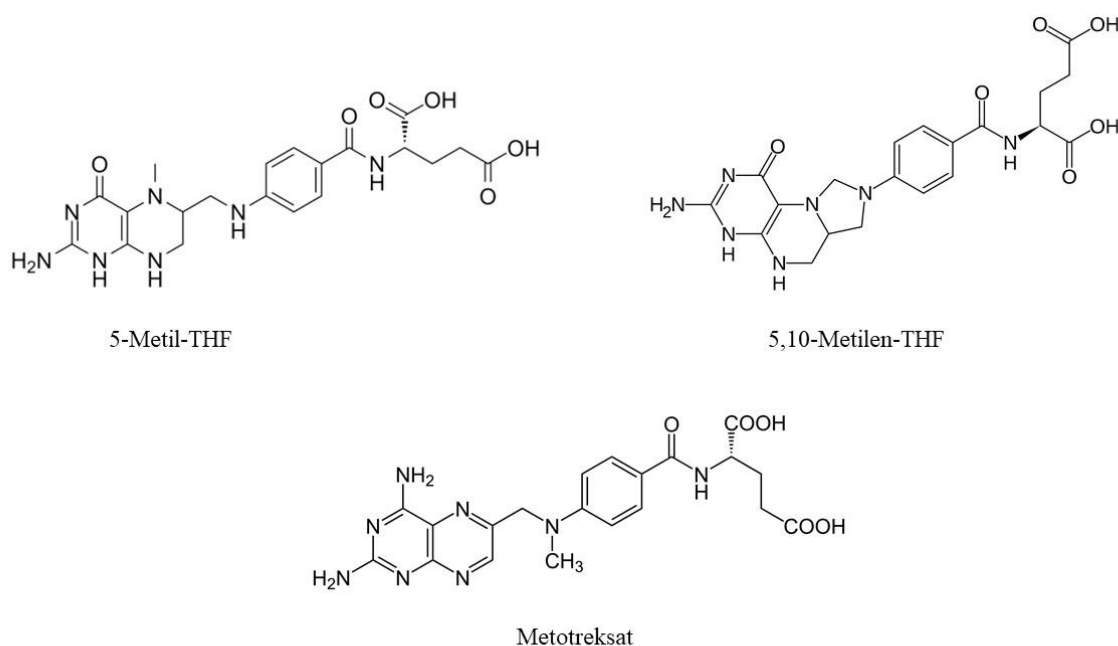


Slika 1.3. Šematski prikaz kodirajućeg dela gena *NUDT15*, sa najvažnijim varijantama. Egzoni su predstavljeni sivim blokovima. Strelice označavaju cDNK i aminokiselinske pozicije prikazanih varijanti. Oznaka "p.?" ukazuje na to da uticaj varijante na proteinskom nivou nije poznat. Plavi blok predstavlja nudiks domen. Crvene strelice predstavljaju varijante sa učestalošću ređeg alela (eng. *minor allele frequency*) koja je u bilo kojoj populaciji >1%, dok sive strelice predstavljaju varijante sa učestalošću ređeg alela koja je u bilo kojoj populaciji <1%. Preuzeto iz [54]

Varijantni aleli gena *NUDT15* uglavnom su zastupljeni u azijskim, hispanoameričkim i starosedelačkim američkim populacijama [57]. Dodatne studije pokazale su da u belim populacijama, u kojima je varijanta c.415C>T retka, druge varijante u genu *NUDT15* mogu da doprinesu nastanku leukopenija kod pacijenata koji primaju terapiju tiopurinima i do 13% slučajeva [61].

### 1.3.2. Farmakogenetika metotreksata

Metotreksat (MTX) (slika 1.4), isprva poznat pod imenom ametopterin, jedan je od lekova koji se najduže koriste u lečenju dečje ALL. Naime, još je četrdesetih godina dvadesetog veka pokazano da sintetski analozi folne kiseline mogu uspešno da dovedu do remisije dečje ALL [62]. Osim u lečenju dečje ALL, metotreksat se danas uspešno koristi i u lečenju drugih maligniteta, ali i autoimunskih (npr. reumatoidni artritis) i inflamatornih bolesti (npr. IBC) [63].



Slika 1.1.4. Hemijske strukture redukovanih folata (5-metil-THF i 5,10-metilen-THF) i metotreksata. THF – tetrahidrofolat. Preuzeto i modifikovano sa [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)

Mehanizam koji se nalazi u osnovi dejstva metotreksata zasnovan je na osobini analoga folne kiseline da deluju kao antagonisti, odnosno kompetitivni inhibitori folata. Usled toga dolazi do zaustavljanja sinteze nukleinskih kiselina i programirane smrti ćelije.

Metabolički put folata i način na koji metotreksat deluje na njega je dobro opisan. Folati su metaboliti nastali od vitamina B9, koji ćelije čoveka ne mogu da sintetišu, već mora biti unet putem hrane. I prirodni folati i metotreksat ulaze u ćeliju aktivnim transportom, preko odgovarajućih transportera. Metotreksat se nakon unosa u ćeliju poliglutaminuje, nakon čega efikasnije kompetitivno inhibira enzime uključene u metabolizam folata, i to dihidrofolat reduktazu (DHFR) i timidilat sintetazu (TYMS) [62]. DHFR obnavlja rezerve redukovanog folata prevodeći folnu kiselinu i dihidrofolat u tetrahidrofolat (THF). Postoji nekoliko bioaktivnih formi redukovanih folata, među kojima su 5,10-metilen-THF i 5-metil-THF. 5,10-metilen-THF enzim TYMS koristi u sintezi timidilata, dok se 5-metil-THF troši za sintezu metionina [64]. Metionin je prekursor S-adenozil metionina (SAM) koji je važan za reakcije metilacije u ćeliji, što uključuje i metilaciju DNK [65]. Nedostatak THF usled terapije metotreksatom dovodi do prekida brojnih procesa sinteze i metilacije DNK, što na kraju dovodi do programirane ćelijske smrti, odnosno ciljanog terapijskog efekta ovog leka [66].

Farmakokinetika metotreksata i drugih folata je od ključne važnosti prilikom doziranja, kako bi se sprečili neželjeni efekti [67]. Membranski transporteri su važni faktori distribucije i klirensa metotreksata. Transporter iz superfamilije integralnih membranskih proteina, SLC19A1 (eng. *solute carrier family 19 member 1, SLC19A1*), poznat i pod imenom nosač redukovanih folata (eng. *reduced folate carrier 1, RFC-1*) je važan za ulazak metotreksata u veliki broj tipova ćelija, dok je SLCO1B1 važan za unos metotreksata u ćelije jetre, odakle se eliminiše putem žuči [68]. Efluks metotreksata iz ćelije posredovan je transporterima iz porodice ATP-vezujućih kaseti [64].

Budući da je dugo u upotrebi u lečenju dečje ALL, metotreksat je bio predmet brojnih farmakogenetičkih istraživanja. Ipak, do danas nije identifikovan nijedan farmakogenetički marker koji bi bio uveden u kliničku praksu u cilju prediktivnog testiranja. U Srbiji je ova tematika bila predmet izrade doktorske teze dr Nikole Kotura [69] i dr Jelene Lazić [70].

Genetičke varijacije sa potencijalom za individualizaciju terapije metotreksatom koje su izučavane u ovoj studiji nalaze se u genima *SLCO1B1* (eng. *solute carrier organic anion transporter family member 1B1, SLCO1B1*) i *MTHFR* (eng. *methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR*).

### Gen *SLCO1B1*

Gen *SLCO1B1* kodira protein iz porodice transportera organskih anjona, član 1B1. Nalazi se na kratkom kraku hromozoma 12 (lokus 12p12.1) i sadrži 109 kb [71]. Ovaj gen se sastoji iz 15 egzona, ali se početni kodon (ATG) nalazi u drugom egzonu, zbog čega se egzon 1 ne prevodi u protein i predstavlja deo 5' netranslirajućeg regiona (eng. *5' untranslated region, 5'UTR*). Proteinski produkt ovog gena sastavljen je od 691 aminokiseline i eksprimiran je u hepatocitima, na bazolateralnoj strani ćelijske membrane [72].

Pokazano je da varijacije u ovom genu mogu da utiču na transport različitih endogenih metabolita i lekova, usled čega dolazi do promena u njihovim farmakokinetičkim profilima. Značaj različitih varijanti ovog gena posebno je važan za preuzimanje statina od strane jetre i rizik od razvoja miopatija [73]. Identifikovano je preko 190 varijanti u genu *SLCO1B1* čije su učestalosti u različitim populacijama preko 5%. Za varijantu rs4149056 (c.521T>C) pokazano je da je od funkcionalnog značaja i da dovodi do smanjenja transporta nekoliko klasa lekova putem ovog transportera [74]. Važnost ove varijante, kao i drugih varijanti u genu *SLCO1B1*, u eliminaciji metotreksata i razvoju toksičnosti, kao što su hepatotoksičnost, gastrointestinalna toksičnost i razvoj oralnog mukozitisa, i dalje je predmet farmakogenetičkih ispitivanja.

### Gen *MTHFR*

Gen *MTHFR* lociran je na kratkom kraku hromozoma 1 (lokus 1p36.22), sadrži 20.7 kb i sastoji se od 13 egzona. Proteinski produkt ovog gena sastoji se od 656 aminokiselina, ukupne molekulske mase 74.6 kD [75]. Eksprimiran je u značajnoj meri u velikom broju tkiva.

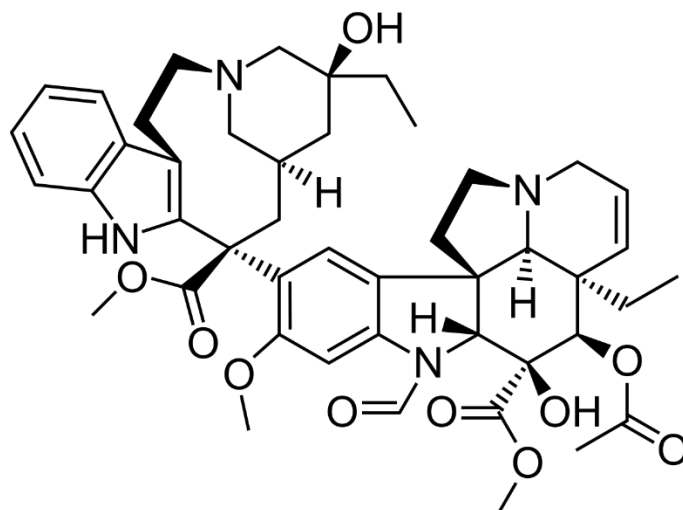
Glavna ćelijska funkcija *MTHFR* je prevođenje 5,10-metilen-THF u 5-metil-THF, koji je neophodan za sintezu metionina. Kao što je već opisano, jedan od mogućih metabolita metionina je i SAM, koji kao donor metil grupe igra važnu ulogu u metilaciji DNK.

Najbolje izučena varijanta ovog gena u kontekstu razvoja više bolesti, ali i farmakogenetičkog potencijala, je varijanta c.677 C>T [73]. Ova nesinonimna nukleotidna zamena dovodi do ugradnje alanina umesto valina na 222. poziciji što dovodi do smanjene aktivnosti ovog

enzima za oko 65% [76]. U kontekstu dečje ALL, pokazano je da nosioci varijantnog alela ređe oboljevaju od ove bolesti [77]. S druge strane, prisustvo ove varijante kod dece obolele od ALL dovedeno je u vezu sa većim rizikom od relapsa [78]. Ova varijanta bila je predmet istraživanja više farmakogenetičkih studija koje su se bavile efikasnošću i razvojem toksičnosti usled primene metotreksata u lečenju dečje ALL [79]. Dosadašnji rezultati ne upućuju na mogućnost upotrebe ove genetičke varijacije kao farmakogenetičkog markera [80].

### 1.3.3. Farmakogenetika vinkristina

Vinkristin (VCR) je jedan od glavnih lekova koji je u upotrebi u modernim protokolima za lečenje dečje ALL. Ovaj lek je prirodni alkaloid koji se komercijalno dobija ekstrakcijom iz listova *Catharanthus roseus* (Slika 1.1.5). Koristi se kao antineoplastični agens u lečenju malignih bolesti solidnih organa, kao i u lečenju hematoloških maligniteta, uglavnom u kombinaciji sa drugim citostaticima [81].



Slika 1.1.5. Strukturna hemijska formula vinkristina. Preuzeto sa [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)

Vinkristin se primenjuje intravenski, nakon čega brzo dospeva do većine tkiva, sa izuzetkom centralnog nervnog sistema. Metabolizam vinkristina odvija se najvećim delom u jetri, enzimima iz sistema citrohroma p450 CYP3A i to uglavnom CYP3A4 i CYP3A5. Poluživot vinkristina iznosi 85h, a najveći deo ovog leka eliminiše se putem žuči. Budući da retko dovodi do mijelosupresije, vinkristin se često koristi u multimodalnim terapijama kod bolesnika sa leukopenijama i trombocitopenijama [82].

Terapeutski efekat vinkristina zasnovan je na njegovom visokom afinitetu vezivanja za  $\beta$ -subjedinicu tubulinskih heterodimera, što sprečava polimerizaciju mikrotubula. Usled toga, ćelije kancera bivaju zaustavljene u metafazi i dolazi do indukcije programirane ćelijske smrti [83]. Međutim, usled velikog afiniteta za  $\beta$ -subjedinicu tubulina vinkristin se neselektivno i u velikoj meri vezuje i za mikrotubule u nervnim vlaknima. Rezultujuća inhibicija polimerizacije mikrotubula dovodi do degradacije aksona, prekidanja aksonalnog transporta i razvoja progresivnih aksonopatija. Zbog veće dužine nervnih vlakana, aksonopatije daleko češće pogađaju periferne nerve. Prema tipu neurona koje pogađaju, aksonopatije mogu biti klasifikovane kao senzorne, motorne ili autonomne, ali se sve aksonopatije do kojih dolazi usled terapije vinkristinom

označavaju kao vinkristinom indukovane periferne neuropatije (VIPN) [84]. VIPN su najvažniji neželjeni efekat primene vinkristina i manifestuju se uglavnom kao slabost mišića, arefleksija, neuropatski bol i gubitak čula, ali su česte i autonomne polineuropatije kao što je ortostatska hipotenzija i konstipacija [85]. Osim negativnog uticaja na kvalitet života obolelih, VIPN često dovodi do prekida terapije, smanjenja doza, a u teškim slučajevima i potpunog zaustavljanja lečenja što obolele stavlja u životnu opasnost [86]. Pojava VIPN kod dece dovodi se u vezu sa više faktora, kao što su uzrast, broj i intenzitet primljenih doza, koadministracija i interakcije sa drugim lekovima, način primene leka, farmakokinetički profil pacijenta ili prethodno postojeće neuropatije i retke genetičke bolesti, kao što je Šarko-Mari-Tutova bolest (eng. *Charcot-Marie-Tooth*) [85,87].

U poslednje vreme istraživački naponi usmereni su na potragu za genetičkom osnovom VIPN, što bi omogućilo razvoj preventivnog testiranja i personalizovanog pristupa terapiji ovim lekom. Nekoliko studija na genima kandidatima i studija izučavanja genomskih asocijacija ukazalo je na moguću vezu varijanti u genima uključenim u farmakokinetiku i farmakodinamiku vinkristina sa nastankom i razvojem VIPN. Predmet ovog istraživanja bilo je ispitivanje varijanti u 5 gena čiji su produkti uključeni u različite aspekte metabolizma i dejstva vinkristina i evaluacija njihovog doprinosa u razvoju VIPN.

### **Gen *CYP3A5* (eng. *Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 5*)**

Gen *CYP3A5* je član *CYP3A* subfamlije. Nalazi se na dugom kraku hromozoma 7 (lokus 7q22.1), sadrži 31.8 kb i sastavljen je od 14 egzona [88]. Proteinski produkt ovog gena je sastavljen od 502 aminokiseline, molekulske mase 57.1 kDa, čije je glavno mesto ekspresije jetra. Ovaj enzim je važan za metabolizam više lekova i endogenih supstanci i najvažniji je enzim u metabolizmu vinkristina. Iz tog razloga je bio jedan od prvih gena čije su varijante razmatrane u vezi sa nastankom VIPN. Najčešći alel ovog gena, *CYP3A5\*3*, karakteriše se varijantom rs776746 u trećem intronu gena, koja dovodi do uvođenja stop kodona i sinteze nefunkcionalnog enzima [89].

### **Gen *CEP72* (eng. *Centrosomal protein 72*)**

Gen *CEP72* nalazi se na kratkom kraku hromozoma 5 (lokus 5p15.33), sadrži 64.2 kb i ima 19 egzona. Proteinski produkt ovog gena je sastavljen od 647 aminokiselina, molekulske mase 71.7 kDa [90]. Funkcija ovog proteina važna je za formiranje mikrotubula i stabilnost centrozoma. Nedavno je u GWA studiji pronađena veza između varijante rs924607 u promotorskom regionu ovog gena i većeg rizika za razvoj VIPN [91]. Ova varijanta dovodi do formiranja vezujućeg mesta za transkripcioni represor NKX-6.3, što rezultuje nižom ekspresijom informacione RNK gena *CEP72* [91]. Međutim, replikativne studije koje su usledile pokazale su različite rezultate [92,93].

### **Gen *ACTG1* (eng. *Actin gama 1*)**

Gen *ACTG1* nalazi se na dugom kraku hromozoma 17 (lokus 17q25.3), sadrži 14.4 kb i čini ga 7 egzona. Proteinski produkt ovog gena sastoji se od 375 aminokiselina, molekulske mase 41.7 kDa [94]. Ova izoforma aktina ekspimirana je u gotovo svim tipovima ćelija i važna je za obrazovanje citoskeleta. Funkcionalni i posredni dokazi ukazuju na to da faktori koji dovode do promena u interakciji gama aktina i mikrotubula mogu biti važni u signalnoj transdukciji preko aktinskog citoskeleta [95]. Pokazano je da varijanta rs1135989 može biti povezana sa većim rizikom od nastanka težih oblika VIPN, ali i sa tolerancijom na manje doze vinkristina [96].



## Geni za mikro RNK: *MIR3117* i *MIR4481*

Mikro RNK (miRNK) su male, nekodirajuće RNK koje imaju funkciju u posttranskripcionoj regulaciji ekspresije velikog broja humanih gena. Geni za miRNK često se nalaze u okviru lokusa gena koji kodiraju proteine, kako u intronima, tako i u egzonima [97]. Gene za miRNK uglavnom transkribuje RNK polimeraza II. Primarni transkript, odnosno pri-miRNK sadrži i 5'-kapu i 3'-poli(A) rep. Dejstvom droša Rnaze III i RNK-vezujućeg proteina DGCR8 na pri-miRNK nastaje prekursor miRNK (pre-miRNK) [98] koja napušta jedro. U citoplazmi od pre-miRNK pod dejstvom dajser kompleksa nastaje kratka, asimetrična, dvolančana miRNK, dužine 20-25 nukleotida [99]. Ovako dobijena miRNK stupa u kompleks sa AGO proteinima (eng. *RNA-induced silencing complex*, *RISC*), pri čemu u kompleksu opstaje samo jedan lanac miRNK, dok drugi biva degradovan. RISC kompleks zatim prepoznaje ciljane informacione RNK po principu komplementarnosti između miRNK koju sadrži (region semena) i konzervisanih regiona koji se uglavnom nalaze u 3'-krajevima informacione RNK. Ukoliko su te dve sekvence potpuno komplementarne, dolazi do degradacije ciljane informacione RNK [100], dok u slučaju nepotpune komplementarnosti dolazi do represije translacije [101].

Pokazano je da tačkaste varijante (eng. *single nucleotide variants*, *SNV*) u okviru gena za miRNK mogu uticati na nivo njihove ekspresije, način obrade pri-mikroRNK i pre-mikroRNK, kao i prepoznavanje između miRNK i informacione RNK [102]. Između ostalog, ovakve genetičke varijacije mogu dovesti i do razlika u odgovoru na terapiju određenim lekom [103].

U ovoj studiji ispitivane su varijante u dva gena za mikro RNK. Gen *MIR3117* mapiran je na kratkom kraku hromozoma 1 (lokus 1p31.3) i sadrži 78 bp [104]. Gen *MIR4481* nalazi se na kratkom kraku hromozoma 10 (lokus 10p13) i sadrži 60 bp [105]. Nedavno sprovedena studija identifikovala je dve varijante u ovim genima kao potencijalno značajne markere razvoja VIPN kod dece obolele od ALL u Španiji.

Varijanta rs12402181, koja se nalazi u regionu semena zrele miR-3117-3p, potencijalno smanjuje rizik od VIPN. Naime, nukleotidna zamena G>A mogla bi da utiče na tačnost prepoznavanja targeta ove mikro RNK, među kojima se nalaze i informacione RNK za ABCC1 i RALBP1 transportere, za koje je poznato da učestvuju u efluksu vinkristina [106,107]. Nemogućnost tačnog prepoznavanja ovih informacionih RNK dovela bi do smanjene degradacije i povećane sinteze ovih proteina, što bi rezultovalo većom eliminacijom vinkristina i smanjenim rizikom od nastanka VIPN koji je zabeležen u ovoj studiji [108].

Varijanta rs7896283 nalazi se u nezreloj, pre-miRNK gena *MIR4481*. Dovodi do stabilizacije strukture ukosnice, što potencijalno može da dovede do pojačanog efekta zrele mikro RNK i smanjene ekspresije gena koji su njeni targeti [109]. Zrela mikro RNK potencijalno ima ulogu u regeneraciji perifernih nerava, te bi pojačan efekat miR-4481 sa varijantnim alelom doveo do smanjene ekspresije proteina važnih za regeneraciju perifernih nerava i povećanog rizika od nastanka VIPN, koji je primećen u ovoj studiji [108].

### 1.4. Poligenski skor rizika kao prediktivni model

Genetička osnova nastanka bolesti kod čoveka je u najvećem broju slučajeva kompleksna, odnosno u nastanak bolesti uključeno je više od jednog gena. Takođe, i druge klinički značajne fenotipske osobine koje uključuju genetičku komponentu, kao što je razvoj rezistencije na antitumorske terapije ili pojava neželjenih efekata usled terapije određenim lekom su najčešće vrlo kompleksne i zavise od prisustva varijanti u jednom ili više različitih gena. Najčešće su doprinosi pojedinačnih varijanti nastanku posmatranog fenotipa mali. Kumulativni rizik koji se dobija kada se uzmu u obzir doprinosi brojnih genetičkih varijanti asociranih sa nastankom posmatranog kompleksnog, klinički značajnog fenotipa naziva se poligenski skor rizika (eng. *Polygenic Risk*

Score, PRS) [110]. U svom osnovnom i najjednostavnijem obliku, PRS predstavlja zbir efekata posmatranih genetičkih varijanti, zasnovan na procenjenoj efektivnoj veličini genetičkih varijanti koje se uzimaju u obzir. PRS su zasnovani na statističkim modelima koji koriste podatke dobijene u GWA studijama i metastudijama [111].

Iako postoje napori da se studije koje koriste PRS modele standardizuju [112], trenutno ne postoje propisani standardi za konstruisanje PRS modela, što kao posledicu može imati postojanje različitih pristupa u predikciji rizika nastanka istog fenotipa [113]. Modeli koji se koriste za konstruisanje PRS mogu varirati u 3 važna aspekta: prema broju razmatranih genetičkih varijanti; prema tipu primenjenog statističkog modela koji se koristi za kombinovanje rizika povezanih sa pojedinačnim varijacijama; prema mogućnosti generalizacije dobijenog skora na celu populaciju. Tako, broj genetičkih varijanti koje doprinose PRS može varirati od nekoliko do nekoliko hiljada, a statistički modeli koji se koriste trebalo bi da na pravi način oslikavaju fenotip koji opisuju. Na primer, u razmatranju PRS za nastanak Alchajmerove bolesti neophodno je uzeti u obzir da rizik od oboljevanja od ove bolesti ne ostaje konstantan, već raste sa godinama [114]. S druge strane, većina GWA studija i metastudija iz kojih se dobijaju podaci za konstruisanje PRS modela izvedena je na populacijama evropskog porekla, zbog čega PRS modeli izvedeni iz njih potencijalno ne mogu biti generalizovani na druge populacije [115].

PRS predstavlja relativan rizik za razvoj posmatranog fenotipa. Za osobu sa određenom kombinacijom rizičnih genetičkih varijanti PRS predstavlja verovatnoću razvoja posmatranog fenotipa. Važno je istaći da PRS, kao i ostali prediktivni modeli, nije deterministički i da osim genetičkih faktora na razvoj kompleksnih fenotipova utiču i faktori poput životnog stila, demografskih ili sredinskih faktora. Takođe, niske vrednosti PRS ne znače da neće doći do razvoja posmatrane osobine [116].

Većina PRS modela razvijena je u kontekstu predviđanja rizika od nastanka bolesti. Međutim, ovi modeli mogu biti korisni i u predviđanju ishoda terapije određenim lekovima [117]. Kao što je već pomenuto, brojna farmakogenetička istraživanja sprovedena su kako bi se objasnila interindividualna varijabilnost ishoda povezanih sa primenom lekova, kao što je odsustvo odgovora na terapiju, potrebe za promenama u doziranju leka ili pojava neželjenih reakcija na lek. Međutim, mnoge od ovih studija bile su fokusirane na monogensku osnovu ishoda primene leka, odnosno, genetičke varijante sa većim efektom posmatrane su kao zasebni prediktori. Relativno malo studija imalo je za cilj kombinovanje farmakogenetičkih varijanti kako bi se poboljšala predviđanja ishoda primene lekova [118].

Najpoznatiji primer važnosti više farmakogenetičkih markera u različitim genima je doziranje varfarina. Varfarin je oralni antikoagulan koji je u širokoj upotrebi, ali je vrlo rano primećeno da ima uzak terapijski indeks i da postoji velika interindividualna varijabilnost u odgovoru na njegovu primenu. GWA studije koje su se bavile doziranjem terapije održavanja varfarinom identifikovale su farmakogenetičke varijante u genima *VKORC1* i *CYP2C9* kao važne prediktore potrebe za prilagođavanjem doziranja ovog leka, te danas postoje propisane preporuke o prediktivnom farmakogenetičkom testiranju [119]. Ovaj primer ukazuje na potencijalno veliku vrednost prediktivnih modela u farmakogenomici koji bi bili zasnovani na više genetičkih lokusa.

U poslednje vreme PRS modeli počinju da nalaze primenu i u farmakogenomičkim istraživanjima [120]. Primer upotrebe poligenских skorova je studija ispitivanja odgovara na primenu lurazidona kod pacijenata obolelih od šizofrenije. Ova studija je pokazala da varijante u nekim od gena koji su uključeni u procese razvika nervnog sistema, obrazovanje sinapsi i imunski odgovor značajno doprinose predviđanju odgovora na primenu ovog leka [121]. Primer primene PRS modela u farmakogenetičkim istraživanjima je i jedna od najvećih do sada sprovedenih farmakogenetičkih studija terapije klopidogrelom, u kojoj je pokazano da 6 genetičkih varijanti doprinosi razvoju teških neželjenih kardiovaskularnih poremećaja (eng. *major adverse*

*cardiovascular events MACE*). Ova studija je posebno važna za budućnost primene PRS u farmakogenetičkim istraživanjima, budući da nijedna od ovih varijanti pojedinačno nije bila povezana sa ovom pojavom, što ukazuje na to da kumulativni efekat varijanti koje malo doprinose pojavi jednog događaja može imati veliki prognostički značaj [122].

## **2. Ciljevi**

Akutna limfoblastna leukemija (ALL) predstavlja najčešće maligno oboljenje dečjeg uzrasta. Efikasnost lečenja može se unaprediti, a neželjena dejstva smanjiti personalizovanim pristupom lečenju obolelih, zasnovanom na farmakogenetičkim principima. Stoga je korelacija između genetičke varijabilnosti bolesnika i njihovog odgovora na terapiju lekovima predmet intenzivnih istraživanja.

Među najvažnijim lekovima Berlin-Frankfurt-Munster (BFM) protokola nalaze se tiopurinski lekovi, metotreksat i vinkristin.

Prema BFM protokolu, tiopurinski lekovi primenjuju se u fazama intenzifikacije, konsolidacije, reindukcije i održavanja. Prvi deo ove doktorske disertacije predstavlja retrospektivnu kliničku studiju odgovora na terapiju tiopurinskim lekovima kod dece obolele od ALL u Srbiji. Ciljevi ovog dela disertacije su:

1. Određivanje farmakogenetičkog potencijala varijanti u kodirajućim i okolnim regionima gena *NUDT15*.
2. Određivanje farmakotranskriptomskog potencijala ekspresije gena *NUDT15* u mononuklearnim ćelijama u trenutku postavljanja dijagnoze.

Metotreksat je lek koji se prema BFM protokolu koristi u svim fazama terapije. Drugi deo ove doktorske disertacije predstavlja retrospektivnu kliničku studiju odgovora na terapiju metotreksatom kod dece obolele od ALL u Srbiji. Cilj ovog dela disertacije je:

3. Ispitivanje varijante rs4149056 u genu *SLCO1B1* kao markera farmakokinetike i toksičnosti metotreksata.

Vinkristin se prema BFM protokolu primenjuje u fazama indukcije, intenzifikacije, konsolidacije i reindukcije. Treći deo ove doktorske disertacije predstavlja retrospektivnu kliničku studiju odgovora na terapiju vinkristinom kod dece obolele od ALL u Srbiji. Cilj ovog dela disertacije je:

4. Izučavanje varijanti u genima *CEP72* (rs924607), *ACTG1* (rs1135989), *CYP3A5* (rs776746), *MIR3117* (rs12402181) i *MIR4481* (rs7896283) kao potencijalnih farmakogenetičkih markera.

U poslednje vreme postoje napori da se primenom veštačke inteligencije, bioinformatičkim pristupom i naprednim statističkim alatima formiraju modeli koji bi mogli biti korišćeni u predikciji kompleksnih fenotipova, kao što je, na primer odgovor na terapiju određenim lekom. Četvrti deo ove doktorske disertacije posvećen je razvoju takvog modela, koji bi mogao biti korišćen u predikciji odgovora na terapiju svakog od ova tri leka kod dece obolele od ALL u Srbiji. Cilj ovog dela disertacije je:

5. Konstruisati prediktivni farmakogenetički model odgovora na terapiju, upotrebom naprednih statističkih alata.

# **3. Materijal i metode**

### 3.1 Ispitanici

Uzorci periferne krvi i koštane srži, kao i odgovarajući klinički parametri obolelih od dečje ALL prikupljeni su u saradnji sa Odeljenjem hematologije i onkologije Univerzitetske dečje klinike (UDK) u Beogradu. Oboleli pre 1. aprila 2010. godine lečeni su prema ALL IC-BFM 2002 protokolu, dok su oboleli posle ovog datuma lečeni prema ALL IC-BFM 2009 protokolu. Studiju je odobrio Etički odbor Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu (O-EO-031/2021/1 od 13.07.2021, Prilog 1). Studija je izvedena prema principima helsinške deklaracije.

U ispitivanje odgovora na tiopurinsku terapiju uključeno je 48 bolesnika, dijagnostikovanih između 2003. i 2012. godine, analiziranih u fazi održavanja. Kao surogat markeri toksičnosti korišćeni su broj epizoda leukopenije, procenat nedelja koji su oboleli provodili bez terapije tiopurinskim lekovima, procenat nedelja tokom kojih su oboleli dobijali sniženu dozu 6-MP i prosečna doza 6-MP tokom terapije.

Ispitivanje odgovora na terapiju metotreksatom uključivalo je 139 obolelih, dijagnostifikovanih između 2003. i 2012. godine, analiziranih u fazi konsolidacije. Kao surogat markeri toksičnosti korišćeni su pojava i gradus oralnog mukozitisa, gastrointestinalnih toksičnosti i hepatotoksičnosti. Ovi parametri procenjivani su prema pravilniku američkog Nacionalnog instituta za rak (engl. *National Cancer Institute, NCI*) [123]. Kao surogat marker farmakokinetike metotreksata korišćen je broj epizoda usporene eliminacije metotreksata, određivan na osnovu koncentracije metotreksata u plazmi obolelih 36h i 48h nakon primene ovog leka. Ovaj deo studije uključivao je i populacionu analizu učestalosti varijante rs4149056 u genu *SLCO1B1*, za koju su podaci dobijeni analizom kliničkog egzoma 134 osobe srpskog porekla, korišćenjem *TruSight One* panela gena na *MiSeq Illumina* platformi.

Odgovor na terapiju vinkristinom proučavan je kod 56 ispitanika, dijagnostikovanih između 2010. i 2018. godine. Kao surogat marker toksičnosti korišćena je pojava vinkristinom indukovane periferne neuropatije, procenjivana na kraju faze reindukcije na osnovu pravilnika NCI [124].

### 3.2 Metode za detekciju genetičkih varijanti

Detekcija genetičkih varijanti izvedena je metodom Sangerovog sekvenciranja. Ova metoda podrazumevala je prethodnu izolaciju DNK iz periferne krvi obolelih, praćenu umnožavanjem regiona DNK od značaja lančanom reakcijom polimerizacije (eng. *Polimerase Chain Reaction, PCR*).

#### 3.2.1 Izolacija DNK iz periferne krvi

Izolacija genomske DNK iz periferne krvi bolesnika vršena je upotrebom komercijalno dostupnog kita *QIAmp DNA Blood Mini Kit* (*Qiagen*, Nemačka). Postupak je sproveden prema uputstvima proizvođača. Koncentracija izolovane DNK merena je spektrofotometrijski, aparatom *Biospec-nano* (*Shimadzu*, Japan).

### 3.2.2 Umnožavanje regiona DNK od značaja metodom PCR

Metoda PCR predstavlja *in vitro* reakciju replikacije DNK, u kojoj se specifično i u velikom broju umnožavaju regioni od značaja za analizu. Selekcija regiona od značaja postiže se upotrebom adekvatnog para prajmera (ušodni-F i nishodni-R), kratkih oligonukleotidnih fragmenata komplementarnih odgovarajućim lancima DNK molekula. Produkt dobijen PCR reakcijom po dužini i sekvenci odgovara regionu genomske DNK ograničenog prajmerima. Osim prajmera i genomske DNK, za PCR reakciju je neophodno prisustvo termostabilne DNK polimeraze, dezoksinukleotid trifosfata (dNTP) i jona  $Mg^{++}$ .

PCR reakcija se izvodi upotrebom PCR aparata sposobnih da brzo menjaju temperaturu reakcione smeše. Ponavljanjem određenog broja ciklusa denaturacija-aniling-ekstenzija, definisanih temperaturom i trajanjem svakog od ovih koraka, dolazi do eksponencijalnog umnožavanja regiona DNK od značaja.

Prajmeri koji su korišćeni za umnožavanje regiona DNK od značaja u ovoj studiji dizajnirani su upotrebom sledećih alata: *OligoAnalyzer* [<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>], *UCSC In-Silico PCR* [<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>] i *SNPCheck* [<https://genetools.org/SNPCheck/snpcheck.htm>]. Spisak svih prajmera sa nazivima gena u čijim regionima se nalaze, sekvencom i dužinom regiona od značaja dat je u tabeli 3.1.



Tabela 3.1. Prajmeri za detekciju varijanti u ispitivanim genima. Prajmeri sa podebljanim sekvencama korišćeni su i u reakcijama sekvenciranja

Gen	Naziv	Sekvenca prajmera (5'-3' smer)	Dužina regiona od značaja (bp)
<i>ACTG1</i>	ACTG1_ex5-F	<b>CAATGAGCGGTTCCGGTGTC</b>	628
	ACTG1_ex5-R	GAGGTGTGTGCATTTGCCAGG	
<i>CEP72</i>	CEP72_F	<b>TGTGCCCTGAACTCCTTCAC</b>	419
	CEP72_R	TGGTCAGGTTGCCTTCATGG	
<i>MIR3117</i>	miRNA-3117-3p_seq-F	<b>CACTAGATCAGAAGACCTGGGC</b>	432
	miRNA-3117-3p_seq-R	GATGGAAGAGTAGTGCTTTGGC	
<i>MIR4481</i>	miRNA-4481_seq-F	<b>CACATTCAGAGATGATGGTGCAG</b>	569
	miRNA-4481_seq-R	GTGGAGGGGCTGCATCTA	
<i>CYP3A5</i>	CYP3A5-F	GACTGTGGAGTGCTGTGGAG	493
	CYP3A5-R	<b>CACACCCAGGAAGCCAGAC</b>	
<i>SLCO1B1</i>	SLCO1B1_ex5-F	CAGCCATGAGGAACTATGAGTCC	657
	SLCO1B1_ex5-R	<b>CAGAGATCCCAGGGTAAAGCC</b>	
<i>NUDT15</i>	NUDT15-ex1-F	<b>GAGTTCGTCTGTGAGGTGTG</b>	680
	NUDT15-ex1-R	CACACCTCACAGACGAACTC	
	NUDT15-ex2-F	GATTACAGACATGAGCCACATGCC	591
	NUDT15-ex2-R	<b>GCCCCAACCTCCTAAAACCTC</b>	
	NUDT15-ex3-F	<b>GCCAAGCAAATGCAAAGCATC</b>	613
	NUDT15-ex3-R	GACTGCATCCTACTCCATGC	

Finalna zapremina svih reakcionih smeša bila je 30  $\mu$ l i sadržala je sledeće komponente:

- 50-100 ng genomske DNK
- PCR pufer (finalna koncentracija 1x)
- MgCl<sub>2</sub> (finalna koncentracija 2.75 mM)
- dNTP (finalna koncentracija svakog 0.5 mM)
- prajmeri (svakog po 10 pmol)
- DNK polimeraza (1 U; *FastGene® Taq DNA Polymerase*, NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Dueren, Germany).

PCR reakcije izvedene su u PCR aparatima (Mastercycler Nexus, Eppendorf, Hamburg, Germany) prema temperaturnim profilima koji su podrazumevali sledeće korake:

- Inicijalna denaturacija (5 minuta / 95 °C)
- 35 ciklusa denaturacija-aniling-ekstenzija (temperature i trajanje ovih koraka prikazane su u tabeli 3.2)
- Finalna ekstenzija (10 minuta / 72 °C).

Tabela 3.2. Uslovi ciklusa denaturacija-aniling-ekstenzija za izvođene PCR reakcije

Par prajmera	Denaturacija	Aniling	Ekstenzija
ACTG1_ex5-F ACTG1_ex5-R		40 sekundi/ 68 °C	
CEP72_F CEP72_R		30 sekundi/ 58 °C	
miRNA-3117-3p_seq-F miRNA-3117-3p_seq-F		30 sekundi/ 56 °C	
miRNA-4481_seq-F miRNA-4481_seq-R		30 sekundi/ 56 °C	
CYP3A5-F CYP3A5-R	30 sekundi/ 95 °C	30 sekundi/ 58 °C	30 sekundi/ 72 °C
SLCO1B1_ex5-F SLCO1B1_ex5-r		30 sekundi/ 57 °C	
NUDT15-ex1-F NUDT15-ex1-R		30 sekundi/ 54 °C	
NUDT15-ex2-F NUDT15-ex2-R		30 sekundi/ 62 °C	
NUDT15-ex3-F NUDT15-ex3-R		30 sekundi/ 54 °C	

### 3.2.3 Analiza produkata PCR reakcije na agaroznom gelu

Uspešnost svake PCR reakcije proveravana je horizontalnom elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Ova metoda se zasniva na diferencijalnoj brzini putovanja fragmenata DNK različite veličine kroz agarozni gel u električnom polju. Veličina fragmenta DNK umnoženog PCR reakcijom određuje se vizualno, izlaganjem gela UV svetlu i poređenjem sa komercijalnim DNK markerom.

Za pripremu gelova korišćena je agarozna visoke čistoće, 1 x TAE pufer i etidijum bromid u finalnoj koncentraciji 0,7 µg/ml. Elektroforeza se izvodi u 1x TAE puferu, uz jačinu struje od 120 mA i napon od 120 V, u trajanju od 30 min. Vizualizacija umnoženih regiona od značaja vršena je CCD kamerom sa *BioDocAnalyse* sistemom (*Biometra GmbH*, Nemačka).

### 3.2.4 Prečišćavanje produkata PCR reakcije

Nakon umnožavanja regiona od značaja, vršeno je prečišćavanje dobijenih fragmenata. Ovaj postupak se sprovodi kako bi se osigurao jasan signal bez šuma u koraku koji sledi- sekvenciranje Sangerovom metodom. Izvodi se upotrebom magnetnih kuglica koje imaju osobinu da za svoju površinu nekovalentno vezuju DNK molekule, dok druge komponente koje mogu biti uzrok kontaminacije ostaju u rastvoru.

Magnetne kuglice (*AMPure XP, Beckman Coulter, SAD*) čuvaju se na 4 °C, te ih je pre upotrebe potrebno temperirati na sobnu temperaturu i dobro izmešati. U tubu sa PCR smešom koju treba prečistiti dodaje se količina magnetnih kuglica u zapreminskom odnosu 1:1, dobro izmeša vorteksom ili nastavkom i inkubira 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon isteka vremena, potrebno je kratko centrifugirati smešu i tubu ostaviti na magnetnom stalku dok se tečnost ne izbistri. Zatim je potrebno odstraniti supernatant, pazeći da u njemu nema zaostalih kuglica. U tubu sa magnetnim kuglicama, dok je još na magnetnom stalku, potrebno je dodati 100 µl sveže pripremljenog 80% rastvora etanola, inkubirati 30 sekundi, a zatim odstraniti sav etanol pazeći da u njemu nema magnetnih kuglica. Ponoviti ispiranje rastvorom 80% etanola, pa tube sa magnetnim kuglicama ostaviti na sobnoj temperaturi, na magnetnom stalku, dok zaostali etanol ne ispari, a površina kuglica ne ispuca. Tada je potrebno tube skinuti sa magnetnog stalka i magnetne kuglice potpuno resuspendovati u 20 µl dvostruko dejonizovane vode. Dobijenu smešu inkubirati 5 min na sobnoj temperaturi, a zatim kratko centrifugirati i ostaviti na magnetnom stalku dok se tečnost ne izbistri. Supernatant, u kome je prečišćeni produkt PCR reakcije, zatim prebaciti u novu tubu i izmeriti koncentraciju i čistoću DNK.

### 3.2.5 Sekvenciranje Sangerovom metodom

Detekcija svih ispitivanih genetičkih varijanti vršena je metodom Sangerovog sekvenciranja [125]. Ova metoda predstavlja ciljano sekvenciranje, odnosno utvrđivanje redosleda nukleotida u lancu DNK, zasnovano na *in vitro* replikaciji uz upotrebu specifičnog prajmera i smeše dezoksiribonukleotida (dNTP) i fluorescentno obeleženih didezoksiribonukleotida (ddNTP). Kao DNK matrica koristi se prethodno umnožen region od značaja. Upotrebom jednog, specifičnog prajmera postiže se sinteza uvek istog lanca DNK, koja traje sve do ugradnje ddNTP-a, budući da ovi nukleotidi ne poseduju 3'-OH grupu na molekulu dezoksiriboze, neophodnu za dalje produžavanje molekula DNK. Svaki ddNTP obeležen je različitom fluorescentnom bojom, što omogućuje izvođenje sekvenciranja u jednoj reakciji. Kao posledica svega navedenog, na kraju reakcije sekvenciranja dobijena smeša sadrži veliki broj jednolančanih fragmenata DNK čije se dužine međusobno razlikuju za po jedan nukleotid i na čijim 3'-krajevima se nalazi specifično obeleženi ddNTP. Dobijeni fragmenti se razdvajaju kapilarnom elektroforezom visoke rezolucije u automatskom sekvencatoru. Ovaj aparat sadrži i laserski sistem koji detektuje fluorescenciju ddNTP-a ugrađenih na 3'-krajeve fragmenata. Signali se nakon kompjuterske obrade podataka prevode u niz pikova na elektroferogramu koji predstavlja redosled nukleotida u DNK sekvenci. Ukoliko je u ispitivanoj sekvenci prisutna heterozigotna varijanta, na datom lokusu postojaće dva pika različite boje i sličnog intenziteta.

Za reakciju sekvenciranja, finalnog volumena 5  $\mu$ l, korišćene su sledeće komponente:

- 10-20 ng prečišćenog PCR produkta
- 2 pmol prajmera za sekvenciranje (Tabela 3.1)
- 0.5  $\mu$ l *Ready Reaction Mix* iz *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (*ThermoFisher Scientific*, SAD)
- 1 x pufer za sekvenciranje iz *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (*ThermoFisher Scientific*, SAD)
- ddH<sub>2</sub>O do finalnog volumena.

Reakcije sekvenciranja izvedene su u PCR aparatima *Mastercycler Nexus* (*Eppendorf*, Nemačka), prema temperaturnom profilu prikazanom u tabeli (3.2.5.1).

Tabela 3.2.5.1. Temperaturni profil reakcije sekvenciranja

	Temperatura (°C)	Trajanje	Broj ciklusa
<b>Inicijalna denaturacija</b>	96	1 min	1
<b>Denaturacija</b>	96	10 sec	
<b>Aniling</b>	50	5 sec	25
<b>Ekstenzija</b>	60	4 min	

Produkti reakcije sekvenciranja prečišćeni su Na-acetatnom i etanolskom precipitacijom. U tubu sa produktom reakcije sekvenciranja dodavano je 40  $\mu$ l rastvora Na-acetata (37.5 mM Na-acetat, 78% etanol). Dobijena smeša se dobro promeša a zatim centrifugira 20 min / 13,000 rpm. Supernatant je potom odbacivan, a u tubu sa talogom dodavano je 200  $\mu$ l 70% etanola. Nakon centrifugiranja (10 min / 13,000 rpm) celokupan supernatant je odbacivan, a talog osušen. U potpuno suv talog dodavano je 25  $\mu$ l *HiDi* formamida (*Applied Biosystems Life Technologies*, SAD). Celokupni volumen zatim je korišćen za analizu upotrebom automatskog sekvenatora *3130 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems Life Technologies*, SAD) i pratećeg softvera, *Sequencing Analysis Software v5.3.2 with KB Basecaller v1.4* (*Applied Biosystems Life Technologies*, SAD).

### 3.3. Metode za izučavanje genske ekspresije

#### 3.3.1. Izolacija mononuklearnih ćelija

Mononuklearne ćelije izolovane su iz svežih uzoraka periferne krvi ili koštane srži pacijenata. Uzorkovanje je vršeno pre početka lečenja, prilikom postavljanja dijagnoze.

U sterilnu epruvetu, zapremine 10 ml dodavano je 3 ml reagensa *Ficoll-Paque Plus* (GE Healthcare, UK). Uzorak (2 ml) je potom razblažen fiziološkim rastvorom u odnosu 1:1 i nanet u epruvetu sa fikolom, pažljivo uz ivicu epruvete, kako ne bi došlo do mešanja tečnosti. Sledi korak centrifugiranja od 25 min / 1500 rpm na sobnoj temperaturi, posle čega se mononuklearne ćelije uočavaju u vidu belog sloja, na gustinskom gradijentu između fikola i plazme. Mononuklearne ćelije potrebno je preneti u novu epruvetu od 10 ml, pazeći da se prilikom prebacivanja ne zahvati i rastvor fikola, a zatim dodati 8 ml rastvora 1 x PBS. Dobijenu smešu potom nekoliko puta promešati inverovanjem i centrifugirati 15 min / 1500 rpm na sobnoj temperaturi. Odbaciti supernatant a talog, koji sadrži mononuklearne ćelije, rastvoriti u 1 ml rastvora *TRI® Reagent Solution* (Ambion, SAD) i čuvati na -80 °C.

#### 3.3.2. Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija

Ukupna RNK iz mononuklearnih ćelija izolovana je pomoću *TRI® Reagent Solution* (Ambion, SAD), prema uputstvu proizvođača, procesom koji predstavlja modifikovan standardni metod izolacije RNK [126].

Uzorak mononuklearnih ćelija čuvan u *TRI® Reagent Solution* otopiti pa ćelije lizirati provlačenjem ćelija kroz špic i iglu promera 0.7 mm. Dodati 200 µl hloroforma i dobijenu smešu jako promešati. Inkubirati 15 min na sobnoj temperaturi pa centrifugirati na 12 000 rcf / 15 min / +4 °C. Celokupnu gornju fazu, koja sadrži RNK, prebaciti u novu tubu i dodati 500 µl izopropanola. Dobijenu smešu blago promešati invertovanjem i inkubirati 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja na 12,000 rcf / 15 min / +4 °C odlići supernatant a u tubu sa talogom dodati 1 ml 70% etanola. Ponoviti korak centrifugiranja pa odstraniti sav etanol i u potpunosti osušiti talog. Talog je potrebno resuspendovati u 50 µl vode bez RNAze pa izmeriti koncentraciju i čistoću RNK uzorka. Uzorak zatim čuvati na -80 °C do dalje upotrebe.

#### 3.3.3. Reverzna transkripcija (RT-PCR)

Reverzna transkripcija predstavlja *in vitro* proces u kome se na osnovu RNK matrice sintetiše komplementarni molekul DNK (cDNK).

Smešu ukupne zapremine 11 µl, u kojoj se nalaze 1000 ng ukupne RNK i 100 pmol *Random Hexamer Primer-a* (*ThermoFisher Scientific*, SAD) potrebno je inkubirati 5 min na 70 °C, pa 2 min na ledu. Dodati 9 µl prethodno pripremljene smeše koja sadrži:

- 4 µl 5 x pufera za reverznu transkripciju
- 2 µl 10 mM dNTP
- 200 U reverzne transkriptaze *RevertAid M-MuLV* (*ThermoFisher Scientific*, SAD)

- 20 U RNaznog inhibitora *RiboLock* (*ThermoFisher Scientific*, SAD)
- dd H<sub>2</sub>O do finalnog volumena.

Dobijenu smešu inkubirati prvo 15 min na 25 °C, a potom 1h na 42 °C. Reakcija se završava inkubacijom 10 min na 70 °C. Dobijeni uzorak cDNK čuvati na -20 °C.

Kvalitet dobijene cDNK proveravan je PCR metodom, tako što je umnožavan fragment konstitutivno eksprimiranog gena *ABL1* (eng. *ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase*). Sekvence korišćenih prajmera prikazane su u tabeli 3.3.3.1.

Tabela 3.3.3.1 Sekvence prajmera za umnožavanje fragmenta gena *ABL1*

Gen	Naziv	Sekvenca prajmera (5'-3' smer)	Dužina regiona od značaja (bp)
<i>ABL1</i>	Ia	ATCTGCCTGAAGCTGGTGGGCT	277
	D	TGTGATTATAGCCTAAGACCCGGAG	

Finalna zapremina reakcione smeše bila je 25 µl i sadržala je sledeće komponente:

- 1 µl cDNK
- PCR pufer (finalna koncentracija 1x)
- 1 x Q rastvor (*Qiagen*, Nemačka)
- MgCl<sub>2</sub> (finalna koncentracija 3 mM)
- dNTP (finalna koncentracija svakog 0.2 mM)
- prajmeri (svakog po 10 pmol)
- 1 U *FastGene® Taq DNA Polymerase* (*NIPPON Genetics EUROPE GmbH*,

Nemačka).

PCR reakcija izvedena je prema temperaturnom profilu prikazanom u tabeli 3.3.3.2.

Tabela 3.3.3.2 Temperaturni profil reakcije umnožavanja fragmenta gena *ABL1*

	Temperatura (°C)	Trajanje	Broj ciklusa
<b>Inicijalna denaturacija</b>	95	15 min	1
<b>Denaturacija</b>	95	30 sec	
<b>Aniling</b>	65	1 min	35
<b>Ekstenzija</b>	72	1 min	
<b>Finalna ekstenzija</b>	72	10 min	1

Dobijeni produkti ispitivani su horizontalnom elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Pojava elektroforetske trake odgovarajuće dužine indirektno je potvrđivala uspešnost reakcije reverzne transkripcije.

### 3.3.4. Merenje nivoa ekspresije gena *NUDT15* metodom *real-time* PCR

Nivo ekspresije gena *NUDT15* u mononuklearnim ćelijama izolovanih iz periferne krvi ili koštane srži pacijenata u trenutku postavljanja dijagnoze određivan je metodom *real-time* PCR, odnosno kvantitativnim PCR-om. Standardnom PCR metodom količina PCR produkta može biti određena samo po završetku reakcije. Međutim, metodom *real-time* PCR moguće je količinu PCR produkta pouzdano meriti tokom reakcije, u realnom vremenu. Merenje se vrši tokom ekspanzionalne faze reakcije, kada u svakom ciklusu dolazi do udvostručavanja količine PCR produkta. Zbog ove osobine, metoda *real-time* PCR, kojoj prethodi reverzna transkripcija, je pogodna za merenje nivoa ekspresije gena.

*Real-time* PCR zasniva se na primeni fluorescentnih boja koje mogu da interaguju sa produktom PCR reakcije. Kao posledica ove interakcije uočava se merljiva, proporcionalna promena u nivou fluorescencije nakon svakog ciklusa PCR reakcije. U početnim ciklusima reakcije fluorescencija je ispod praga detekcije (eng. *threshold*), budući da je količina PCR produkta još uvek nedovoljna da bi se signal detektovao, ali se uočava takozvani osnovni (eng. *baseline*) signal. Nakon određenog broja ciklusa količina PCR produkta se uvećava i fluorescentni signal počinje da raste. Ciklus u kome fluorescentni signal pređe prag detekcije predstavlja Ct vrednost (eng. *threshold cycle*), odnosno tačku u kojoj je fluorescentni signal direktno proporcionalan količini fragmenta koji se umnožava u PCR reakciji. Niska Ct vrednost označava veliki broj kopija target sekvence u uzorku pre početka umnožavanja i obrnuto, velika Ct vrednost pokazuje da je target sekvenca prisutna u malom broju kopija na početku reakcije.

U ovoj studiji rađena je relativna kvantifikacija podataka dobijenih *real-time* PCR-om, koja podrazumeva predstavljanje rezultata kao relativni odnos referentnog uzorka, odnosno kalibratora, i ispitivanog uzorka. Prilikom kvantifikacije neophodno je sprovesti normalizaciju dobijenih podataka, kako bi se izbegle greške u postavljanju eksperimenta. Budući da Ct vrednost direktno zavisi od početne količine target sekvence u uzorku, paralelno sa umnožavanjem fragmenta od interesa sprovodi se i umnožavanje unutrašnje kontrole. Unutrašnju kontrolu predstavlja gen koji se konstitutivno eksprimira u svim uzorcima koji se kvantifikuju i čiji nivo ekspresije nije pod uticajem eksperimentalnih procedura.



Ekspresioni profil gena *NUDT15* u ispitivanim uzorcima određivan je na aparatu *ABI 7500 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*, USA) upotrebom *TaqMan* tehnike. Za normalizaciju podataka kao unutrašnja kontrola korišćen je gen *ABL1*. Kalibrator je predstavljala medijana normalizovanih vrednosti za ekspresiju gena *NUDT15* u mononuklearnim ćelijama izolovanim iz periferne krvi dece obolele od idiopatske trombocitopenijske purpura, koja se smatraju zdravim kontrolama za dečju ALL. Svaki uzorak je eksperimentalno ispitivan u duplikatu.

Smeša za *NUDT15* PCR reakciju bila je ukupne zapremine 10  $\mu$ l i sastojala se od sledećih komponenti:

- 1  $\mu$ l cDNK
- 5  $\mu$ l *TaqMan*<sup>TM</sup> *Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*, SAD)
- 0.5  $\mu$ l *TaqMan Gene Expression Assay Hs01087148\_m1* (*Applied Biosystems*, SAD)
- 3.5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O.

Smeša za *ABL1* PCR reakciju bila je ukupne zapremine 10  $\mu$ l i sastojala se od sledećih komponenti:

- 1  $\mu$ l cDNK
- 5  $\mu$ l *TaqMan*<sup>TM</sup> *Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*, SAD)
- 1  $\mu$ l 2 pmol *ABL* probe: 5'-(FAM)-CCATTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT-(TAMRA)-3'
- 1  $\mu$ l 3 pmol *ABL* ushodnog prajmera (5'-TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT-3')
- 1  $\mu$ l 3 pmol *ABL* nishodnog prajmera (5'-GATGTAGTTGCTTGGGACCCA-3')
- 1  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O.

Temperaturni profil za sve PCR reakcije je bio;

1. 95°C / 10 min
2. 50 ciklusa:
  - 95 °C / 15 sec
  - 60 °C / 1 min.

Za obradu rezultata korišćen je komparativni  $\Delta\Delta C_t$  metod [127]. prema kome je relativni nivo ekspresije gena *NUDT15* izračunat po formuli:

$$Q = 2^{-\Delta\Delta C_t}, \text{ gde je}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{uzorak}} - \Delta C_{t\text{kalibrator}} = (C_{t\text{NUDT15, uzorak}} - C_{t\text{ABL1, uzorak}}) - (C_{t\text{NUDT15, kalibrator}} - C_{t\text{ABL1, kalibrator}}).$$

### 3.4. Statistička obrada podataka

Prikupljeni podaci su statistički obrađeni a potom adekvatno prikazani u vidu tabela ili grafikona. Rezultati koji predstavljaju diskretne promenljive prikazani su kao učestalosti i procenti.

Opisne statističke mere koje su korišćene su aritmetička sredina, medijana i raspon vrednosti (minimum i maksimum). Za proveru normalnosti raspodele korišćeni su Šapiro-Vilkov ili Kolgomorov-Smirnov testovi.

Za ispitivanje Hardy-Vajbergove ravnoteže detektovanih varijanti korišćen je egzaktan test. Razlike u učestalostima alela i genotipova između upoređivanih grupa ispitivane su  $\chi^2$  testom ili egzaktnim testom.

Analize asocijacije genetičkih varijanti i surogat markera uključivale su linearnu i logističku regresiju. Ispitivanje jačine veze između dve kontinuirane varijable vršeno je metodom Spirmanove korelacije (Spirmanov koeficijent korelacije). Veza između kategorijskih varijabli ispitivana je Fišerovim egzaktnim testom. Za ispitivanje razlika između grupa kontinuiranih promenljivih primenljiv je Man-Vitnijev U-test. Svi izvedeni testovi su bili dvostrani, sa pragom statističke značajnosti  $p=0.05$ .

Sve statističke analize izvedene su upotrebom SPSS softvera (*IBM SPSS Statistics v.21*). Grafičko predstavljanje rezultata izvedeno je upotrebom softvera SPSS i MS Excel (*Microsoft Excell, v.2022*).

### 3.5. Računanje poligenskog skora rizika

Poligenski skor rizika (PRS) računat je za pojavu hepatotoksičnosti povezanu sa primenom visokih doza metotreksata u konsolidacionoj fazi terapije. PRS je računat za varijante:

1. rs1801133:C>T u genu *MTHFR*
2. rs4149056:T>C u genu *SLCO1B1*.

Ove dve varijante su izabrane zato što je za njih izvedena genotipizacija na najvećem broju ispitanika i jer za njih postoji procena povezanosti sa hepatotoksičnošću u metastudijama. Podaci o genotipizaciji varijante rs1801133:C>T u genu *MTHFR* za ovu grupu ispitanika izvedeni su iz prethodno objavljenih rezultata [80].

Bodovanje za računanje PRS vršeno je na sledeći način:

1. Ispitanicima sa 2 kopije alela asociiranog sa pojavom hepatotoksičnosti dodeljivan je 1 poen ( $g(x)=1$ )
2. Ispitanicima sa 1 kopijom alela asociiranog sa pojavom hepatotoksičnosti dodeljivano je 0.5 poena ( $g(x)=0.5$ )
3. Ostalim ispitanicima dodeljivano je 0 poena ( $g(x)=0$ ).

Dodeljene vrednosti potom su umnožene relativnim doprinosom razvoju hepatotoksičnosti, za svaku varijantu, upotrebom  $\beta$  koeficijenata koji su izvedeni iz vrednosti količnika verovatnoće, dobijenih iz adekvatnih metastudija [128,129].

Ovako izračunati doprinosi se potom sabiraju, čime se dobija ukupni genetički rizik za pojavu hepatotoksičnosti usled primene visokih doza metotreksata u konsolidacionoj fazi terapije. Matematički, PRS je računat prema formuli [130]:

$$f_{\beta}(x) = \frac{\sum_{i=1}^n \beta_i g(x_i)}{\sum_{i=1}^n \beta_i}$$

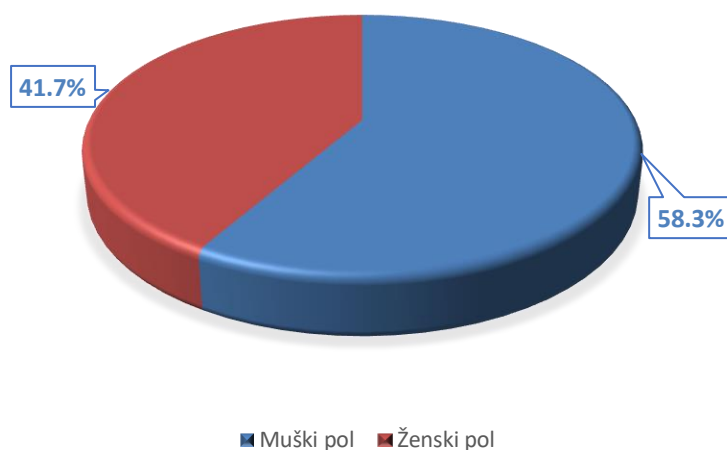
Dobijena vrednost za PRS uključena je u model logističke regresije, zajedno sa dozama metotreksata u fazi konsolidacije.

## **4. Rezultati**

#### 4.1. Retrospektivna klinička studija odgovora na terapiju tiopurinским lekovima u srpskoj populaciji dece obolele od ALL

##### 4.1.1. Demografske i osnovne kliničke karakteristike ispitanika

U ovu studiju bilo je uključeno 48 ispitanika, obolelih od dečje ALL između 2003. i 2012. godine. Ispitivana grupa se sastojala od 28 ispitanika (58.3%) muškog, i 20 ispitanika (41.7%) ženskog pola (Slika 4.1.1.1).



*Slika 4.1.1.1. Udeo polova u ispitivanoj grupi*

Medijana uzrasta ispitanika pri postavljanju dijagnoze bila je 5.2 godina, u rasponu od 0.9 do 17.6 godina. Četrdeset četiri ispitanika (91.7%) obolelo je od B-ćelijskog oblika ALL, dok je 4 ispitanika (8.3%) imalo T-ćelijski imunofenotip. Standardni rizik od relapsa imalo je 9 ispitanika (18.7%), srednji rizik 32 (66.7%), dok je 7 ispitanika (14.6%) imalo visok rizik od relapsa (Tabela 4.1.1.1).

Tabela 4.1.1.1. Osnovne demografske i kliničke karakteristike ispitanika. SR- standardni rizik; IR- srednji rizik; HR- visok rizik

<b>Uzrast (godine)</b>	
<b>Medijana</b>	5.2
Opseg	0.9-17.6
<b>Imunofenotip (No(%))</b>	
<b>B-linija</b>	44 (91.7%)
<b>T-linija</b>	4 (8.3%)
<b>Grupa rizika (No(%))</b>	
<b>SR</b>	9 (18.75%)
<b>IR</b>	32 (66.67%)
<b>HR</b>	7 (14.58%)

U ispitivanoj grupi 27 ispitanika (56.3%) lečeno je prema ALL IC-BFM 2002 protokolu, dok je 21 ispitanik (43.7%) lečen prema ALL IC-BFM 2009 protokolu. Primenjivani protokoli se ne razlikuju u fazi održavanja i podrazumevaju primenu standardnih dnevnih doza 6-merkaptopurina (6-MP) od 50 mg/m<sup>2</sup>.

Praćenje toksičnosti vršeno je na dvonedeljnoj bazi i bilo je zasnovano na broju leukocita. Ukoliko je broj leukocita bio ispod  $2.0 \times 10^9/L$ , 6-MP doze su umanjivane za 25% u nedeljnim intervalima do oporavka. U slučaju da je broj leukocita bio veći od  $3.0 \times 10^9/L$ , 6-MP doze su povećavane za 25% u nedeljnim intervalima do smanjenja. Ako je broj leukocita bio ispod  $1.0 \times 10^9/L$ , terapija 6-MP je prekidana do oporavka (epizoda leukopenije). Snižene, uvećane i prosečne doze su računane u odnosu na standardnu dozu ( $50 \text{ mg/m}^2 = 100\%$ ).

U ispitivanoj grupi procenat nedelja koje su ispitanici provodili sa sniženim dozama 6-MP kretao se između 0% i 94.3% (medijana 17.7%). Ispitanici su provodili između 0% i 19.4% nedelja bez terapije (medijana 3.3%), a broj leukopenijskih epizoda se kretao između 0 i 9 (medijana 1). Prosečne doze 6-MP koje su ispitanici primali tokom terapije održavanja kretale su se od 34% do 197% standardne doze ( $50 \text{ mg/m}^2 = 100\%$ ) (medijana 106%).

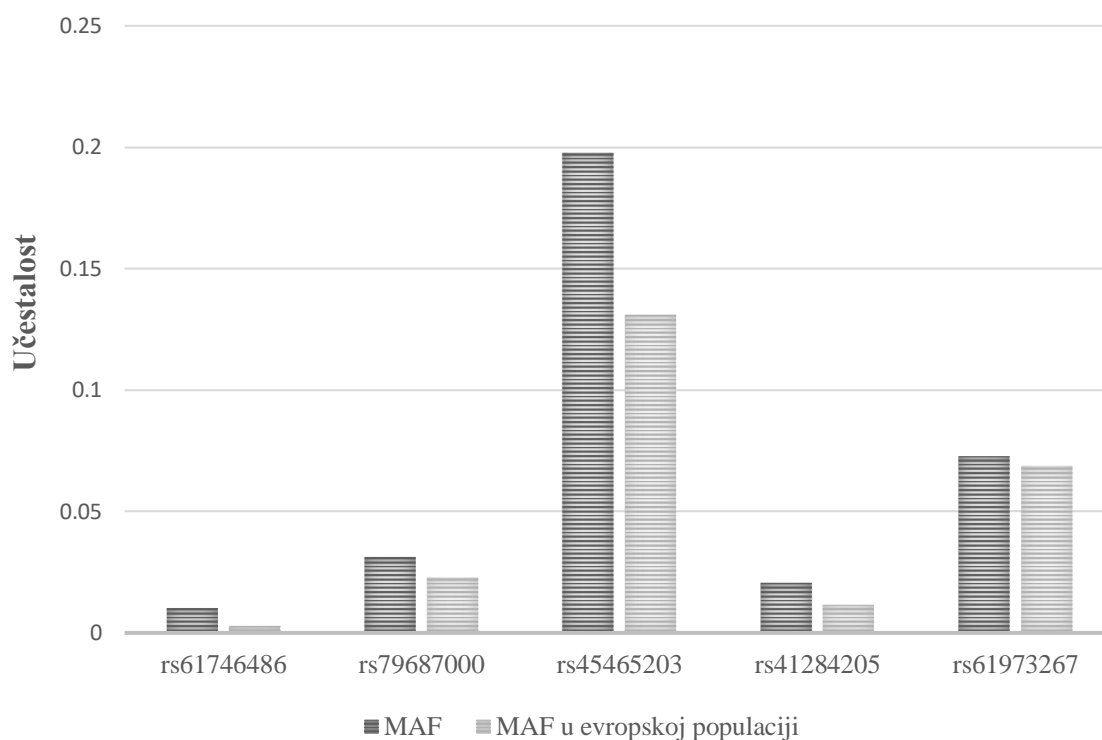
#### 4.1.2. Detekcija i učestalost varijanti u kodirajućim i okolnim regionima gena *NUDT15*

Genotipizacija kodirajućih i okolnih regiona gena *NUDT15* izvedena je metodom Sangerovog sekvenciranja. Detektovano je 5 varijanti, od kojih se jedna varijanta nalazi u prvom egzonu i ne dovodi do zamene aminokiseline. Tri varijante nalaze se u prvom intronu, dok je jedna otkrivena varijanta lokalizovana u 3'-nekodirajućem delu gena (eng. *untranslated region, UTR*) (Tabela 4.1.2.1).

Tabela 4.1.2.1. Zastupljenost i lokacija detektovanih varijanti u genu *NUDT15* u ispitivanoj grupi

Varijanta	Lokacija u genu	Genotip (Broj)
<b>rs61746486</b> <b>NM_018283.4:c.36A&gt;C</b> <b>(p.Pro12=)</b>	Egzon 1	AA (47) AC (1) CC (0)
<b>rs79687000</b> <b>NM_018283.4:c.158+117C&gt;T</b>	Intron 1	CC (45) CT (3) TT (0)
<b>rs45465203</b> <b>NM_018283.4:c.158+174G&gt;A</b>	Intron 1	GG (30) GA (17) AA (1)
<b>rs41284205</b> <b>NM_018283.4:c.159-91G&gt;A</b>	Intron 1	GG (46) GA (2) AA (0)
<b>rs61973267</b> <b>(NM_018283.4:c.*7G&gt;A</b>	3'UTR	GG (42) GA (5) AA (1)

Prisustvo svih detektovanih varijanti je potvrđeno u različitim svetskim populacijama. Učestalosti detektovanih varijanti u evropskoj populaciji dobijene su iz baze podataka *gnomAD* (slika 4.1.2.1).



Slika 4.1.2.1 Učestalosti manje zastupljenog alela (eng. *minor allele frequencies, MAF*) varijanti detektovanih u genu *NUDT15* u ispitivanoj grupi i evropskoj populaciji (izvor podataka za evropsku populaciju: baza podataka gnomAD)

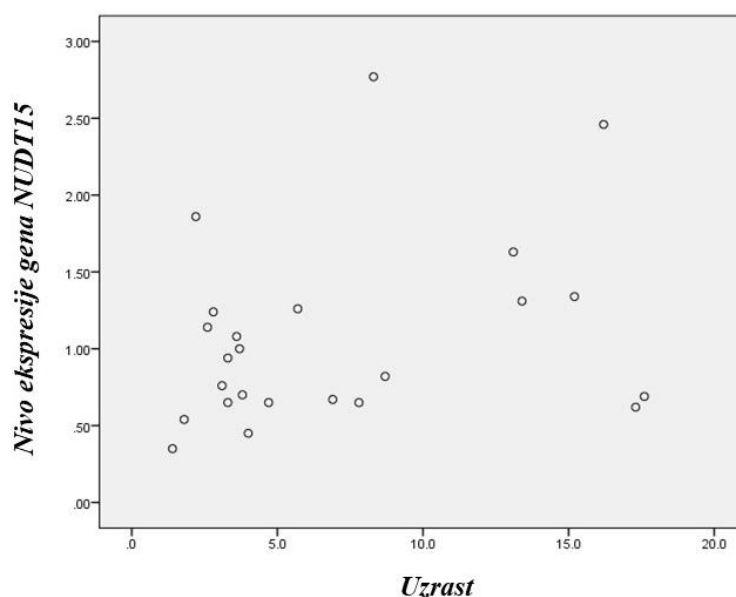
#### 4.1.3. Rezultati merenja nivoa ekspresije gena *NUDT15*

##### 4.1.3.1 Ekspresija gena *NUDT15* u mononuklearnim ćelijama poreklom iz koštane srži i periferne krvi u trenutku postavljanja dijagnoze

Relativna ekspresija gena *NUDT15* određivana je u mononuklearnim ćelijama izolovanim iz 17 uzoraka koštane srži i 7 uzoraka periferne krvi ispitanika u trenutku postavljanja dijagnoze. Srednja vrednost ekspresije u uzorcima koštane srži bila je 1.11, a u uzorcima krvi 0.96. Srednja vrednost ekspresije gena *NUDT15* u mononuklearnim ćelijama poreklom iz koštane srži bila je za 14.5% viša u odnosu na srednju vrednost ekspresije ovog gena u mononuklearnim ćelijama poreklom iz periferne krvi. Budući da razlika u distribuciji ekspresije nije dostigla prag statističke značajnosti (Man-Vitni U test,  $p=0.534$ ), u daljim analizama svi uzorci tretirani su kao jedna, zajednička grupa.

##### 4.1.3.2 Uticaj uzrasta ispitanika na nivo ekspresije gena *NUDT15* u trenutku postavljanja dijagnoze

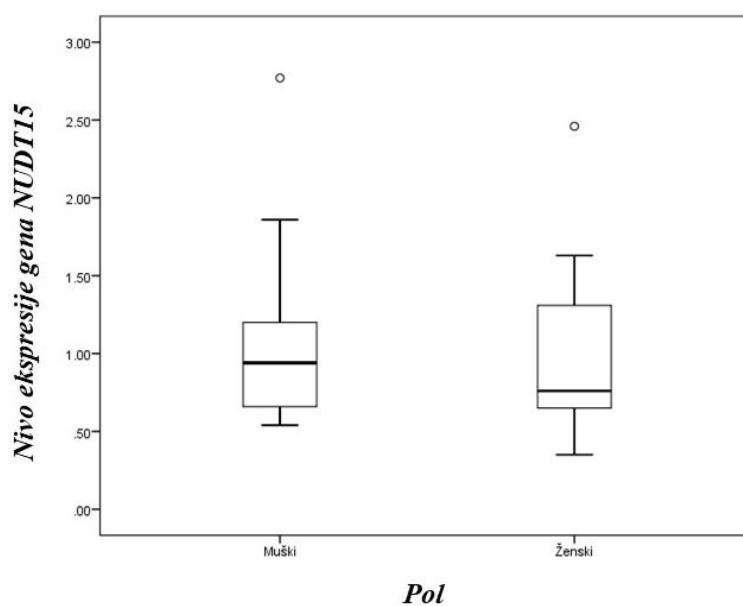
Primenom statističkog testa za Spirmanovu korelaciju pokazano je da uzrast ispitanika nije statistički značajno povezan sa nivoom ekspresije gena *NUDT15* u trenutku postavljanja dijagnoze, odnosno pre početka hemoterapije ( $p=0.264$ ) (Slika 4.1.3.2.1)



Slika 4.1.3.2.1 Povezanost uzrasta ispitanika i relativnog nivoa ekspresije gena *NUDT15*

#### 4.1.3.3 Uticaj pola ispitanika na nivo ekspresije gena *NUDT15* u trenutku postavljanja dijagnoze

Medijana relativnog nivoa ekspresije gena *NUDT15* pre početka terapije kod ispitanika muškog pola iznosila je 0.94, dok je kod ispitanika ženskog pola iznosila 0.76. Primenom Man-Vitnijevog U testa pokazano je da razlike u ekspresiji ovog gena kod ispitanika muškog i ženskog pola ne dostižu prag statističke značajnosti ( $p=0.835$ ) (slika 4.1.3.3.1)

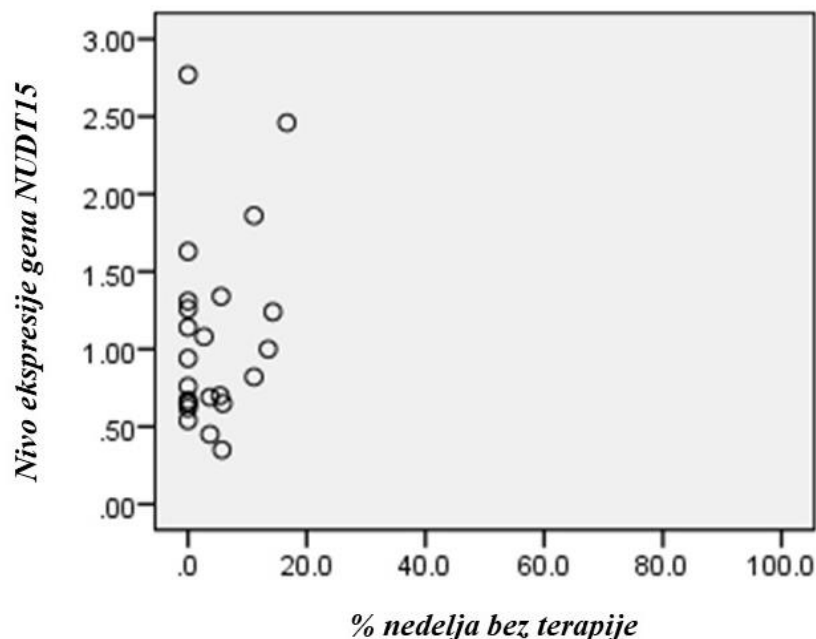


Slika 4.1.3.3.1 Relativan nivo ekspresije gena *NUDT15* kod ispitanika muškog i ženskog pola



#### 4.1.3.4. Korelacija nivoa ekspresije gena *NUDT15* u trenutku postavljanja dijagnoze i procenta nedelja bez terapije 6-MP u fazi održavanja

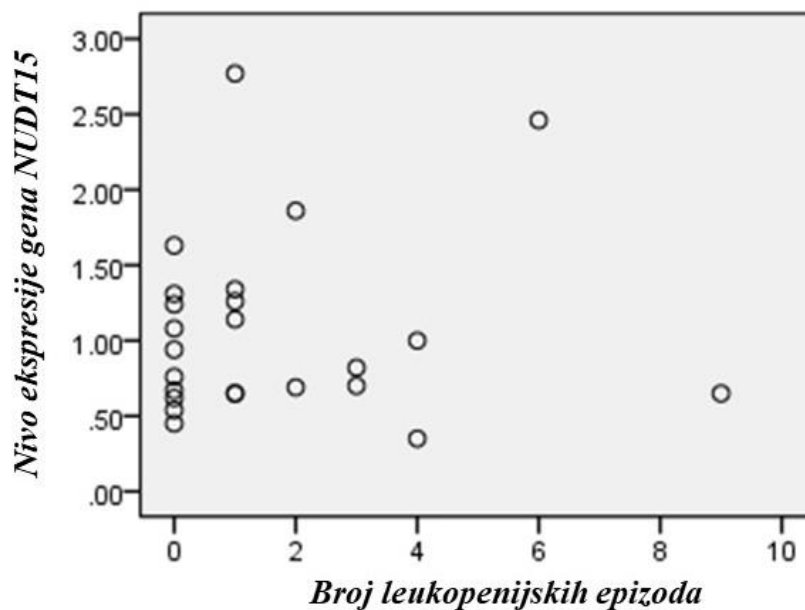
Za ispitivanje predviđanja uticaja relativnog nivoa ekspresije gena *NUDT15* pre početka terapije na vreme koje ispitanici provedu bez terapije lekom 6-MP u terapiji održavanja (izraženo u procentima nedelja bez terapije) korišćen je Spirmanov test korelacije. Rezultati nisu pokazali statistički značajnu korelaciju ova dva parametra ( $r_s = 0.142$ ;  $p = 0.507$ ) (Slika 4.1.3.4.1).



Slika 4.1.3.4.1 Korelacija relativnog nivoa ekspresije gena *NUDT15* u trenutku postavljanja dijagnoze i procenta nedelja koje ispitanici provedu bez terapije 6-MP u fazi održavanja

#### 4.1.3.5 Korelacija nivoa ekspresije gena *NUDT15* u trenutku postavljanja dijagnoze i broja leukopenijskih epizoda u fazi održavanja

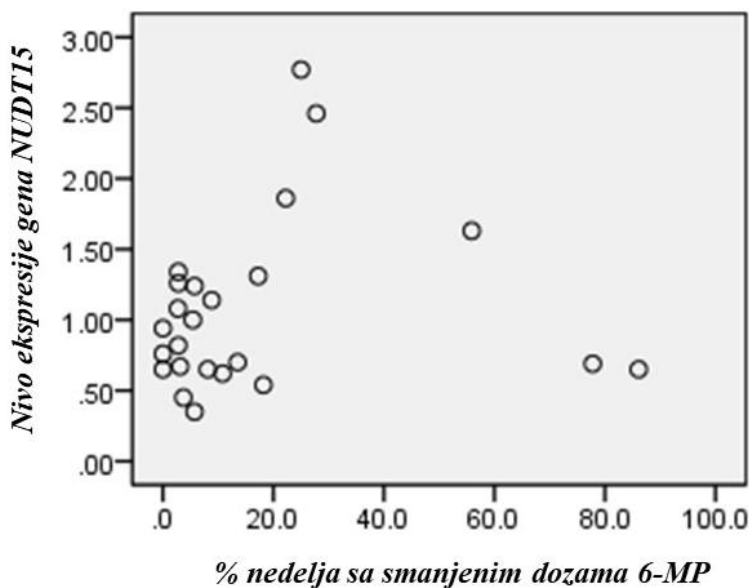
Predviđanje uticaja relativnog nivoa ekspresije gena *NUDT15* pre početka terapije na broj leukopenijskih epizoda u terapiji održavanja izvedeno je upotrebom Spirmanovog testa korelacije. Rezultati nisu pokazali statistički značajnu korelaciju ova dva parametra ( $r_s = 0.49$ ;  $p = 0.821$ ) (Slika 3.1.3.4.1).



Slika 3.1.3.5.1 Korelacija relativnog nivoa ekspresije gena *NUDT15* u trenutku postavljanja dijagnoze i broja leukopenijskih epizoda u fazi održavanja

#### 4.1.3.6. Korelacija nivoa ekspresije gena *NUDT15* u trenutku postavljanja dijagnoze i procenta nedelja sa smanjenom dozom 6-MP u fazi održavanja

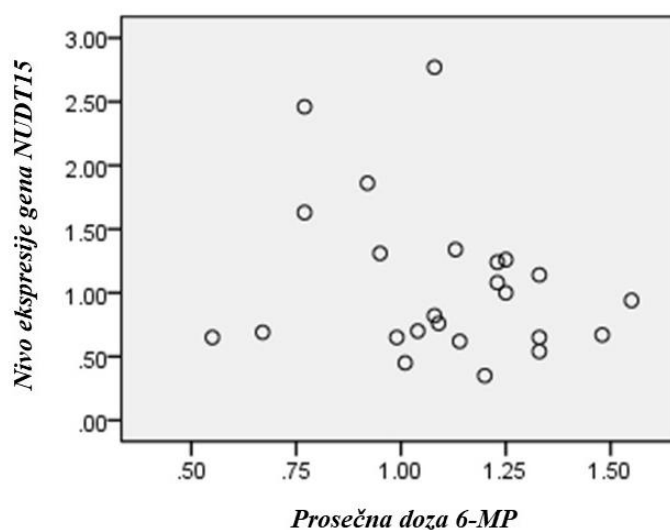
Utvrđivana je potencijalna korelacija između relativnog nivoa ekspresije gena *NUDT15* pre početka terapije i vremena koje ispitanici provedu primajući smanjenu dozu leka 6-MP (izraženo u procentima nedelja sa smanjenim dozama 6-MP) u terapiji održavanja. Primenom Spirmanovog testa korelacije pokazano je da ova dva parametra nisu statistički značajno povezana ( $r_s=0.167$ ;  $p=0.434$ ) (slika 4.1.3.5.1)



Slika 4.1.3.6.1 Korelacija relativnog nivoa ekspresije gena *NUDT15* u trenutku postavljanja dijagnoze i procenta nedelja koje ispitanici provedu primajući smanjene doze 6-MP u fazi održavanja

#### 4.1.3.7. Korelacija nivoa ekspresije gena *NUDT15* u trenutku postavljanja dijagnoze i prosečne primenjene doze 6-MP u fazi održavanja

U cilju procene farmakotranskriptomskog potencijala relativnog nivoa ekspresije gena *NUDT15* pre početka terapije utvrđivana je korelacija ovog parametra i prosečne doze leka 6-MP koje su ispitanici primali tokom terapije održavanja. Spirmanovim testom korelacije pokazano je da ova dva parametra nisu statistički značajno povezana ( $r_s = -0.190$ ;  $p = 0.374$ ) (slika 4.1.3.6.1)

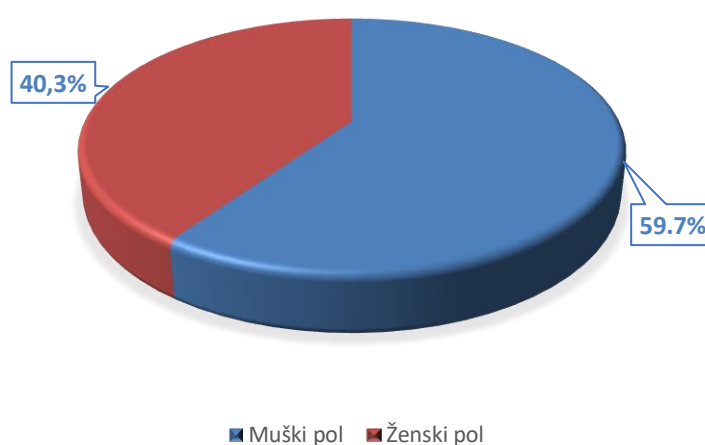


Slika 4.1.3.7.1 Korelacija relativnog nivoa ekspresije gena *NUDT15* u trenutku postavljanja dijagnoze i prosečne doze leka 6-MP koju ispitanici primaju u fazi održavanja

## 4.2. Retrospektivna klinička studija odgovora na terapiju metotreksatom u srpskoj populaciji dece obolele od ALL

### 4.2.1. Demografske i osnovne kliničke karakteristike ispitanika

U studiju je bilo uključeno 139 ispitanika kod kojih je dijagnostikovana dečja ALL na Univerzitetskoj dečjoj klinici u Beogradu, u periodu od 2003. do 2012. godine. Polnu strukturu ispitivane grupe činilo je 83 ispitanika (59.7%) muškog i 56 ispitanika (40.3%) ženskog pola (slika 4.2.1.1).



Slika 4.2.1.1. Udeo polova u ispitivanoj grupi

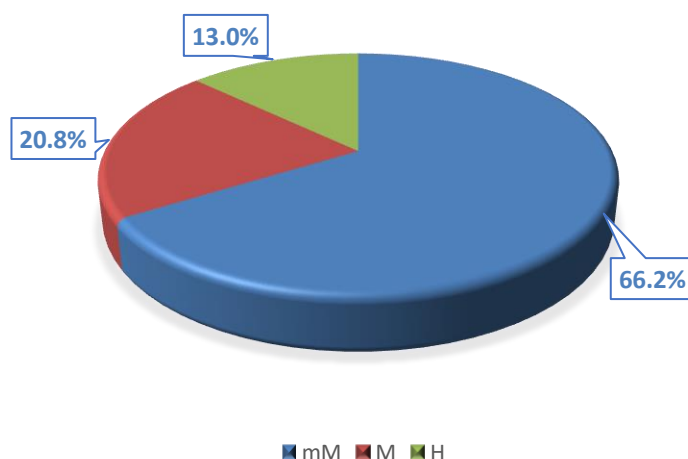
Medijana uzrasta ispitanika pri postavljanju dijagnoze bila je 5.7 godina, u rasponu od 0.9 do 17.6 godina. Najveći broj ispitanika (82.7%) oboleo je od B-ćelijskog oblika dečje ALL, dok je manji broj ispitanika razvio T-ćelijsku ALL (17.3%) (Tabela 4.2.1.1).

Prema kriterijumima za stratifikaciju na osnovu rizika od relapsa, 29 ispitanika (20.9%) svrstano je u grupu standardnog rizika, 91 ispitanik (65.4%) u grupu srednjeg rizika, dok je grupu ispitanika sa visokim rizikom činilo 19 ispitanika (13.7%) (Tabela 4.2.1.1).

Tabela 4.2.1.1 Osnovne demografske i kliničke karakteristike ispitanika. SR- standardni rizik; IR- srednji rizik; HR- visok rizik

<i>Uzrast (godine)</i>	
<b>Medijana</b>	5.7
Opseg	0.9-17.6
<i>Imunofenotip (No(%))</i>	
<b>B-linija</b>	115 (82.7%)
<b>T-linija</b>	24 (17.3%)
<i>Grupa rizika (No(%))</i>	
<b>SR</b>	29 (20.86%)
<b>IR</b>	91 (65.47%)
<b>HR</b>	19 (13.67%)

U ispitivanoj grupi, 103 ispitanika (74.1%) lečena su prema ALL IC-BFM 2002 protokolu, dok je 36 ispitanika (25.9%) lečeno prema ALL IC-BFM 2002 protokolu. Ove dve verzije protokola se ne razlikuju u tretmanu metotreksatom u fazi konsolidacije. Ispitanici koji su učestvovali u studiji tokom faze konsolidacije primali su 4 doze metotreksata. Ukoliko su imali visok rizik od relapsa primali su doze od 5 g/m<sup>2</sup> (HR protokol), dok su ostali ispitanici, u zavisnosti od imunofenotipa, rizika od relapsa i randomizacije, primali doze od 2 g/m<sup>2</sup> (mM protokol), odnosno 5 g/m<sup>2</sup> (M protokol). Prema HR protokolu lečeno je 18 ispitanika (13.0%), M protokol primalo je 29 ispitanika (20.8%), dok je 92 ispitanika (66.2%) primalo mM protokol (Slika 4.2.1.2).



Slika 4.2.1.2 Distribucija ispitanika na osnovu protokola terapije metotreksatom u fazi konsolidacije. mM- ispitanici su primali 2g/m<sup>2</sup> MTX po dozi, M- ispitanici su primali 5g/m<sup>2</sup> po dozi, HR- ispitanici su primali 5g/m<sup>2</sup> po dozi

#### 4.2.2. Zastupljenost varijante rs4149056:T>C u genu *SLCO1B1* u ispitivanoj grupi, srpskoj i evropskoj populaciji

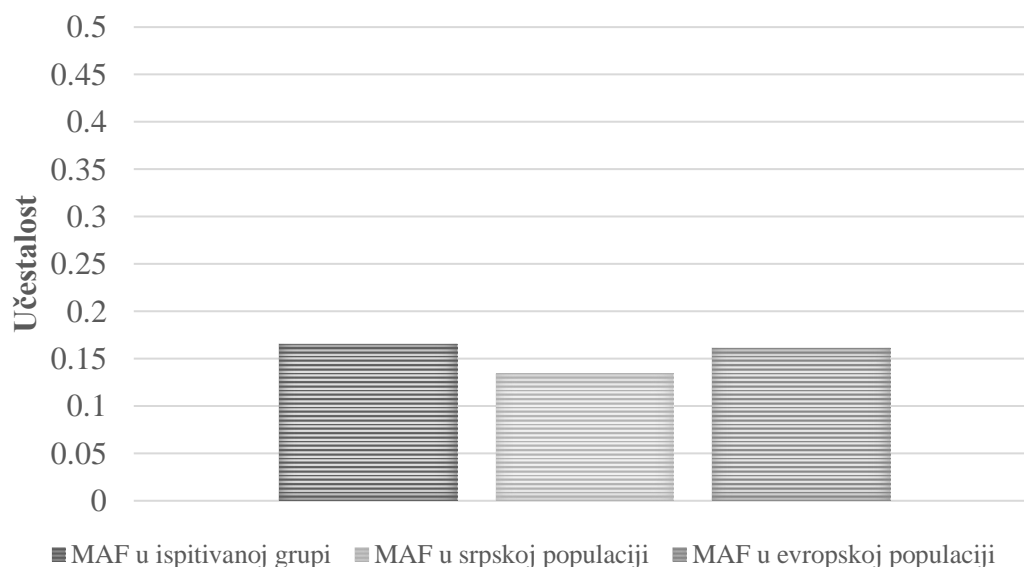
Genotipizacija varijante rs4149056:T>C u ispitivanoj grupi izvršena je metodom Sangerovog sekvenciranja. Podaci o učestalosti ove varijante u srpskoj populaciji dobijeni su analizom kliničkog egzoma 134 osobe srpskog porekla (*TruSight One Sequencing* panel gena, *MiSeq* platforma), upotrebom softvera *VariantStudio* (verzija 3, *Illumina*, SAD). Učestalost ove varijante u evropskoj populaciji dobijena je iz Projekta 1000 genoma (*1000 Genome Project*), preko baze podataka *Ensembl*.

Testiranje Hardi-Vajnbergove ravnoteže egzaktnim testom pokazalo je da su učestalosti genotipova varijante rs4149056:T>C u ravnoteži u svim analiziranim grupama (Tabela 4.2.2.2).

Tabela 4.2.2.2 Učestalosti genotipova varijante rs4149056:T>C i Hardi- Vajnbergova ravnoteža u ispitivanoj grupi obolelih od dečje ALL, srpskoj i evropskoj populaciji

Gen (varijanta)	Genotip	Ispitivana grupa		Srpska populacija		Evropska populacija	
		N (%)	Hardi-Vajnbergova ravnoteža	N (%)	Hardi-Vajnbergova ravnoteža	N (%)	Hardi-Vajnbergova ravnoteža
<i>SLCO1B1</i> (rs4149056:T>C)	TT	100 (71.9)		100 (74.6)		351 (69.8)	
	TC	32 (23.0)	0.06	32 (23.9)	1	142 (28.2)	0.41
	CC	7 (5.0)		2 (1.5)		10 (2.0)	

Učestalosti manje zastupljenog alela u ispitivanoj grupi, srpskoj i evropskoj populaciji prikazane su na slici 4.2.2.1.



Slika 4.2.2.1 Učestalosti manje zastupljenog alela (eng. *minor allele frequencies, MAF*) varijante rs4149056:T>C u genu *SLCO1B1* u ispitivanoj grupi, srpskoj i evropskoj populaciji (izvor podataka za evropsku populaciju: baza podataka *1000 Genome Project*)

#### 4.2.3. Asocijacija kinetike metotreksata u fazi konsolidacije sa varijantom rs4149056:T>C u genu *SLCO1B1*

Podaci o nivoima MTX u plazmi tokom faze konsolidacije bili su dostupni za 41 ispitanika koji su lečeni M i HR protokolom.

Kinetika metotreksata praćena je standardizovanim biohemijskim metodama, 36h i 48h nakon primene svake od 4 doze. Dobijeni podaci su korišćeni za procenu profila eliminacije MTX (normalan ili nizak). Za svakog pacijenta, eliminacioni profil MTX korišćen je za određivanje broja epizoda usporene kinetike MTX (između 0 i 4). Broj epizoda usporene kinetike MTX korelisan je sa varijantom rs4149056:T>C u genu *SLCO1B1*. Rezultati dobijeni linearnom regresijom ne ukazuju na postojanje asocijacije između varijante rs4149056:T>C u genu *SLCO1B1* i broja epizoda usporene kinetike MTX ( $p=0.85$ ) (Slika 4.2.2.1).





Tabela 4.2.2.1 Ispitanici grupisani na osnovu intenziteta toksičnosti usled primene MTX u fazi konsolidacije

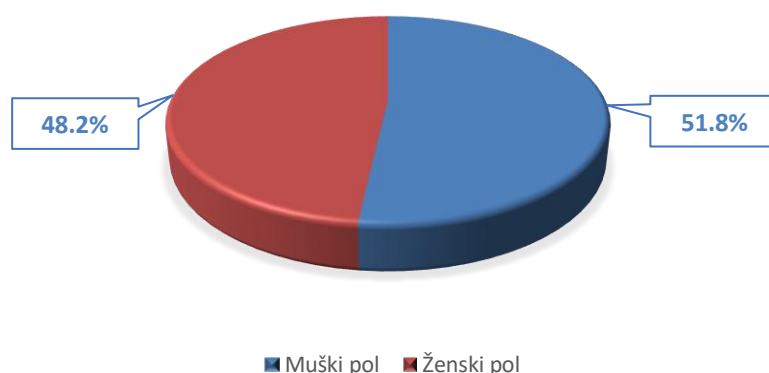
Tip toksičnosti	Niska toksičnost	Visoka toksičnost
Oralni mukozitis	109	12
Gastrointestinalna toksičnost	89	32
Hepatotoksičnost	114	7

Testovi asocijacije varijante rs4149056:T>C sa pojavom toksičnosti vršeni su logističkom regresijom, korišćenjem recesivnog genetičkog modela (referentnu grupu činili su referentni homozigoti i heterozigoti). Izvršene su korekcije za uzrast, pol i MTX doze. Primenjenim statističkim testovima nije bilo moguće proceniti asocijaciju ispitivane varijante sa pojavom hepatotoksičnosti i oralnog mukozitisa, dok rezultati analize asocijacije varijante rs4149056:T>C sa pojavom gastrointestinalne toksičnosti nisu dostigli statističku značajnost (OR= 1.65, 95%CI= 0.27-10.02, p=0.59).

### 4.3. Retrospektivna klinička studija odgovora na terapiju vinkristinom u srpskoj populaciji dece obolele od ALL

#### 4.3.1. Demografske i osnovne kliničke karakteristike ispitanika

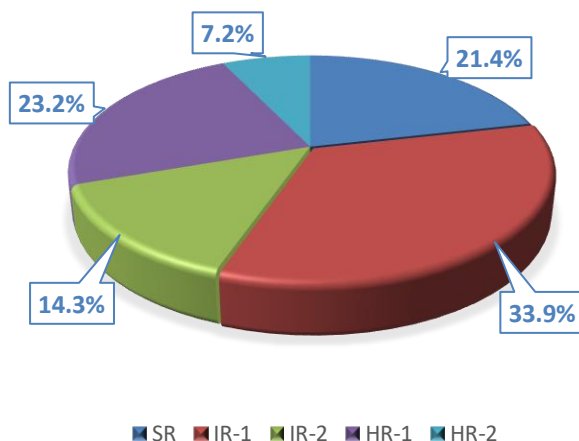
U studiju je bilo uključeno 56 dece obolele od ALL, od kojih je 29 (51.8%) bilo muškog, a 27 (48.2%) pola (slika 4.3.1.1). Medijana uzrasta ispitanika pri postavljanju dijagnoze bila je 5.3 godina, u rasponu od 0.7 do 17.9 godina. U ispitivanoj grupi 52 ispitanika (92.9%) obolela su od B-ćelijske ALL, dok je 4 (7.1%) ispitanika imalo T-ćelijski oblik ALL.



Slika 4.3.1.1 Udeo polova u ispitivanoj kohorti ispitanika

Na osnovu kriterijuma za stratifikaciju, 12 ispitanika (21.4%) je imalo standardarni rizik (SR) od relapsa. U grupu srednjeg rizika (IR) klasifikovano je 27 ispitanika (48.2%), od čega je 8 (14.3%) ispitanika lečeno pojačanom granom protokola (IR-2). Preostalih 17 ispitanika (30.4%)

svrstano je u grupu visokog rizika (HR), od koji je 4 (7.1%) ispitanika lečeno pojačanom granom protokola (HR-2) (Slika 4.3.1.2).



Slika 4.3.1.2 Stratifikacija ispitanika na osnovu rizika od relapsa. SR- standardni rizik; IR-1- srednji rizik, grana lečenja bez uvećanja; IR-2- srednji rizik, grana lečenja sa uvećanjem; HR-1- visoki rizik, grana lečenja bez uvećanja; HR-2- visoki rizik, grana lečenja sa uvećanjem

Tokom terapije, 10 ispitanika (17.86%) je razvilo VIPN. Većinu ispitanika sa VIPN-om činile su devojčice (70%). Među pacijentima koji su ispoljili VIPN medijana uzrasta prilikom postavljanja dijagnoze bila je 3.7 godina, u rasponu od 1 do 17.1 godina. Svi pacijenti koji su razvili simptome VIPN-a oboleli su od B- ćelijskog oblika ALL. Devet od deset ispitanika sa VIPN-om stratifikovano je u grupe srednjeg ili visokog rizika (IR-1=2, IR-2=3, HR-1=3, HR-2=1). Pregled karakteristika pacijenata sa i bez VIPN dat je u Tabeli 4.3.1.1.

Tabela 4.3.1.1. Osnovne demografske i kliničke karakteristike ispitanika sa i bez VIPN. SR- standardni rizik; IR-1- srednji rizik, grana lečenja bez uvećanja; IR-2- srednji rizik, grana lečenja sa uvećanjem; HR-1- visok rizik, grana lečenja bez uvećanja; HR-2- visok rizik, grana lečenja sa uvećanjem

	Ispitanici bez VIPN	Ispitanici sa VIPN	P vrednost <sup>1</sup>
<b>Uzrast (godine)</b>			0.913 <sup>2</sup>
<b>Medijana</b>	5.5	3.7	
<b>Raspon</b>	0.7-17.9	1.0-17.1	
<b>Pol (No/%)</b>			0.171 <sup>3</sup>
<b>Muški</b>	26 (56.5%)	3 (30%)	
<b>Ženski</b>	20 (43.5%)	7 (70%)	
<b>Imunofenotip (No(%))</b>			1 <sup>3</sup>
<b>B-ALL</b>	42 (91.3%)	10 (100%)	
<b>T-ALL</b>	4 (8.7%)	0 (0%)	
<b>Grupa rizika (No(%))</b>			0.346 <sup>3</sup>
<b>SR</b>	11 (23.9%)	1 (10%)	
<b>IR-1</b>	17 (37%)	2 (20%)	
<b>IR-2</b>	5 (10.9%)	3 (30%)	
<b>HR-1</b>	10 (21.7%)	3 (30%)	
<b>HR-2</b>	3 (6.5%)	1 (10%)	

<sup>1</sup> p-vrednost se odnosi na statističko testiranje razlika između grupe ispitanika sa i bez VIPN; <sup>2</sup> Logistička regresija; <sup>3</sup> Fišerov egzaktni test

Iako je uočen trend češće pojave VIPN kod ispitanika ženskog pola, nije pokazana statistička značajnost ove pojave (p= 0.171, Fišerov egzaktni test, OR=3.03) (Tabela 3.4.1.1.).

Uočen je i trend češće pojave VIPN kod pacijenata koji su primili više doza VCR tokom terapije. Broj ukupnih doza koje su ispitanici primili tokom terapije zavisio je od kategorije rizika i grane radomizacije u koju si bili svrstani (Tabela 3.4.1.2).

Tabela 4.3.1.2. Broj primljenih doza vinkristina tokom terapije prema kategorijama rizika od relapsa

Kategorija rizika	Broj VCR doza
SR (standardni rizik)	8
IR-1 (srednji rizik, bez uvećanja)	8
IR-2 (srednji rizik, sa uvećanjem)	12
HR-1 (visoki rizik, bez uvećanja)	12
HR-2 (visoki rizik, sa uvećanjem)	16

Ispitanici koji su primili više od 10 doza VCR tokom terapije imali su 3.6 puta veću šansu da razviju VIPN od ispitanika koji su primili manje od 10 doza. Ovaj trend takođe nije dostigao prag statističke značajnosti ( $p=0,092$ ; Fišerov egzaktni test,  $OR=0.363$ ) (Tabela 3.4.1.1.).

#### 4.3.2. Zastupljenost potencijalnih farmakogenetičkih varijanti u ispitivanoj grupi i evropskoj populaciji

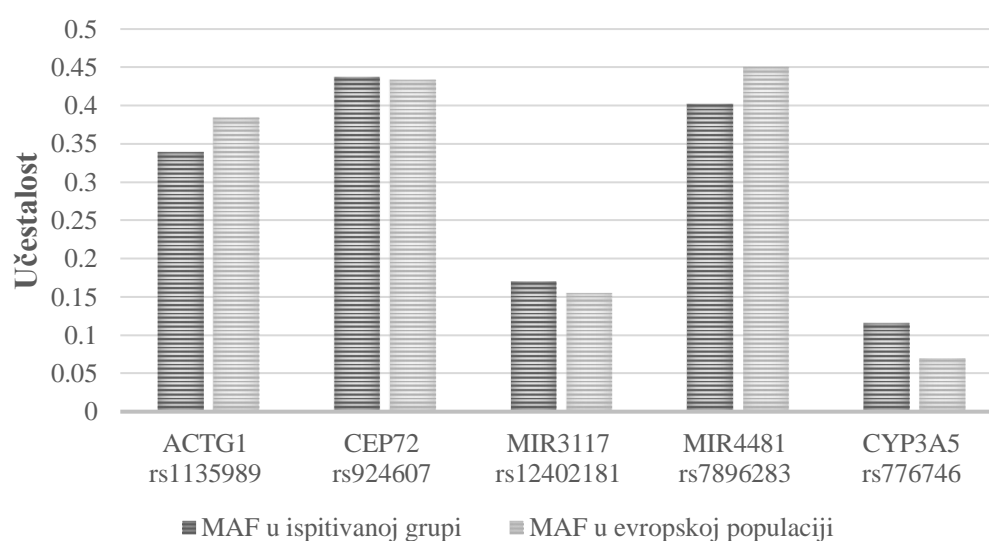
Genotipizacija svih ispitivanih varijanti izvršena je metodom Sangerovog sekvenciranja i dobijeni rezultati podvrgnuti su daljim testiranjima. Podaci o učestalosti ispitivanih varijanti u evropskoj populaciji dobijeni su iz baze podataka *gnomAD*.

Testiranje Hardi-Vajnbergove ravnoteže pokazalo je da su učestalosti genotipova svih ispitivanih varijanti uključenih u ovu studiju bile u ravnoteži (Tabela 4.3.2.1).

Tabela 4.3.2.1. Zastupljenost genotipova i Hardi-Vajnbergova ravnoteža istraživanih varijanti u ispitivanoj grupi

Gen	Varijanta	Genotip	N	Hardi-Vajnbergova ravnoteža
<i>ACTG1</i>	rs1135989:C>T	CC	25	0.768
		CT	24	
		TT	7	
<i>CEP72</i>	rs924607:C>T	CC	17	0.790
		CT	29	
		TT	10	
<i>MIR3117</i>	rs12402181:G>A	GG	38	1
		GA	17	
		AA	1	
<i>MIR4481</i>	rs7896283:T>C	TT	20	1
		TC	27	
		CC	9	
<i>CYP3A5</i>	rs776746:A>G	AA	0	1
		AG	13	
		GG	43	

Učestalosti analiziranih varijanti u ispitivanoj grupi i kontrolnoj grupi evropskog porekla prikazane su na slici 4.3.2.1.



Slika 4.3.2.1. Učestalosti manje zastupljenih alela istraživanih varijanti (*minor allele frequencies*, MAF) u ispitivanoj grupi i u evropskoj populaciji (izvor: *gnomAD* baza podataka)

### 4.3.3. Povezanost potencijalnih farmakogenetičkih markera sa razvojem VIPN

Sve ispitivane varijante podvrgnute su odgovarajućim statističkim analizama za utvrđivanje povezanosti sa razvojem VIPN.

Za svaku varijantu procenjivan je doprinos svakog dodatnog alternativnog alela u verovatnoći nastanka VIPN korišćenjem multiplikativnog genetičkog modela [131].

Univarijantne analize pokazale su da nijedna varijanta ne pokazuje statistički značajnu asocijaciju sa nastankom VIPN u ispitivanoj grupi. Primenom logističke regresije dobijene su sledeće p-vrednosti koje su povezane sa ispitivanim varijantama u genima *ACTG1*, *CEP72*, *MIR3117*, *MIR4481* i *CYP3A5*, redom: 0.917, 0.898, 0.788, 0.310 i 0.577 (Tabela 4.3.3.1).

Univarijantne i multivarijantne analize nisu pokazale statistički značajnu asocijaciju sa razvojem VIPN u ispitivanoj grupi ni posle korekcija za broj primljenih doza i pol (Tabela 4.3.3.1).

Tabela 4.3.3.1. Povezanost analiziranih varijanti sa razvojem VIPN u ispitivanoj grupi

Gen (varijanta)	Genotip	No (%)	Ispitanici bez VIPN	Ispitanici sa VIPN	P	P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>
<i>ACTG1</i> (rs1135989:C>T)	CC	25 (44.6%)	21 (45.7%)	4 (40%)	0.917	0.837	0.886
	CT	24 (42.9%)	19 (41.3%)	5 (50%)			
	TT	7 (12.5%)	6 (13%)	1 (10%)			
<i>CEP72</i> (rs924607:C>T)	CC	17 (30.4%)	14 (30.4%)	3 (30%)	0.898	0.909	0.791
	CT	29 (51.8%)	24 (52.2%)	5 (50%)			
	TT	10 (17.9%)	8 (17.4%)	2 (20%)			
<i>MIR3117</i> (rs12402181:G>A)	GG	38 (67.9%)	31 (67.4%)	7 (70%)	0.788	0.963	0.605
	GA	17 (30.4%)	14 (30.4%)	3 (30%)			
	AA	1 (1.8%)	1 (2.2%)	0 (0%)			
<i>MIR4481</i> (rs7896283:T>C)	TT	20 (35.7%)	15 (32.6%)	5 (50%)	0.310	0.188	0.500
	TC	27 (48.2%)	23 (50%)	4 (40%)			
	CC	9 (16.1%)	8 (17.4%)	1 (10%)			
<i>CYP3A5</i> (rs776746:A>G)	AA	0 (0.0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.577	0.702	0.360
	AG	13 (23.2%)	10 (21.8%)	3 (30%)			
	GG	43 (76.8%)	36 (78.2%)	7 (70%)			

<sup>1</sup> korigovano za broj VCR doza; <sup>2</sup> korigovano za pol

#### 4.4. Poligenski skor rizika u predikciji pojave hepatotoksičnosti usled primene metotreksata u fazi konsolidacije

Na osnovu vrednosti za količnik verovatnoće, preuzetih iz odgovarajućih metastudija, izračunate su vrednosti beta koeficijenata. Za varijantu rs1801133:C>T u genu *MTHFR* dobijena vrednost  $\beta$  koeficijenta bila je 0.15, a za varijantu rs4149056:T>C u genu *SLCO1B1* dobijena vrednost  $\beta$  koeficijenta je 0.33.

Tabela 4.4.1.  $\beta$  koeficijenti korišćeni u računanju poligenskog skora rizika za pojavu hepatotoksičnosti povezanu sa primenom visokih doza metotreksata u konsolidacionoj fazi terapije

Alel sa efektom*	<i>MTHFR</i> rs1801133:C>T	<i>SLCO1B1</i> rs4149056:T>C
OR**	1.35 [128]	1.94 [129]
$\beta$	0.15	0.33

\*Alel asociran sa pojavom hepatotoksičnosti usled primene visokih doza metotreksata u fazi konsolidacije

\*\*OR- vrednosti količnika verovatnoće, korišćeni za računanje  $\beta$  koeficijenata

Na osnovu ovih beta koeficijenata izračunat je poligenski skor rizika za sve ispitanike. U model logističke regresije uključeni su poligenski skor rizika i doza metotreksata u fazi konsolidacije (2 g/m<sup>2</sup> i 5 g/m<sup>2</sup>). Primenom logističke regresije pokazano je da su pacijenti koji su primili veću dozu imali 4.2 puta češću pojavu hepatotoksičnosti gradusa 2 ili više u odnosu na pacijente koji su primali manju dozu.

Poligenski skor rizika nije bio statistički značajno povezan sa razvojem hepatotoksičnosti (p=0.56).

# **5. Diskusija**



## 5.1. Farmakogenetičke varijante od značaja za terapiju tiopurinskim lekovima, metotreksatom i vinkristinom u dečjoj ALL

Unapređenjem protokola lečenja dečje ALL postignuta je visoka stopa preživljavanja obolelih, pogotovo u razvijenijim zemljama, i to je jedno od velikih dostignuća medicine u poslednjih nekoliko decenija. Fokus istraživanja u ovoj oblasti sada je usmeren ka povećanju efikasnosti same terapije, odnosno ka smanjenju broja i ozbiljnosti neželjenih efekata lekova koji se primenjuju u savremenim protokolima. Većina lekova koji se koriste u terapiji dečje ALL ima uzak terapijski indeks i veliku toksičnost. U poslednje vreme ulažu se ogromni naponi u otkrivanje prediktivnih genetičkih varijanti koje mogu da imaju važnu ulogu u farmakokinetici i farmakodinamici ovih lekova. Najbolji primer važnosti ovakvog pristupa je klinički usvojena primena farmakogenetičkih markera u genu *TPMT*, koji se rutinski koriste u prediktivnom testiranju prilikom propisivanja terapije tiopurinskim lekovima. Međutim, prijavljene su ozbiljne neželjene reakcije na tiopurinske lekove i kod pacijenata kod kojih nije detektovan nijedan od priznatih *TPMT* farmakogenetičkih markera. Zaista, veliki broj relevantnih gena čiji proteinski produkti učestvuju u metabolizmu tiopurinskih lekova, a čije bi varijante mogle da imaju klinički značaj i njihovo poznavanje moglo da ima veliki značaj u individualizaciji terapije, trenutno su u fokusu istraživanja.

U Srbiji su farmakogenetička istraživanja dečje ALL otpočela studijom Domanović i saradnika iz 2006. godine [132]. U ovoj studiji ispitivani su učestalost i tipovi varijanti u genu *TPMT* u populaciji Srbije i Crne Gore, kao i asocijacija identifikovanih varijanti sa brojem neutropenijskih epizoda do kojih dolazi usled primene 6-merkaptopurina u lečenju dece obolele od ALL. Učestalost i tipovi varijanti u genu *TPMT* u ovoj studiji asociirani su i sa dužinom trajanja terapije. Rezultati studije, koja je uključivala i retrospektivni i prospektivni pristup, pokazali su da među obolelima od dečje ALL čak i heterozigotni nosioci alela *TPMT\*2*, *TPMT\*3A* i *TPMT\*3B* imaju povećan rizik od pojave neutropenija izazvanih primenom tiopurinskih lekova. Dodatno, pokazano je da modifikovanje doze tiopurinskih lekova na osnovu *TPMT* genotipa pre uvođenja samog leka omogućuje i heterozigotnim nosiocima varijantnih *TPMT* alela da terapiju završe bez pojave neutropenija indukovanih tiopurinima, u punom vremenskom trajanju i bez modifikacije doze drugih lekova koji se u terapijskom protokolu primenjuju (konkretno, bez modifikacije doze leka metotreksata). Na kraju, heterozigotni nosioci *TPMT* alela kod kojih je doza tiopurinskih lekova modifikovana na početku terapije održavanja su uz neprekidan nadzor lekara mogli postepeno da povećavaju dozu merkaptopurina i da na kraju terapije dostignu punu dozu ovih lekova bez pojave neželjenih efekata. Time je dokazana opravdanost uvođenja farmakogenetičkog testiranja za ove varijante u srpskoj populaciji i od objavljivanja ovih rezultata farmakogenetičko *TPMT* testiranje se rutinski koristi u kliničkoj praksi prilikom propisivanja tiopurinske terapije za lečenje dece sa ALL u Srbiji.

Primećeno je da deca sa ALL koja nisu nosioci *TPMT* varijantnih alela mogu da ispoljavaju neželjene efekte usled primene tiopurinskih lekova. Potraga za novim farmakogenetičkim markerima je najpre bila fokusirana na promotor gena za *TPMT*, koji nema arhitekturu tipičnog eukariotskog promotora i sadrži varijabilni broj tandemskih ponovaka (eng. *variable number tandem repeats*, *VNTR*). Početna analiza korelacije broja *VNTR* u okviru promotora gena *TPMT* kod obolelih sa pojavom neželjenih efekata usled primene tiopurinskih lekova nije pokazala značajnost [133]. Studija Zukić i saradnika je ukazala je na to da i broj i vrsta *VNTR* ponovaka, odnosno *VNTR* arhitektura, kao i ushodni regulatorni region promotora, određuju nivo ekspresije *TPMT* gena i samim tim utiču na aktivnost *TPMT* enzima, pa arhitektura *VNTR* može biti novi potencijalni marker toksičnosti tiopurinskih lekova [134]. Dalje su Kotur i saradnici pokazali da

VNTR arhitektura promotora gena *TPMT* potencijalno može biti korišćena kao farmakogenetički marker u predikciji toksičnosti do koje dolazi usled primene tiopurinskih lekova kod dece obolele od ALL [135]. Ispitivanje ekspresije *TPMT* gena na početku bolesti i u toku terapije održavanja kod dece obolele od ALL je pokazalo povećanu ekspresiju ovog gena tokom faze održavanja, koja je zavisila od arhitekture VNTR regiona promotora. Ovi rezultati mogu objasniti zašto su pune doze tiopurinskih lekova mogle biti davane deci sa ALL, heterozigotnim nosiocima *TPMT* varijanti zbog kojih je doza tiopurinskih lekova inicijalno morala biti modifikovana u skladu sa *TPMT* genotipom da bi se izbegle neželjene reakcije, i idu u prilog hipotezi da bi VNTR region *TPMT* gena mogao biti potencijalni farmakogenetički marker prilikom uvođenja terapije tiopurinima [136]. Milošević i saradnici su dalje, pored *TPMT* gena, ispitivali ulogu varijanti u genima *ITPA*, *ABCC4* i *ABCB1* u nastanku neželjenih efekata uzrokovanih tiopurinskim lekovima u fazi održavanja lečenja dece sa ALL u Srbiji [35]. Nije pokazana veza između varijanti u genima *ITPA* i *ABCC4* i toksičnosti do kojih dolazi upotrebom tiopurina tokom terapije održavanja, ali je ukazano na vezu između varijantog alela gena *ABCB1* i češće pojave hepatotoksičnosti kod dece obolele od ALL lečene tiopurinima u fazi održavanja. Nova studija koja je za cilj imala određivanje uticaja varijanti u genima *TYMS*, *MTHFR*, *SLC19A1* i *DHFR* na pojavu toksičnosti usled primene tiopurina u fazi održavanja terapije dece obolele od ALL pokazala je da varijante u genima *TYMS*, *SLC19A1* i *DHFR* mogu biti korišćene kao potencijalni farmakogenetički markeri prilikom individualizacije tiopurinske terapije [137].

Osim farmakogenetičkih istraživanja koja su proučavala potencijalne markere toksičnosti tiopurinskih lekova, rađena su farmakogenetička istraživanja primene metotreksata i glukokortikoidnih lekova u terapiji dečje ALL u Srbiji.

Lazić i saradnici su proučavali dve varijante u genu *MTHFR* (c.677C>T i c.1298A>C) kao potencijalne farmakogenetičke markere toksičnosti metotreksata i prediktore relapsa [80]. Rezultati ove studije pokazali su da prisustvo *MTHFR* c.677TT genotipa može biti asocirano sa manjom toksičnošću usled primene metotreksata tokom faze intenzifikacije u lečenju dece obolele od ALL. Međutim, ni c.677C>T ni c.1298A>C varijanta u genu *MTHFR* nije bila povezana sa povećanim brojem smrti usled toksičnosti terapije metotreksatom ili pojavom relapsa.

Gašić i saradnici ispitivali su farmakogenetičke markere odgovora na terapiju glukokortikoidnim lekovima u inicijalnoj fazi indukcije remisije kod dece obolele od ALL [138]. Naime, cilj ovog istraživanja bio je izučavanje varijanti u genima *NR3C1*, *GSTP1* i *ABCB1* koje bi mogle biti korišćene u poboljšanju odgovora na terapiju glukokortikoidima. Rezultati su pokazali da varijante rs6198 u genu *NR3C1* i haplotip rs1695-rs1138272 gena *GSTP1* pokazuju najviše potencijala kao farmakogenetički markeri odgovora na terapiju glukokortikoidima kod obolelih od dečje ALL.

Prvu studiju koja se bavila farmakotranskriptomskim markerima u dečjoj ALL sprovedli su Gašić i saradnici 2019. godine [139]. Ova studija proučavala je ekspresiju duge nekodirajuće RNK *GAS5*, za koju je prethodno pokazano da interaguje sa glukokortikoidnim receptorom, kao i da njena ekspresija može biti izmenjena u kancerima usled uloge koju ima u apoptozi i supresiji rasta ćelije. Rezultati su ukazali na to da bi nivo ekspresije *GAS5* mogao biti marker odgovora na terapiju glukokortikoidnim lekovima u fazi indukcije terapije obolelih od dečje ALL.

Ova studija je nastavak farmakogenetičkih ispitivanja dečje ALL u Srbiji. U okviru ove studije kod ispitanika obolelih od dečje ALL istraživane su potencijalne varijante u farmakogenima koji kodiraju važne enzime, transportere, targete ili regulatore dejstva tiopurinskih lekova, metotreksata i vinkristina. Cilj studije je bio otkrivanje asocijacija između ispitivanih varijanti i odgovora na terapiju ovim lekovima, kako bi se ustanovio njihov potencijal za uvođenje u kliničku praksu.

### 5.1.1. Farmakogenetički potencijal varijanti u genu *NUDT15*

Pored klinički dokazane važnosti farmakogenetičkih markera u genu *TPMT*, ustanovljeno je da i funkcionalne varijante u genu *NUDT15* mogu da dovedu do pojave ozbiljne mijelosupresije tokom terapije tiopurinskim lekovima. Varijante u *NUDT15* genu značajne za tiopurinsku terapiju posebno su česte u azijskim populacijama. Iako su varijante u ovom genu u populacijama evropskog porekla retke, značaj proučavanja *NUDT15* gena i u ovim populacijama je ogroman [61]. Nažalost, veoma malo studija se bavilo izučavanjem potencijalnih farmakovarijanti u *NUDT15* genu u evropskim populacijama. Zbog toga je izvedena pilot studija, kojom je izvršen skrining kodirajućih i okolnih regiona *NUDT15* gena u grupi ispitanika obolelih od dečje ALL u Srbiji, sa ciljem da se potencijalno otkrivene varijante dovedu u vezu sa pojavom tiopurinske toksičnosti.

Rezultati genotipizacije pokazali su da u ispitivanoj grupi ni jedan ispitanik nije nosilac nijedne prethodno opisane funkcionalne varijante u ovom genu. Šta više, od detektovanih 5 varijanti, samo jedna je locirana u kodirajućem regionu gena *NUDT15* (rs61746486, p.Pro12, u egzonu 1). Ova varijanta je sinonimna i prema predikcijama bioinformatičkim alatom *Ensembl Variant Effect Predictor* nema patogen efekat, koji bi doveo do poremećaja u funkcionisanju enzima *NUDT15*. Prisustvo ove varijante detektovano je i u prethodno sprovedenoj studiji koja se bavila uticajem varijacija u genu *NUDT15* na razvoj tiopurinske toksičnosti kod pacijenata evropskog porekla [61].

Ostale 4 detektovane varijante nalaze se u nekodirajućim regionima gena *NUDT15* i bioinformatičke predikcije alatom *Ensembl Variant Effect Predictor* pokazuju da ni one nemaju funkcionalni značaj. U literaturi nisu opisani efekti tri *NUDT15* varijante detektovane u ovoj studiji, a koje se nalaze u intronskim regionima (rs79687000, rs45465203, rs41284205). Varijanta koja je u ovoj studiji detektovana u 3'-nekodirajućem regionu (rs61973267, c.\*7G>A), takođe je prethodno detektovana [61].

Sve detektovane varijante prethodno su opisane u genomskim bazama podataka (*1000 Genome Project*, *GnomAD*). Učestalosti manje zastupljenih alela svih detektovanih varijanti u grupi ispitanika obolelih od dečje ALL u Srbiji odgovaraju učestalostima u evropskoj populaciji (slika 4.1.2.1).

Iako ovom studijom nisu otkrivene funkcionalne varijante u genu *NUDT15*, dobijeni rezultati su značajni, budući da su podaci dobijeni u okviru ove prvi podaci o učestalosti varijanti u genu *NUDT15* kod dece obolele od ALL u Srbiji. Sprovedena pilot studija je bila malog obima, a varijante od funkcionalnog značaja u ovom genu su veoma retke za evropsku populaciju [61]. Uzimajući u obzir da, bez obzira na malu učestalost, varijante u ovom genu mogu imati veliki klinički značaj, kao i da CPIC propisuje preporuke na osnovu prisustva funkcionalnih varijanti u genu *NUDT15* [60], potrebno je sprovesti dalja i opsežnija istraživanja. Uključivanje većeg broja ispitanika u studiju, kao i primena sveobuhvatnijih tehnika genotipizacije bi potencijalno otkrilo nove ili prethodno opisane varijante u ovom genu i u populaciji dece obolele od ALL u Srbiji.

### 5.1.2. Farmakogenetički potencijal varijante rs4149056 u genu *SLCO1B1*

Metotreksat je jedini lek koji se prema BFM protokolu za lečenje dečje ALL koristi u svim fazama terapije. U fazi konsolidacije se primenjuje u visokim dozama, zbog čega su oboleli u povećanoj opasnosti da razviju neki od neželjenih efekata primene ovog leka. Budući da je metotreksat antagonist folata, poremećaji u funkciji bilo kog enzima ili transportera uključenih u metabolički put folata mogu uticati na efikasnost i pojavu toksičnosti usled primene ovog leka [66]. Farmakogenetička istraživanja odgovora na terapiju metotreksatom u dečjoj ALL su zato posebno

važna. Među najbolje proučenim farmakogenima koji se dovode u vezu sa odgovorom na terapiju metotreksatom su varijante u genima *DHFR*, *TYMS*, *MTHFR*, *SLC19A1* [78,140–142]. Ipak, i pored velikog broja istraživanja u ovoj oblasti nije identifikovan farmakogenetički marker koji bi mogao da se rutinski koristi u kliničkoj praksi u cilju individualizacije terapije ovim lekom. Gen *SLCO1B1* je u poslednje vreme u fokusu farmakogenetičkih istraživanja odgovora na terapiju metotreksatom, budući da je proteinski produkt ovog gena transporter leka metotreksata eksprimiran u hepatocitima i odgovoran za preuzimanje metotreksata iz krvi.

U okviru ove studije ispitivana je varijanta rs4149056 u genu *SLCO1B1*, kao potencijalni farmakogenetički marker usporene eliminacije metotreksata i pojave toksičnosti usled primene visokih doza ovog leka u fazi konsolidacije. Prisustvo varijantnog alela dovodi do zamene valina alaninom na poziciji 174 u proteinu, što može dovesti do smanjene eliminacije metotreksata [143] i generalnog povećanja rizika od pojave toksičnosti usled primene visokih doza ovog leka [144].

Rezultati genotipizacije sprovedene u ovoj studiji pokazuju da alelska učestalost i učestalosti genotipova varijante rs4149056 u genu *SLCO1B1* u ispitivanoj grupi u srpskoj populaciji ne odstupaju od odgovarajućih učestalosti u evropskoj populaciji (u ispitivanoj grupi je 15.5%, u srpskoj populaciji je 13.4%, a u evropskoj populaciji je 16.1%), tako da se populaciona specifičnost ispitivane genske varijante može isključiti pri interpretaciji rezultata.

Rezultati dobijeni ovom studijom ne ukazuju na postojanje asocijacije varijante rs4149056 gena *SLCO1B1* gena i kinetike metotreksata u fazi konsolidacije. Takođe, nije utvrđena ni veza između prisustva ove varijante i pojave oralnog mukozitisa, gastrointestinalane toksičnosti i hepatotoksičnosti kod ispitanika uključenih u ovo istraživanje. Iako je u više studija pokazano da rs4149056 *SLCO1B1* funkcionalna varijanta može imati uticaja na smanjenu eliminaciju metotreksata i pojavu toksičnosti [144–146], u drugim studijama ova zavisnost nije potvrđena [79,147,148]. Ramzi i saradnici pokazali su da sve retke i učestale varijante u genu *SLCO1B1* koje su ispitivali mogu da objasne 10.7% varijabilnosti u eliminaciji metotreksata [145]. Ovakvi različiti rezultati među studijama potencijalno ukazuju na važnost drugih genetičkih i negenetičkih faktora u odgovoru na terapiju visokim dozama metotreksata u fazi konsolidacije. Potencijalno su važni i epigenetički faktori, razlike u regulatornim miRNK, posttranslacionim modifikacijama, kao i drugi klinički i sredinski faktori, poput razlika u terapijskim protokolima, načinima procene toksičnosti metotreksata i homogenosti ispitivanih populacija.

### 5.1.3. Potencijalni farmakogenetički markeri nastanka vinkristinom indukovane periferne neuropatije

Za razliku od tiopurinskih lekova i metotreksata, vinkristin je tek od nedavno predmet farmakogenetičkih studija i postoji relativno malo saznanja o potencijalnim farmakogenetičkim markerima odgovora na terapiju ovim lekom. Najvažniji neželjeni efekti vezani su za pojavu neurotoksičnosti, pre svega vinkristinom indukovane periferne neuropatije (VIPN). VIPN je relativno česta pojava u terapiji dece obolele od ALL, koja varira po intenzitetu i trajanju, ostavlja potencijalno ireverzibilne posledice u senzornim, motoričkim i autonomnim funkcijama pacijenata. Takođe, teški oblici VIPN do kojih dolazi u toku terapije mogu dovesti do potpunog obustavljanja lečenja obolelog, što povećava rizik od relapsa i smrtnog ishoda primarne bolesti [149].

U okviru ove studije procenjivan je farmakogenetički potencijal varijanti u 5 gena uključenih u različite aspekte farmakokinetike i farmakodinamike vinkristina. Analize sprovedene u ovom istraživanju nisu pokazale asocijaciju nijedne od ispitivanih varijanti sa pojavom VIPN kod dece obolele od ALL u Srbiji.

Proteinski produkt gena *CYP3A5* je glavni enzim odgovoran za metabolizam i inaktivaciju vinkristina u hepatocitima [150], Osim njega, u metabolizam vinkristina u hepatocitima može biti uključen i enzim *CYP3A4*, koji je 9-14 puta manje efikasan u metabolizmu vinkristina od *CYP3A5*

[151]. Ispitivana varijanta rs776746 gena *CYP3A5* uvodi skriveno mesto iskrajanja u intronu 3, što rezultuje sintezom neaktivnog proteinskog produkta [152]. Učestalost ove varijante najveća je u evropskim, a najređa u afričkim populacijama. Zanimljivo je da i nivo ekspresije proteinskog produkta gena *CYP3A5* oslikava ovu populacionu distribuciju [153]. Takođe, u studiji koju su sprovedeli Renbarger i saradnici pokazano je da se, među obolelima od dečje ALL, neurotoksičnosti do kojih dolazi usled primene vinkristina znatno češće uočavaju kod dece evropskog porekla (34.8%) nego kod dece afričkog porekla (4.8%) [154]. Egbelakin i saradnici su potom u studiji koja je uključivala ispitanike pretežno evropskog porekla (105 ispitanika bilo je evropskog porekla, 1 azijskog, 1 afričkog porekla), od kojih su 88% bili homozigotni nosioci za varijantni rs776746 alel, pokazali da je ova varijanta od značaja za razvoj VIPN [150]. Takođe, u maloj studiji sprovedenoj 2016. godine [155] pokazano je da među ispitanicima obolelim od dečje ALL postoji veći procenat obolelih evropskog porekla (80.6%) koji pokazuju simptome VIPN u odnosu na obolele afričkog porekla (76.5%). U istoj studiji pokazano je da nosioci varijantnog rs776746 alela češće imaju simptome VIPN, iako ovi rezultati nisu dostigli statističku značajnost. Međutim, Aplenc i saradnici pokazali su da rs776746 varijanta može imati protektivni efekat na razvoj VIPN kod dece obolele od ALL koja su lečena vinkristinom [156]. U studiji sprovedenoj 2010. godine Hartman i saradnici pokazali su da varijanta rs776746 ne može biti asociirana sa motoričkim perifernim neuropatijama do kojih dolazi usled primene vinkristina kod dece obolele od ALL [157]. Studija koju su sprovedeli Gulhamu i saradnici koja je uključivala ispitanike obolele od više različitih solidnih tumora, lečenih vinkristinom, nije pokazala vezu između ove varijante i razvoja VIPN [158]. Među studijama koje nisu uspele da pronađu asocijaciju između nastanka VIPN i varijante rs776746 nalazi se i studija Mura i saradnika. Ovaj istraživački tim takođe nije pronašao značajnu asocijaciju između *CYP3A5* genotipa i farmakokinetike vinkristina [159]. Ni istraživanje Cepija i saradnika nije pokazalo statistički značajnu asocijaciju između ove varijante i pojave neurotoksičnosti kod dece obolele od ALL [96]. Eksperimentalno dobijeni rezultati istraživanja sprovedenih u okviru izrade ove teze takođe ne ukazuju na značaj ove varijante u nastanku VIPN kod dece obolele od ALL koja su lečena vinkristinom.

Geni *ACTG1* i *CEP72* važni su za održavanje integriteta citoskeleta, ali nisu direktni targeti vinkristina.

Proteinski produkt gena *CEP72* je centrozomalni protein koji ima važnu funkciju u organizaciji mikrotubula. Poremećaji u komponentama i procesima koji dovode do obrazovanja centrozoma mogu dovesti do nepravilnog obrazovanja deobnog vretena [160]. Molekularni modeli pokazali su da prisustvo ispitivane varijante rs924607 obrazuje mesto vezivanja za transkripcioni represor NKX-6.3, što potencijalno dovodi do smanjenja ekspresije ovog proteina [91]. Analize promene mobilnosti u elektroforezi (eng. *electrophoretic mobility shift analysis*) potkrepljuju molekularne modele i predikcije o smanjenju ekspresije ovog proteina usled prisustva varijantnog alela u promotoru. Kao posledica toga mikrotubule, za koje vinkristin i inače ima veliki afinitet, bivaju podložnije depolimerizaciji. Ova varijanta jeste najozbiljniji kandidat predikcije pojave VIPN kod dece obolele od ALL, budući da je najčešće bila predmet farmakogenetičkih istraživanja pojave VIPN, ali i dalje ne postoji konzistentnost u rezultatima između različitih studija. Diouf i saradnici su 2015. godine sprovedeli preliminarnu GWA studiju u kojoj su prvi pokazali da varijanta rs924607 u genu *CEP72* može biti povezana sa povećanim rizikom od nastanka, kao i većim intenzitetom VIPN kod dece obolele od ALL [91]. Stok i saradnici su potom pokazali da ova varijanta može biti povezana sa nastankom VIPN i kod odraslih obolelih od ALL [92]. U metastudiji koja je uključivala više od 500 ispitanika, Rajt i saradnici potvrdili su vezu između varijante rs924607 u genu *CEP72* i nastanka VIPN [161]. Međutim, postoje i studije koje nisu potvrdile ove opservacije. Gutjerez-Kamino i saradnici nisu uspeli da utvrde postojanje veze između ove varijante i nastanka VIPN u ranoj fazi lečenja dece obolele od ALL, tokom koje je vinkristin najvažniji terapeutik koji se koristi [93]. Slično zapažanje uočili su i Zgajb i saradnici u studiji koja je uključivala decu arapskog porekla, lečenu od ALL [162]. Rezultati ove studije ne

potkrepljuju hipotezu da varijanta rs924607 u genu *CEP72* može biti prediktivni marker razvoja VIPN kod dece obolele od ALL koja su lečena vinkristinom. Važno je uočiti da među studijama postoje razlike u kriterijumima korišćenim za procenu VIPN, kao i u krajnjim tačkama u kojima su vršene analize asocijacije, što pored razlika u populacionim specifičnostima ispitanika uključenih u ove studije, može predstavljati uzrok razlika u dobijenim rezultatima. Trenutno je u toku klinička studija u okviru koje se sprovodi randomizovano ispitivanje zavisnosti incidence i intenziteta VIPN kod obolelih od dečje ALL koji su nosioci varijantnog rs924607 alela, od primenjene doze vinkristina [163].

Proteinski produkt gena *ACTG1* je  $\gamma$ -aktin, citoskeletni protein koji je u direktnim interakcijama sa mikrotubulama i važan za održanje citoskeleta. Pokazano je da različite forme ovog proteina mogu uticati na slabljenje interakcija sa mikrotubulama i na taj način, kroz destabilizaciju citoskeleta, čine ćeliju osetljivijom na dejstvo vinkristina i ostalih antimitotika [95]. Ispitivana varijanta rs1135989 u genu *ACTG1* potencijalno utiče na regulatorne sekvence splajsovanja egzona, ali funkcionalna važnost ove varijante nije poznata [96]. Pokazano je da ova varijanta može biti asocirana sa nastankom težih oblika VIPN, kao i podnošenjem nižih doza vinkristina kod dece obolele od ALL [96]. Ovom studijom nije pokazana veza između varijante rs1135989 u genu *ACTG1* i nastanka VIPN kod dece obolele od ALL koja su lečena vinkristinom.

Kao što je poznato, miRNK su male nekodirajuće RNK koje imaju funkciju u utišavanju ekspresije gena na posttranskripcionom nivou. Genetičke varijacije u miRNK mogu uticati na nivo njihove funkcije. Varijante u genima za miRNK koje su ispitivane u okviru ove studije su od regulatornog značaja. Naime, studija sprovedena u španskoj populaciji pokazala je da varijanta rs12402181 u genu *MIR3117* smanjuje verovatnoću pojave VIPN [108]. Protektivni efekat ove varijante zasnovan je na smanjenju tačnosti prepoznavanja targeta ove miRNK, među kojima su i transporteri RALBP1 i ABCC1. Ranije studije pokazale su da su ovi transporteri odgovorni za efluks vinkristina [164,165]. Usled slabijeg prepoznavanja informacione RNK ovih transportera dolazi do veće ekspresije ovih proteina, što povećava efluks vinkristina iz aksona i smanjuje njegovo vezivanje za mikrotubule i štetne efekte do kojih zbog toga dolazi [108]. S druge strane, ista studija ukazala je na to da varijanta rs7896283 u genu *MIR4481* potencijalno ometa procese regeneracije perifernih nerava, koji su od velike važnosti u oporavku od VIPN [108]. Predloženi efekat ove varijante ostvaruje se putem povećanja stabilnosti pre-miRNK, što može pojačati efekat zrele miRNK [109]. Povećana stabilnost zrele *miR-448* vodila bi smanjenoj ekspresiji ciljnih gena. Niska ekspresija gena uključenih u procese regeneracije perifernih neurona može biti razlog zbog koga dolazi do povećane incidence VIPN, asocirane sa varijantom rs7896283. Rezultati ove studije, međutim, nisu pokazali asocijaciju između varijanti rs12402181 u genu *MIR3117* i rs7896283 u genu *MIR4481* sa nastankom VIPN kod dece obolele od ALL koja su lečena vinkristinom.

Ova studija ukazuje na značaj daljih farmakogenetičkih istraživanja pojave VIPN kod dece obolele od ALL. Mali broj ispitanika u našoj studiji su tokom terapije razvili VIPN, zbog čega je statistička snaga studije relativno mala. Međutim, studija ukazuje i na fundamentalne izazove proučavanja farmakogenetike VIPN kod dece obolele od ALL. Budući da se VIPN manifestuje tegobama neurološke prirode, postoji realna opasnost da veliki broj obolelih, s obzirom na to da su u pitanju uglavnom deca ranog pedijatrijskog uzrasta, nije u mogućnosti da prepozna, prijavi i opiše simptome nadležnim lekarima [5]. Razvoj metoda koje bi objektivnije procenjivale pojavu i gradus VIPN kod dece obolele od ALL značajno bi unapredio pouzdanost dobijenih rezultata. Takođe, na interpretaciju rezultata između različitih studija utiču i različiti terapijski režimi koji se u studijama primenjuju, a koji podrazumevaju različiti broj doza i dužinu trajanja terapije vinkristinom, kao i različite vremenske tačke u kojima se vrši evaluacija pojave VIPN kod obolelih. Osim toga, moguće je i postojanje dodatnih, populaciono specifičnih varijanti od značaja za pojavu VIPN.

Pomenuti izazovi mogli bi biti prevaziđeni sprovođenjem opsežnijih genomskih ispitivanja, na većim, bolje okarakterisanim i raznovrsnijim kohortama ispitanika.

## 5.2. Nivo ekspresije gena *NUDT15* u trenutku postavljanja dijagnoze kao farmakotranskriptomski marker

Farmakogenetička istraživanja do sada su neosporno pokazala da određeni markeri odgovora na terapiju mogu rutinski da se koriste u kliničkoj praksi. Ostale farmako-omike su nove nauke koje se brzo razvijaju i sa puno potencijala da u narednim godinama daju veliki doprinos u poboljšanju strategija lečenja.

Farmakotranskriptomika je nauka koja se bavi povezivanjem varijanti u transkriptomu sa farmakološkim profilom primenjenog leka. Analogno farmakogenetici, farmakotranskriptomika teži personalizaciji terapije na osnovu interindividualnih razlika u varijantama na nivou RNK. Farmakotranskriptomski markeri su izuzetno varijabilni, budući da su rezultat ne samo prisustva ili odsustva ekspresije, nego i različitih nivoa ekspresije gena [166].

Farmakotranskriptomika istraživanja u dečjoj ALL do sada nisu bila brojna. Od značaja je pomenuti istraživanje farmakogenetičkog potencijala duge nekodirajuće RNK (eng. *long noncoding RNA*) *GAS5*, za koju je pokazana veza između nivoa ekspresije ovog gena i lošeg odgovora na terapiju glukokortikoidima koji se primenjuju u fazi indukcije [139].

*NUDT15* je važan enzim u metaboličkom putu tiopurina i predstavlja negativan regulator toksičnosti do kojih može doći usled primene ovih lekova [167]. Važnost funkcionalnih varijanti u genu *NUDT15* je prepoznata [60], ali do sada nisu rađena farmakotranskriptomika istraživanja koja bi se bavila povezivanjem ekspresije ovog gena i odgovora na terapiju tiopurinima u dečjoj ALL. Međutim, nedavno je sprovedeno istraživanje Jošide i saradnika koje ukazuje na to da niska ekspresija proteina *NUDT15* može biti biohemijska osnova razvoja netolerancije na tiopurinske lekove. Ista studija pokazala je i da je nivo proteinskog produkta ovog gena u korelaciji sa *NUDT15* genotipom [168].

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je ispitati postojanje veze između ekspresije gena *NUDT15* pri postavljanju dijagnoze i surogat markera toksičnosti primene tiopurina u terapiji održavanja. Kao surogat markeri korišćeni su broj leukopenijskih epizoda, procenat nedelja koje su ispitanici provodili bez terapije tiopurinima, procenat nedelja tokom kojih su ispitanici primali smanjene doze 6-MP, i prosečne doze 6-MP u fazi održavanja. Dobijeni rezultati ne podržavaju pretpostavku da nivo ekspresije gena *NUDT15* prilikom postavljanja dijagnoze, odnosno pre početka lečenja bolesti, može biti korišćen kao farmakotranskripcioni marker. Ovakav rezultat je potencijalno posledica postojanja velikog broja nezrelih blasta u perifernoj krvi i koštanoj srži. Naime, maligno transformisane ćelije su nestabilne i postoji mogućnost da deo varijacija u ekspresiji ovog gena potiče od deregulisane ekspresije gena u malignim ćelijama. Od značaja mogu biti razlike u ekspresiji kako samog gena *NUDT15*, tako i potencijalnih regulatora njegove ekspresije. Takođe, studija je izvedena na relativno malom broju ispitanika, zbog čega statistički testovi koji su primenjeni nemaju veliku snagu. Pošto se tiopurinski lekovi ne primenjuju u značajnoj meri pre terapije održavanja, u budućnosti bi trebalo sprovesti opsežniju prospektivnu studiju u kojoj bi nivo ekspresije gena *NUDT15* bio meren nakon uvođenja bolesnika u remisiju, a pre početka faze održavanja.

### 5.3. Poligeniski skor rizika u modelovanju predikcije hepatotoksičnosti usled primene visokih doza metotreksata u fazi konsolidacije

Unapređenje lečenja dece sa ALL ne mora nužno da se ograniči potragom za jednim jedinstvenim farmakogenetičkim markerom odgovora na terapiju određenim lekom, ili više njih. S obzirom na broj lekova koji se u terapiji koriste, kompleksnost njihovog metabolizma, broj gena koji bi potencijalno mogli biti uključeni u farmakogenetički odgovor, još uvek nedefinisane negenetičke i epidemiološke faktore koji bi takođe mogli biti značajni, ideja je da se u potragu za prediktivnim markerima uključe i napredni statistički alati zasnovani na veštačkoj inteligenciji i mašinskom/dubokom učenju. Tako bismo mogli da identifikujemo kombinacije genetičkih i/ili negenetičkih faktora koji sami po sebi ne bi morali da imaju prediktivni značaj, ali udruženi u tačno određenoj kombinaciji bi mogli da nam pomognu da predvidimo odgovor na terapiju određenim lekom.

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je i konstruisanje prediktivnih modela za odgovor na terapiju tiopurinskim lekovima, metotreksatom i vinkristinom kod dece obolele od ALL. Izbor prediktivnog modela bio je uslovljen rezultatima dobijenim u eksperimentima sprovedenim u okviru studije. Zbog malog broja ulaznih varijabli za konstruisanje modela mašinskog učenja i nedostupnosti podataka iz drugih studija, odnosno nemogućnosti korišćenja podataka iz meta-analiza, izbor prediktivnog modela za ekperimentalne podatke dobijene ovom studijom je poligeniski skor rizika (PRS). PRS-ovi predstavljaju složen genomski biomarker i potencijalne primene PRS-a u kliničkoj praksi obuhvataju predviđanje rizika za razvoj bolesti, ranu dijagnozu, prognozu i odabir lekova radi poboljšanja efikasnosti ili smanjenja neželjenih reakcija na lekove. Ipak, nijedan PRS još uvek nije usvojen u rutinskoj kliničkoj praksi. Osim tehničkih razmatranja razvoja PRS, glavni izazovi sa kojima se PRS suočavaju uključuju dokazivanje kliničke korisnosti i okolnosti koje prate uvođenje novih genomskih tehnologija u zdravstvene sisteme [169].

PRS je način modelovanja koji u predikcije uključuje više varijanti u istom ili više različitih gena, pri čemu se sve varijante boduju prema efektu koji imaju na razvoj određenog fenotipa. PRS modeli su zasnovani na statističkim podacima izvedenim iz adekvatnih GWAS ili metastudija. Budući da je odgovor na terapiju nekim lekom vrlo verovatno pod uticajem većeg broja genetičkih varijanti, PRS je odnedavno počeo da nalazi primenu i u farmakogenetičkim istraživanjima i u zavisnosti od cilja modelovanja, kao i od obima i tipa podataka u studiji, primenjuju se različiti načini PRS modelovanja [170,171]

Budući da sekvenciranjem kodirajućih i okolnih regiona gena *NUDT15* nije detektovana ni jedna varijanta od funkcionalnog značaja, prediktivni model za primenu tiopurinskih lekova nije bilo moguće konstruisati. Skroman set podataka dobijenih u ispitivanju farmakogenetičkog potencijala varijanti od značaja za razvoj VIPN bio je nedovoljan za konstruisanje prediktivnih modela.

U okviru ovog istraživanja napravljen je PRS model predikcije hepatotoksičnosti usled primene visokih doza metotreksata u fazi konsolidacije. Usled dostupnosti podataka o genotipovima ispitanika [80], model je bio ograničen na varijante rs1801133 u genu *MTHFR* i rs4149056 u genu *SLCO1B1*. Ograničenje modela na ispitivanje hepatotoksičnosti bilo je uslovljeno dostupnošću GWAS i metastudija koje su raspolagale statističkim podacima o tipovima toksičnosti praćenim u ovoj studiji.

Dobijeni model zasnovan na poligeniskom skoru rizika nije pokazao statistički značajnu vezu sa razvojem hepatotoksičnosti usled primene metotreksata. Ovaj model potvrdio je rezultate dobijene za nezavisno ispitivanje ove dve varijante i ukazao na potrebu da se u budućnosti u ovakve modele uključi veći broj varijanti, koje bi bile ispitane na većem broju ispitanika.



Iako postoje studije koje ukazuju na validnost i veliki potencijal primene PRS u kliničkoj praksi, usled čega bi oboleli imali bolji ishod terapije, klinička primena PRS u individualizaciji terapije još uvek nije zaživela [113]. Neophodno je sprovesti opsežna klinička i populaciona istraživanja u cilju provere ne samo tačnosti, nego i značajnosti dobijenih PRS modela. Osim toga, potrebno je imati na umu da je PRS mera genetičkog doprinosa razvoju nekog fenotipa, i da na razvoj kompleksnih osobina, kao što je odgovor na terapiju nekim lekom, utiču i negenetički faktori, kao što su interakcije lekova usled koadministracije, različiti aspekti životnog stila poput načina ishrane, kao i sredinski faktori poput zagađenosti vode i vazduha ili izloženost jonizujućem zračenju.

## **6. Zaključci**

Skrining kodirajućih i okolnih regiona gena *NUDT15* kod dece obolele od ALL lečene tiopurinskim lekovima identifikovao je 5 varijanti u ovom genu: rs61746486, rs79687000, rs45465203, rs41284205, rs61973267. Učestalosti varijantnih alela u ispitivanoj grupi odgovaraju učestalostima u evropskoj populaciji. Ni jedna od ovih detektovanih varijanti nema patogeni efekat. Detektovane varijante u genu *NUDT15* u srpskoj populaciji dece obolele od ALL koja su lečena tiopurinskim lekovima u fazi održavanja nemaju farmakogenetički potencijal.

1. Sprovedene analize asocijacije nisu pokazale zavisnost između nivoa ekspresije gena *NUDT15* i ispitivanih surogat markera odgovora na tiopurinske lekove kod dece obolele od ALL. Preliminarni rezultati ukazuju na to da nivo ekspresije gena *NUDT15* u trenutku postavljanja dijagnoze ne može biti korišćen kao farmakotranskripcioni marker pojave neželjenih efekata do kojih dolazi usled primene tiopurinskih lekova u terapiji održavanja kod dece obolele od dečje ALL u Srbiji.
2. Nije utvrđena veza između varijante rs4149056 u genu *SLCO1B1* i farmakokinetike leka metotreksata, niti je pokazana zavisnost pojave toksičnosti od prisustva ovog varijantnog alela rs4149056. Varijanta rs4149056 u genu *SLCO1B1* trenutno ne može biti korišćena kao farmakogenetički marker odgovora na primenu metotreksata u fazi konsolidacije terapije dece obolele od ALL u Srbiji.
3. Asocijacija pet genetičkih varijanti (rs776746 u genu *CYP3A5*, rs1135989 u genu *ACTG1*, rs924607 u genu *CEP72*, rs12402181 u genu *MIR3117* i rs7896283 u genu *MIR4481*) sa pojavom vinkristinom indukovane periferne neuropatije ne ukazuje na statistički značajnu vezu sa nastankom VIPN kod dece sa ALL.. Učestalosti svih proučavanih varijantnih alela u ispitivanoj grupi odgovaraju učestalostima u evropskoj populaciji. Genetičke varijante ispitivane u okviru ove studije trenutno ne mogu biti korišćene kao farmakogenetički markeri pojave VIPN kod dece obolele od ALL u Srbiji.
4. Poligenski skor rizika za varijante rs1801133 u genu *MTHFR* i rs4149056 u genu *SLCO1B1* nije pokazao statistički značajnu povezanost sa razvojem hepatotoksičnosti. Ovaj prediktivni model potvrdio je rezultate dobijene za nezavisno ispitivanje pomenute dve varijante. Uključivanjem varijanti rs1801133 u genu *MTHFR* i rs4149056 u genu *SLCO1B1* u poligenski skor rizika ne dobija se prediktivni model razvoja hepatotoksičnosti usled primene metotreksata u fazi konsolidacije kod dece lečene od ALL u Srbiji.

# Literatura

## Literatura

1. Roden DM, McLeod HL, Relling M V, Williams MS, Mensah GA, Peterson JF, et al. Pharmacogenomics. *Lancet*. 2019 Aug;394(10197):521–32.
2. Pirmohamed M. Pharmacogenetics: Past, present and future. *Drug Discov Today*. 2011;16(19–20):852–61.
3. Relling M V., Evans WE. Pharmacogenomics in the clinic. Vol. 526, *Nature*. Nature Publishing Group; 2015. p. 343–50.
4. Pavlovic S, Kotur N, Stankovic B, Zukic B, Gasic V, Dokmanovic L. Pharmacogenomic and Pharmacotranscriptomic Profiling of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Paving the Way to Personalized Treatment. *Genes (Basel)*. 2019;10(3):191.
5. Al-Mahayri ZN, Patrinos GP, Ali BR. Pharmacogenomics in pediatric acute lymphoblastic leukemia: Promises and limitations. *Pharmacogenomics*. 2017;18(7):687–99.
6. Auwerx C, Sadler MC, Reymond A, Kutalik Z. From pharmacogenetics to pharmaco-omics: Milestones and future directions. *Hum Genet Genomics Adv*. 2022 Apr 14;3(2):100100.
7. Chambliss AB, Chan DW. Precision medicine: From pharmacogenomics to pharmacoproteomics. *Clin Proteomics*. 2016 Sep 26;13(1):1–9.
8. Relling M V, Klein TE. CPIC: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium of the Pharmacogenomics Research Network. *Clin Pharmacol Ther*. 2011 Mar;89(3):464–7.
9. Ross CJD, Visscher H, Sistonen J, Brunham LR, Pussegoda K, Loo TT, et al. The Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety: a model for safety pharmacology. *Thyroid*. 2010 Jul;20(7):681–7.
10. Swen JJ, Nijenhuis M, De Boer A, Grandia L, Maitland-Van Der Zee AH, Mulder H, et al. Pharmacogenetics: From bench to byte an update of guidelines. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;89(5):662–73.
11. Whirl-Carrillo M, Huddart R, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, Whaley R, et al. An Evidence-Based Framework for Evaluating Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. *Clin Pharmacol Ther*. 2021 Sep 1;110(3):563–72.
12. Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Twist GP, Klein TE, Miller NA. The Evolution of PharmVar. *Clin Pharmacol Ther*. 2019 Jan 1;105(1):29–32.
13. Genes-Drugs – CPIC [Internet]. [cited 2022 Aug 28]. Available from: <https://cpicpgx.org/genes-drugs/>
14. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* 2017 76. 2017 Jun 30;7(6):e577–e577.
15. Sary J, Zimmermann M, Campbell M, Castillo L, Dibar E, Donska S. Intensive Chemotherapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia : Results of the Randomized Intercontinental Trial ALL IC-BFM 2002. 2013;
16. Orphanet: Acute lymphoblastic leukemia [Internet]. [cited 2022 Aug 29]. Available from: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=EN&data\\_id=3732&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=ALL&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Disease\(s\)/group of diseases=Acute-lymphoblastic-leukemia&title=Acute lymphoblastic](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=3732&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=ALL&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Disease(s)/group of diseases=Acute-lymphoblastic-leukemia&title=Acute lymphoblastic)

leukemia&search=Disease\_Search\_Simple

17. Janić D, Dokmanović L, Jovanović N, Skorić D, Lazić J. Treatment results of children with Acute Lymphoblastic Leukemia according to modified BFM protocol. *Srp Arh Celok Lek.* 2004;132(suppl. 1):17–22.
18. Williams LA, Richardson M, Marcotte EL, Poynter JN, Spector LG. Sex ratio among childhood cancers by single year of age. *Pediatr Blood Cancer.* 2019 Jun 28;66(6):e27620.
19. Roganovic J. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. In: Longo DL, editor. *Leukemia.* InTech; 2013. p. 4939–5015.
20. Chessells JM, Harrison G, Richards SM, Bailey CC, Hill FG, Gibson BE, et al. Down's syndrome and acute lymphoblastic leukaemia: clinical features and response to treatment. *Arch Dis Child.* 2001 Oct;85(4):321–5.
21. Shah A, John BM, Sondhi V. Acute lymphoblastic leukemia with treatment--naive Fanconi anemia. *Indian Pediatr.* 2013 May 8;50(5):508–10.
22. German J. Bloom's syndrome. XX. The first 100 cancers. *Cancer Genet Cytogenet.* 1997 Jan;93(1):100–6.
23. Bielorai B, Fisher T, Waldman D, Lerenthal Y, Nissenkorn A, Tohami T, et al. Acute lymphoblastic leukemia in early childhood as the presenting sign of ataxia-telangiectasia variant. *Pediatr Hematol Oncol.* 2013 Sep;30(6):574–82.
24. Schüz J, Erdmann F. Environmental Exposure and Risk of Childhood Leukemia: An Overview. *Arch Med Res.* 2016;47(8):607–14.
25. Sehgal S, Mujtaba S, Gupta D, Aggarwal R, Marwaha RK. High incidence of Epstein Barr virus infection in childhood acute lymphocytic leukemia: a preliminary study. *Indian J Pathol Microbiol.* 53(1):63–7.
26. Gérinière L, Bastion Y, Dumontet C, Salles G, Espinouse D, Coiffier B. Heterogeneity of acute lymphoblastic leukemia in HIV-seropositive patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 1994 May;5(5):437–40.
27. Marcotte EL, Spector LG, Mendes-de-Almeida DP, Nelson HH. The Prenatal Origin of Childhood Leukemia: Potential Applications for Epidemiology and Newborn Screening. *Front Pediatr.* 2021 Apr 23;9:188.
28. Trueworthy R, Shuster J, Look T, Crist W, Borowitz M, Carroll A, et al. Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 1992 Apr;10(4):606–13.
29. Moorman A V, Ensor HM, Richards SM, Chilton L, Schwab C, Kinsey SE, et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia : results from the UK Medical Research Council ALL97 / 99 randomised trial. *Lancet Oncol.* 11(5):429–38.
30. Chowdhury T, Brady HJM. Insights from clinical studies into the role of the MLL gene in infant and childhood leukemia. 2008;40:192–9.
31. Ma X, Edmonson M, Yergeau D, Muzny DM, Hampton OA, Rusch M, et al. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun.* 2015 May 19;6(1):6604.
32. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. Longo DL, editor. *N Engl J Med.* 2015 Oct 15;373(16):1541–52.

33. Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, Pieters R, Schrappe M, Biondi A, et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia: Progress through collaboration. *J Clin Oncol.* 2015;33(27):2938–48.
34. Micic D, Slavkovic B, Gvozdenovic NR, Kuzmanovic M, Dokmanovic L, Krstovski N, et al. History of treatment and long-term outcome in children with acute lymphoblastic leukaemia in Serbia. 2011;4:174–7.
35. Milosevic G, Kotur N, Krstovski N, Lazic J, Zukic B, Stankovic B, et al. 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 Jan 24;37(3):320–7.
36. ALL IC-BFM 2009. A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia Final Version of Therapy Protocol from August-14-2009. 2015.
37. Maamari D, El-Khoury H, Saifi O, Muwakkit SA, Zgheib NK. Implementation of pharmacogenetics to individualize treatment regimens for children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmgenomics Pers Med.* 2020;13:295–317.
38. Gervasini G, Vagace JM. Impact of genetic polymorphisms on chemotherapy toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. Vol. 3, *Frontiers in Genetics.* Frontiers Media SA; 2012.
39. Mlakar V, Huezo-Diaz Curtis P, Satyanarayana Uppugunduri CR, Krajinovic M, Ansari M. Pharmacogenomics in Pediatric Oncology: Review of Gene-Drug Associations for Clinical Use. *Int J Mol Sci.* 2016 Sep 8;17(9).
40. Relling M V., Ramsey LB. Pharmacogenomics of acute lymphoid leukemia: new insights into treatment toxicity and efficacy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2013;2013:126–30.
41. Bostrom B, Erdmann G. Cellular pharmacology of 6-mercaptopurine in acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1993 Feb;15(1):80—86.
42. Pavlovic S, Kotur N, Stankovic B, Gasic V, Lucafo M, Decorti G, et al. Clinical Application of Thiopurine Pharmacogenomics in Pediatrics. *Curr Drug Metab.* 2020 Mar 3;21(1):53–62.
43. Fotoohi AK, Coulthard SA, Albertioni F. Thiopurines: factors influencing toxicity and response. *Biochem Pharmacol.* 2010 May 1;79(9):1211–20.
44. Stork LC, Matloub Y, Broxson E, La M, Yanofsky R, Sather H, et al. Oral 6-mercaptopurine versus oral 6-thioguanine and veno-occlusive disease in children with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: report of the Children’s Oncology Group CCG-1952 clinical trial. *Blood.* 2010 Apr 8;115(14):2740–8.
45. Vora A, Mitchell CD, Lennard L, Eden T, Kinsey SE, Lilleyman J, et al. Toxicity and efficacy of 6-thioguanine versus 6-mercaptopurine in childhood lymphoblastic leukaemia: a randomised trial. *Lancet.* 2006 Oct;368(9544):1339–48.
46. Karim H, Ghalali A, Lafolie P, Vitols S, Fotoohi AK. Differential role of thiopurine methyltransferase in the cytotoxic effects of 6-mercaptopurine and 6-thioguanine on human leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;437(2):280–6.
47. Swann PF, Waters TR, Moulton DC, Xu YZ, Zheng Q, Edwards M, et al. Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science.* 1996 Aug 23;273(5278):1109–11.
48. Inamochi H, Higashigawa M, Shimono Y, Nagata T, Cao DC, Mao XY, et al. Delayed cytotoxicity of 6-mercaptopurine is compatible with mitotic death caused by DNA damage

- due to incorporation of 6-thioguanine into DNA as 6-thioguanine nucleotide. *J Exp Clin Cancer Res.* 1999 Sep;18(3):417–24.
49. Christie NT, Drake S, Meyn RE, Nelson JA. 6-Thioguanine-induced DNA damage as a determinant of cytotoxicity in cultured Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 1984 Sep;44(9):3665–71.
  50. Krenitsky TA, Papaioannou R, Elion GB. Human hypoxanthine phosphoribosyltransferase. I. Purification, properties, and specificity. *J Biol Chem.* 1969 Mar 10;244(5):1263–70.
  51. Bökkerink JP, Damen FJ, Hulscher MW, Bakker MA, De Abreu RA. Biochemical evidence for synergistic combination treatment with methotrexate and 6-mercaptopurine in acute lymphoblastic leukemia. *Haematol Blood Transfus.* 1990;33:110–7.
  52. NUDT15 expression in human [Internet]. [cited 2022 Oct 3]. Available from: <https://bgee.org/gene/ENSG00000136159#expression>
  53. McLennan AG. The Nudix hydrolase superfamily. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(2):123–43.
  54. Moyer AM. NUDT15: A bench to bedside success story. *Clin Biochem.* 2021;92(March):1–8.
  55. Yang SK, Hong M, Baek J, Choi H, Zhao W, Jung Y, et al. A common missense variant in NUDT15 confers susceptibility to thiopurine-induced leukopenia. *Nat Genet.* 2014;46(9):1017–20.
  56. Tanaka Y, Kato M, Hasegawa D, Urayama KY, Nakadate H, Kondoh K, et al. Susceptibility to 6-MP toxicity conferred by a NUDT15 variant in Japanese children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2015;171(1):109–15.
  57. Yang JJ, Landier W, Yang W, Liu C, Hageman L, Cheng C, et al. Inherited NUDT15 variant is a genetic determinant of mercaptopurine intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2015 Apr 1;33(11):1235–42.
  58. Moriyama T, Nishii R, Perez-Andreu V, Yang W, Klussmann FA, Zhao X, et al. NUDT15 polymorphisms alter thiopurine metabolism and hematopoietic toxicity. *Nat Genet.* 2016 Apr 15;48(4):367–73.
  59. PharmVar [Internet]. [cited 2022 Oct 5]. Available from: <https://www.pharmvar.org/gene/NUDT15>
  60. Relling M V., Schwab M, Whirl-Carrillo M, Suarez-Kurtz G, Pui CH, Stein CM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for Thiopurine Dosing Based on TPMT and NUDT15 Genotypes: 2018 Update. *Clin Pharmacol Ther.* 2019;105(5):1095–105.
  61. Schaeffeler E, Jaeger SU, Klumpp V, Yang JJ, Igel S, Hinze L, et al. Impact of NUDT15 genetics on severe thiopurine-related hematotoxicity in patients with European ancestry. *Genet Med.* 2019;0(0).
  62. FARBER S, DIAMOND LK. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med.* 1948 Jun 3;238(23):787–93.
  63. Malaviya AN. Landmark papers on the discovery of methotrexate for the treatment of rheumatoid arthritis and other systemic inflammatory rheumatic diseases: a fascinating story. *Int J Rheum Dis.* 2016;19(9):844–51.
  64. Kodidela S, Suresh Chandra P, Dubashi B. Pharmacogenetics of methotrexate in acute lymphoblastic leukaemia: Why still at the bench level? *Eur J Clin Pharmacol.*
-



- 2014;70(3):253–60.
65. Assaraf YG. Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Mar;26(1):153–81.
  66. Assaraf YG. The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. *Drug Resist Updat.* 9(4–5):227–46.
  67. Giletti A, Esperon P. Genetic markers in methotrexate treatments. *Pharmacogenomics J.* 2018;18(6):689–703.
  68. Mei L, Ontiveros EP, Griffiths EA, Thompson JE, Wang ES, Wetzler M. Pharmacogenetics predictive of response and toxicity in acute lymphoblastic leukemia therapy. *Blood Rev.* 2015;29(4):243–9.
  69. Kotur N. FARMAKOGENETIKA 6-MERKAPTOPURINA I METOTREKSATA U DEČJOJ AKUTNOJ LIMFOBLASTNOJ LEUKEMIJI. University of Belgrade; 2015.
  70. Lazić J. ZNAČAJ POLIMORFIZAMA U GENIMA KOJI KODIRAJU ENZIME UKLJUČENE U METABOLIZAM METOTREKSATA U DECE SA AKUTNOM LIMFOBLASTNOM LEUKEMIJOM. 2016.
  71. Ferrari M, Guasti L, Maresca A, Mirabile M, Contini S, Grandi AM, et al. Association between statin-induced creatine kinase elevation and genetic polymorphisms in *SLCO1B1*, *ABCB1* and *ABCG2*. *Eur J Clin Pharmacol.* 2014 May;70(5):539–47.
  72. Abe T, Kakyo M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, et al. Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem.* 1999 Jun 11;274(24):17159–63.
  73. Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J.* 2015 Jan 10;14:6.
  74. Oshiro C, Mangravite L, Klein T, Altman R. PharmGKB very important pharmacogene: *SLCO1B1*. *Pharmacogenet Genomics.* 2010 Mar;20(3):211–6.
  75. MTHFR Gene - GeneCards | MTHR Protein | MTHR Antibody [Internet]. [cited 2022 Oct 10]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MTHFR>
  76. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab.* 1998 Jul;64(3):169–72.
  77. Koppen IJN, Hermans FJR, Kaspers GJL. Folate related gene polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2010 Jan;148(1):3–14.
  78. Sepe DM, McWilliams T, Chen J, Kershenbaum A, Zhao H, La M, et al. Germline genetic variation and treatment response on CCG-1891. *Pediatr Blood Cancer.* 2012 May;58(5):695–700.
  79. Lopez-Lopez E, Ballesteros J, Piñan MA, Sanchez De Toledo J, Garcia De Andoin N, Garcia-Miguel P, et al. Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: A new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics.* 2013;23(2):53–61.
  80. Lazić J, Kotur N, Krstovski N, Dokmanović L, Zukić B, Predojević-Samardžić J, et al. Importance of pharmacogenetic markers in the methylenetetrahydrofolate reductase gene during methotrexate treatment in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Arch Biol Sci.* 2017;69(2):239–46.

81. Gidding CEM, Kellie SJ, Kamps WA, De Graaf SSN. Vincristine revisited. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1999 Feb 1;29(3):267–87.
82. Martino E, Casamassima G, Castiglione S, Cellupica E, Pantalone S, Papagni F, et al. Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. *Bioorg Med Chem Lett*. 2018;28(17):2816–26.
83. Lobert S, Vulevic B, Correia JJ. Interaction of vinca alkaloids with tubulin: A comparison of vinblastine, vincristine, and vinorelbine. *Biochemistry*. 1996 May 28;35(21):6806–14.
84. Staff NP, Grisold A, Grisold W, Windebank AJ. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A current review. *Ann Neurol*. 2017 Jun 1;81(6):772–81.
85. van de Velde ME, Kaspers GL, Abbink FCH, Wilhelm AJ, Ket JCF, van den Berg MH. Vincristine-induced peripheral neuropathy in children with cancer: A systematic review. Vol. 114, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier Ireland Ltd; 2017. p. 114–30.
86. Mora E, Lavoie Smith EM, Donohoe C, Hertz DL. Vincristine-induced peripheral neuropathy in pediatric cancer patients. *Am J Cancer Res*. 2016;6(11):2416–30.
87. Moore A, Pinkerton R. Vincristine: Can its therapeutic index be enhanced? *Pediatr Blood Cancer*. 2009 Dec 15;53(7):1180–7.
88. CYP3A5 Gene - GeneCards | CP3A5 Protein | CP3A5 Antibody [Internet]. [cited 2022 Oct 11]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP3A5&keywords=cyp3a5>
89. van Schaik RHN. CYP450 pharmacogenetics for personalizing cancer therapy. *Drug Resist Updat*. 2008;11(3):77–98.
90. CEP72 Gene - GeneCards | CEP72 Protein | CEP72 Antibody [Internet]. [cited 2022 Oct 11]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CEP72&keywords=cep72>
91. Diouf B, Crews KR, Lew G, Pei D, Cheng C, Bao J, et al. Association of an inherited genetic variant with vincristine-related peripheral neuropathy in children with acute lymphoblastic leukemia. *JAMA*. 2015 Feb 24;313(8):815–23.
92. Stock W, Diouf B, Crews KR, Pei D, Cheng C, Laumann K, et al. An Inherited Genetic Variant in CEP72 Promoter Predisposes to Vincristine-Induced Peripheral Neuropathy in Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Pharmacol Ther*. 2017;101(3):391–5.
93. Gutierrez-Camino A, Martin-Guerrero I, Lopez-Lopez E, Echebarria-Barona A, Zabalza I, Ruiz I, et al. Lack of association of the CEP72 rs924607 TT genotype with vincristine-related peripheral neuropathy during the early phase of pediatric acute lymphoblastic leukemia treatment in a Spanish population. *Pharmacogenet Genomics*. 2016 Feb;26(2):100–2.
94. ACTG1 Gene - GeneCards | ACTG Protein | ACTG Antibody [Internet]. [cited 2022 Oct 11]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ACTG1&keywords=actg1>
95. Verrills NM, Po'uha ST, Liu MLM, Liaw TYE, Larsen MR, Ivery MT, et al. Alterations in  $\gamma$ -Actin and Tubulin-Targeted Drug Resistance in Childhood Leukemia. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2006 Oct 4;98(19):1363–74.
96. Ceppi F, Langlois-Pelletier C, Gagné V, Rousseau J, Ciolino C, Lorenzo S De, et al. Polymorphisms of the vincristine pathway and response to treatment in children with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics*. 2014 Jun 1;15(8):1105–16.
97. Godnic I, Zorc M, Jevsinek Skok D, Calin GA, Horvat S, Dovc P, et al. Genome-wide and

species-wide in silico screening for intragenic MicroRNAs in human, mouse and chicken. *PLoS One*. 2013;8(6):e65165.

98. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003 Sep 25;425(6956):415–9.
99. Wilson RC, Tambe A, Kidwell MA, Noland CL, Schneider CP, Doudna JA. Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. *Mol Cell*. 2015 Feb 5;57(3):397–407.
100. Yekta S, Shih I-H, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*. 2004 Apr 23;304(5670):594–6.
101. Ipsaro JJ, Joshua-Tor L. From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nat Struct Mol Biol*. 2015 Jan;22(1):20–8.
102. Detassis S, Grasso M, Del Vescovo V, Denti MA. microRNAs Make the Call in Cancer Personalized Medicine. *Front Cell Dev Biol*. 2017 Sep 22;5(SEP).
103. Rukov JL, Shomron N. MicroRNA pharmacogenomics: Post-transcriptional regulation of drug response. *Trends Mol Med*. 2011;17(8):412–23.
104. MIR3117 Gene - GeneCards | MIR3117 RNA Gene [Internet]. [cited 2022 Oct 11]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR3117&keywords=mir3117>
105. MIR4481 Gene - GeneCards | MIR4481 RNA Gene [Internet]. [cited 2022 Oct 11]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR4481&keywords=mir4481>
106. Franca R, Rebora P, Bertorello N, Fagioli F, Conter V, Biondi A, et al. Pharmacogenetics and induction/consolidation therapy toxicities in acute lymphoblastic leukemia patients treated with AIEOP-BFM ALL 2000 protocol. *Pharmacogenomics J*. 2017;17(1):4–10.
107. Awasthi S, Hallene KL, Fazio V, Singhal SS, Cucullo L, Awasthi YC, et al. RLIP76, a non-ABC transporter, and drug resistance in epilepsy. *BMC Neurosci*. 2005 Sep 27;6:61.
108. Gutierrez-Camino Á, Umerez M, Martín-Guerrero I, García de Andoin N, Santos B, Sastre A, et al. Mir-pharmacogenetics of Vincristine and peripheral neurotoxicity in childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2018 Dec 27;18(6):704–12.
109. Gong J, Tong Y, Zhang H-M, Wang K, Hu T, Shan G, et al. Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. *Hum Mutat*. 2012 Jan;33(1):254–63.
110. Lewis CM, Vassos E. Polygenic risk scores: From research tools to clinical instruments. *Genome Med*. 2020 May 18;12(1):1–11.
111. Lambert SA, Abraham G, Inouye M. Towards clinical utility of polygenic risk scores. *Hum Mol Genet*. 2019;28(R2):R133–42.
112. Choi SW, Mak TSH, O'Reilly PF. Tutorial: a guide to performing polygenic risk score analyses. *Nat Protoc* 2020 159. 2020 Jul 24;15(9):2759–72.
113. Kumuthini J, Zick B, Balasopoulou A, Chalikiopoulou C, Dandara C, El-Kamah G, et al. The clinical utility of polygenic risk scores in genomic medicine practices: a systematic review. *Hum Genet*. 2022 Apr 30;141(11):1697–704.
114. Tan CH, Fan CC, Mormino EC, Sugrue LP, Broce IJ, Hess CP, et al. Polygenic hazard score: an enrichment marker for Alzheimer's associated amyloid and tau deposition. *Acta Neuropathol*. 2018;135(1):85–93.

115. Knowles JW, Ashley EA. Cardiovascular disease: The rise of the genetic risk score. *PLoS Med.* 2018;15(3):e1002546.
116. Lewis ACF, Green RC. Polygenic risk scores in the clinic: new perspectives needed on familiar ethical issues. *Genome Med.* 2021 Dec 1;13(1):1–10.
117. Siemens A, Anderson SJ, Rassekh SR, Ross CJD, Carleton BC. A Systematic Review of Polygenic Models for Predicting Drug Outcomes. *J Pers Med.* 2022 Sep 1;12(9):1394.
118. Auwerx C, Sadler MC, Reymond A, Kutalik Z. From pharmacogenetics to pharmaco-omics: Milestones and future directions. *HGG Adv.* 2022 Apr 14;3(2):100100.
119. Johnson JA, Gong L, Whirl-Carrillo M, Gage BF, Scott SA, Stein CM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C9 and VKORC1 genotypes and warfarin dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2011 Oct;90(4):625–9.
120. Johnson D, Wilke MAP, Lyle SM, Kowalec K, Jorgensen A, Wright GEB, et al. A Systematic Review and Analysis of the Use of Polygenic Scores in Pharmacogenomics. *Clin Pharmacol Ther.* 2022 Apr 17;111(4):919–30.
121. Li J, Yoshikawa A, Brennan MD, Ramsey TL, Meltzer HY. Genetic predictors of antipsychotic response to lurasidone identified in a genome wide association study and by schizophrenia risk genes. *Schizophr Res.* 2018;192:194–204.
122. Lewis JP, Backman JD, Reny J-L, Bergmeijer TO, Mitchell BD, Ritchie MD, et al. Pharmacogenomic polygenic response score predicts ischaemic events and cardiovascular mortality in clopidogrel-treated patients. *Eur Hear journal Cardiovasc Pharmacother.* 2020;6(4):203–10.
123. National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v5.0 [Internet]. 2017 [cited 2022 Aug 1]. Available from: <https://www.meddra.org/>
124. National Cancer Institut. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v2.0 [Internet]. 1998 [cited 2022 Aug 1]. Available from: [https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic\\_applications/docs/ctcv20\\_4-30-992.pdf](https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcv20_4-30-992.pdf)
125. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463.
126. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr 1;162(1):156–9.
127. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods.* 2001 Dec 1;25(4):402–8.
128. Zhu C, Liu YW, Wang SZ, Li XL, Nie XL, Yu XT, et al. Associations between the C677T and A1298C polymorphisms of MTHFR and the toxicity of methotrexate in childhood malignancies: a meta-analysis. *Pharmacogenomics J.* 2018;18(3):450–9.
129. Han JM, Choi KH, Lee HH, Gwak HS. Association between SLCO1B1 polymorphism and methotrexate-induced hepatotoxicity: a systematic review and meta-analysis. *Anticancer Drugs.* 2022;33(1):75–9.
130. Freitas AT, Calhau C, Antunes G, Araújo B, Bandeira M, Barreira S, et al. Vitamin D-related polymorphisms and vitamin D levels as risk biomarkers of COVID-19 disease severity. *Sci Rep.* 2021;11(1):20837.

131. Clarke GM, Anderson CA, Pettersson FH, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat Protoc.* 2011 Feb;6(2):121–33.
132. Dokmanovic L, Urosevic J, Janic D, Jovanovic N, Petrucev B, Tosic N, et al. Analysis of thiopurine S-methyltransferase polymorphism in the population of Serbia and Montenegro and mercaptopurine therapy tolerance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ther Drug Monit.* 2006 Dec;28(6):800–6.
133. Dokmanović L, Janić D, Krstovski N, Zukić B, Tošić N, Pavlović S. Importance of genotyping of thiopurine S-methyltransferase in children with acute lymphoblastic leukaemia during maintenance therapy. *Srp Arh Celok Lek.* 2008;136(11–12):609–16.
134. Zukic B, Radmilovic M, Stojiljkovic M, Tosic N, Pourfarzad F, Dokmanovic L, et al. Functional analysis of the role of the TPMT gene promoter VNTR polymorphism in TPMT gene transcription. *Pharmacogenomics.* 2010 Apr;11(4):547–57.
135. Kotur N, Stankovic B, Kassela K, Georgitsi M, Vicha A, Leontari I, et al. 6-mercaptopurine influences TPMT gene transcription in a TPMT gene promoter variable number of tandem repeats-dependent manner. *Pharmacogenomics.* 2012 Feb;13(3):283–95.
136. Kotur N, Dokmanovic L, Janic D, Stankovic B, Krstovski N, Tosic N, et al. TPMT gene expression is increased during maintenance therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia patients in a TPMT gene promoter variable number of tandem repeat-dependent manner. *Pharmacogenomics.* 2015;16(15):1701–12.
137. Milosevic G, Kotur N, Lazic J, Krstovski N, Stankovic B, Zukic B, et al. Influence of variants in folate metabolism genes on 6-mercaptopurine induced toxicity during treatment for childhood acute lymphocytic leukemia. *J BUON.* 2019;24(5):2075–83.
138. Gasic V, Zukic B, Stankovic B, Janic D, Dokmanovic L, Lazic J, et al. Pharmacogenomic markers of glucocorticoid response in the initial phase of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Radiol Oncol.* 2018;52(3):296–306.
139. Gasic V, Stankovic B, Zukic B, Janic D, Dokmanovic L, Krstovski N, et al. Expression Pattern of Long Non-coding RNA Growth Arrest-specific 5 in the Remission Induction Therapy in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Med Biochem.* 2019 Jul;38(3):292–8.
140. Dulucq S, St-Onge G, Gagné V, Ansari M, Sinnett D, Labuda D, et al. DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood.* 2008;111(7):3692–700.
141. Krajinovic M, Costea I, Primeau M, Dulucq S, Moghrabi A. Combining several polymorphisms of thymidylate synthase gene for pharmacogenetic analysis. *Pharmacogenomics J.* 2005;5(6):374–80.
142. Liu SG, Gao C, Zhang RD, Zhao XX, Cui L, Li WJ, et al. Polymorphisms in methotrexate transporters and their relationship to plasma methotrexate levels, toxicity of high-dose methotrexate, and outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget.* 2017;8(23):37761–72.
143. Ramsey LB, Panetta JC, Smith C, Yang W, Fan Y, Winick NJ, et al. Genome-wide study of methotrexate clearance replicates SLCO1B1. *Blood.* 2013 Feb 7;121(6):898–904.
144. Radtke S, Zolk O, Renner B, Paulides M, Zimmermann M, Möricke A, et al. Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2013 Jun 27;121(26):5145–53.
145. Ramsey LB, Bruun GH, Yang W, Trevino LR, Vattathil S, Scheet P, et al. Rare versus

common variants in pharmacogenetics: SLC01B1 variation and methotrexate disposition. *Genome Res.* 2012 Jan 1;22(1):1–8.

146. Treviño LR, Shimasaki N, Yang W, Panetta JC, Cheng C, Pei D, et al. Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *J Clin Oncol.* 2009 Dec 10;27(35):5972–8.
147. Fukushima H, Fukushima T, Sakai A, Suzuki R, Nakajima-Yamaguchi R, Kobayashi C, et al. Polymorphisms of MTHFR Associated with Higher Relapse/Death Ratio and Delayed Weekly MTX Administration in Pediatric Lymphoid Malignancies. *Leuk Res Treatment.* 2013;2013:238528.
148. Giletti A, Vital M, Lorenzo M, Cardozo P, Borelli G, Gabus R, et al. Methotrexate pharmacogenetics in Uruguayan adults with hematological malignant diseases. *Eur J Pharm Sci.* 2017 Nov 15;109:480–5.
149. Triarico S, Romano A, Attinà G, Capozza MA, Maurizi P, Mastrangelo S, et al. Vincristine-induced peripheral neuropathy (Vipn) in pediatric tumors: Mechanisms, risk factors, strategies of prevention and treatment. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 16;22(8):4112.
150. Egbelakin A, Ferguson MJ, MacGill EA, Lehmann AS, Topletz AR, Quinney SK, et al. Increased risk of vincristine neurotoxicity associated with low CYP3A5 expression genotype in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2011 Mar;56(3):361–7.
151. Dennison JB, Kulanthaivel P, Barbuch RJ, Renbarger JL, Ehlhardt WJ, Hall SD. Selective metabolism of vincristine in vitro by CYP3A5. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(8):1317–27.
152. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet.* 2001;27(4):383–91.
153. Lee SJ, Usmani KA, Chanas B, Ghanayem B, Xi T, Hodgson E, et al. Genetic findings and functional studies of human CYP3A5 single nucleotide polymorphisms in different ethnic groups. *Pharmacogenetics.* 2003;13(8):461–72.
154. Renbarger JL, McCammack KC, Rouse CE, Hall SD. Effect of race on vincristine-associated neurotoxicity in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. *Pediatr Blood Cancer.* 2008 Apr 1;50(4):769–71.
155. Sims RP. The effect of race on the CYP3A-mediated metabolism of vincristine in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Oncol Pharm Pract.* 2016 Feb 10;22(1):76–81.
156. Aplenc R, Glatfelter W, Han P, Rappaport E, La M, Cnaan A, et al. CYP3A genotypes and treatment response in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2003;122(2):240–4.
157. Hartman A, van Schaik RHN, van der Heiden IP, Broekhuis MJC, Meier M, den Boer ML, et al. Polymorphisms in genes involved in vincristine pharmacokinetics or pharmacodynamics are not related to impaired motor performance in children with leukemia. *Leuk Res.* 2010 Feb;34(2):154–9.
158. Guilhaumou R, Solas C, Bourgarel-Rey V, Quaranta S, Rome A, Simon N, et al. Impact of plasma and intracellular exposure and CYP3A4, CYP3A5, and ABCB1 genetic polymorphisms on vincristine-induced neurotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011 Dec 4;68(6):1633–8.
159. Moore AS, Norris R, Price G, Nguyen T, Ni M, George R, et al. Vincristine pharmacodynamics and pharmacogenetics in children with cancer: a limited-sampling,

- population modelling approach. *J Paediatr Child Health*. 2011 Dec;47(12):875–82.
160. Oshimori N, Li X, Ohsugi M, Yamamoto T. Cep72 regulates the localization of key centrosomal proteins and proper bipolar spindle formation. *EMBO J*. 2009 Jul 22;28(14):2066–76.
  161. Wright GEB, Amstutz U, Drögemöller BI, Shih J, Rassekh SR, Hayden MR, et al. Pharmacogenomics of Vincristine-Induced Peripheral Neuropathy Implicates Pharmacokinetic and Inherited Neuropathy Genes. *Clin Pharmacol Ther*. 2019;105(2):402–10.
  162. Zgheib NK, Ghanem KM, Tamim H, Aridi C, Shahine R, Tarek N, et al. Genetic polymorphisms in candidate genes are not associated with increased vincristine-related peripheral neuropathy in Arab children treated for acute childhood leukemia. *Pharmacogenet Genomics*. 2018 Aug;28(8):189–95.
  163. Total Therapy XVII for Newly Diagnosed Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia and Lymphoma - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2022 Nov 25]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03117751>
  164. Winter SS, Ricci J, Luo L, Lovato DM, Khawaja HM, Serna-Gallegos T, et al. ATP Binding Cassette C1 (ABCC1/MRP1)-mediated drug efflux contributes to disease progression in T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Health (Irvine Calif)*. 2013 May;5(5A):41–50.
  165. Drake KJ, Singhal J, Yadav S, Nadkar A, Pungaliya C, Singhal SS, et al. RALBP1/RLIP76 mediates multidrug resistance. *Int J Oncol*. 2007 Jan;30(1):139–44.
  166. Hong M, Tao S, Zhang L, Diao L-T, Huang X, Huang S, et al. RNA sequencing: new technologies and applications in cancer research. *J Hematol Oncol*. 2020 Dec 4;13(1):166.
  167. Moriyama T, Yang Y-L, Nishii R, Ariffin H, Liu C, Lin T-N, et al. Novel variants in NUDT15 and thiopurine intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia from diverse ancestry. *Blood*. 2017 Sep 7;130(10):1209–12.
  168. Yoshida M, Brown SA, Moriyama T, Nishii R, Tsujimoto S-I, Yamada Y, et al. Low NUDT15 expression levels due to biallelic NUDT15 variants and 6-mercaptopurine intolerance. *Br J Haematol*. 2022 Oct;199(2):270–6.
  169. Cross B, Turner R, Pirmohamed M. Polygenic risk scores : An overview from bench to bedside for personalised medicine. 2022;(November):1–19.
  170. Koido M, Kawakami E, Fukumura J, Noguchi Y, Ohori M, Nio Y, et al. Polygenic architecture informs potential vulnerability to drug-induced liver injury. *Nat Med*. 2020 Oct;26(10):1541–8.
  171. Zhai S, Zhang H, Mehrotra D V., Shen J. Pharmacogenomics polygenic risk score for drug response prediction using PRS-PGx methods. *Nat Commun* 2022 131. 2022 Sep 8;13(1):1–13.

# **PRILOZI**



## Prilog 1. Odluka etičkog odbora IMGGI o saglasnosti sa sprovođenjem istraživanja u okviru doktorske teze



ИНСТИТУТ ЗА МОЛЕКУЛАРНУ ГЕНЕТИКУ  
И ГЕНЕТИЧКО ИНЖЕЊЕРСТВО  
Универзитет у Београду

Војводе Степе 444а | 11042 Београд | Република Србија  
Тел. (011) 397 57 44 | Факс (011) 397 58 08 | Т.р. 160-350089-28 | ПИБ 101736673

контакт: etickiodbor@imgge.bg.ac.rs

На основу Правилника о раду Етичког одбора Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду, у складу са Одредбама и начелима садржаним у Хелсиншкој декларацији и Конвенцији Савета Европе о људским правима и биомедицини од 1997. године, Етички одбор Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду је на седници одржаној дана 13.07.2021. године одлучивао о захтеву др Бранке Зукић и донео је

### ОДЛУКУ О-ЕО-031/2021/1

**Етички одбор ИМГГИ, УБ је сагласан са спровођењем истраживања која су предвиђена у оквиру докторске тезе кандидата Бојана Ристивојевића**

#### Образложење

Чланови Етичког одбора су на седници одржаној 13.07.2021.г размотрили захтев др Бранке Зукић, ментора докторанда Бојана Ристивојевића, да се докторанду Бојану Ристивојевићу изда потврда о сагласности за истраживања у саставу његове докторске тезе. Истраживања планирана у оквиру докторске тезе Бојана Ристивојевића су саставни део студије "Фармакогенетички маркери одговора на терапију тиопуриномским лековима, метотрексатом и винкристином код деце са акутном лимфобластном леукемијом", чији је руководиоца др Бранка Зукић, а која је одобрена од стране Етичког одбора ИМГГИ УБ (одлука О-ЕО-031/2021). На основу приложене документације и сагласности руководиоца студије, Етички одбор ИМГГИ УБ је донео одлуку као у изреци.

Доставити:  
-архиви Етичког одбора  
-подносиоцу захтева



ПРЕДСЕДНИК ЕТИЧКОГ ОДБОРА  
др Валентина Ђорђевић,  
научни саветник, ИМГГИ,УБ

| beogene@imgge.bg.ac.rs

## **BIOGRAFIJA**

Bojan M. Ristivojević rođen je 7. maja 1985. godine u Beogradu, Srbija. Osnovnu školu završio je u Baroševcu, a srednju u Layarevcu. Diplomске studije upisao je školske 2004/2005. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija. Tokom studija obavio je stručnu praksu u organizaciji IAESTE u kompaniji Histogenetics.inc, Njujork, Sjedinjene Američke Države. Diplomirao je 2016. Godine sa prosečnom ocenom 8.88. Diplomski rad pod nazivom „Uticaj prenatalnog stresa na metaboličku aktivnost mrkog masnog tkiva pacova“ izveden je u Laboratoriji katedre za fiziologiju i ekofiziologiju Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Godine 2017. započeo je doktorske studije na Biološkom fakultetu, Univerzitet u Beogradu, modul Molekularna biologija eukariota. Od jula 2017. godine volontira, a potom biva zaposlen u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, na projektu "Retke bolesti: molekularna patofiziologija, dijagnostički i terapijski modaliteti i socijalni, etički i pravni aspekti" (Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, ev. br. III41004, 2011-2019. godine). Zvanje istraživač saradnik stekao je 2021. godine. Autor je 5 radova u časopisima međunarodnog značaja i 3 kongresna saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim kongresima.

## Прилог 2

### Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Бојан Ристивојевић

Број индекса М3004/2017

#### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Фармакогенетички маркери одговора на терапију тиопуринским лековима, метотрексатом и винкристином код деце са акутном лимфобластном леукемијом

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

У Београду, \_\_\_\_\_ 11.01.2023. \_\_\_\_\_

Потпис аутора

*Bojan Ristovic*

## Прилог 3

### Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Бојан Ристивојевић

Број индекса M3004/2017

Студијски програм Молекулатна биологија; модул: молекуларна биологија еукариота

Наслов рада Фармакогенетички маркери одговора на терапију тиопуринам лековима, метотрексатом и винкристином код деце са акутном лимфобластном леукемијом

Ментор др Бранка Зукић, др Милош Бркушанин

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, \_\_\_\_\_ 11.01.2023. \_\_\_\_\_

Потпис аутора



## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Фармакогенетички маркери одговора на терапију тиопуринаским лековима, метотрексатом и винкристином код деце са акутном лимфобластном леукемијом

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, \_\_\_\_\_ 11.01.2023. \_\_\_\_\_

Потпис аутора



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.