

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ПРИМЉЕНО: 31.03.17			
Објед.	Број	Грифел	Вредност
05	4290		

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-65/43 од 18.01.2017. године именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата мр фармације асс Ксеније Вучићевић под називом:

„Експресија гена *ABCB1* и гена регулатора апоптозе као фактора резистенције на хемиотерапију код оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије“

Чланови комисије су:

1. Проф. др Предраг Ђурђевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник;
2. Проф. др Драгана Јанић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Педијатрија, члан;
3. Проф. др Снажана Цупара, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија, члан;

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу:

2. Извештај комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Мр фармације Ксенија Вучићевић, рођена је 09.09.1987. године у Крагујевцу. Основну школу и Медицинску школу „Сестре Нинковић“ завршила је у Крагујевцу. Уписала је Интегрисане академске студије фармације Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу 2006. године, дипломирала је 15.09.2011. године са просечном оценом 8.61. Докторске академске студије на Медицинском факултету у Крагујевцу, подручје Молекулска медицина - Клиничка и експериментална фармакологија, уписала је школске 2011/2012 године. Стручни завршни испит је положила 2013. године, а усмени докторски испит положила је дана 11.04.2014 године, са просечном оценом 9. У оквиру израде

результата своје докторске дисертације обавља волонтерски рад на Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство у Београду, где стиче потврду о завршеној обуци из молекуларне дијагностике у трајању од новембра 2012. године до маја 2013. године, што обухвата методе изолације ДНК из крви и букалног бриса, технику PCR, електрофорезу, рестрикциону анализу, изолацију РНК, реверзну транскрипцију и принципе технике real time PCR. (Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство; Лабораторија за молекуларну биомедицину, Београд). Запослена је на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу од 2013. године и то као сарадник у настави, ужа научна област: Лекови 2 – фармацеутска технологија. Изабрана у звање асистента у оквиру исте катедре 2015. године. У оквиру катедре, асистент је у настави на предметима:

- Лекови 2 – фармацеутска технологија
- Нове методе примене лекова 1
- Нове методе примене лекова 2
- Увод у фармацеутску технологију

Била је један од истраживача на макропројекту "Анализа фактора који доприносе неповољном исходу лечења акутног панкреатитиса", који се спроводи у сарадњи Факултета медицинских наука и Клиничког центра у Крагујевцу. Уписала је специјалистичке студије на Медицинском факултету, Универзитету у Крагујевцу, грана медицине, Фармацеутска технологија, школске 2016/2017 године.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Експресија гена *ABCBI* и гена регулатора апоптозе као фактора резистенцијена хемиотерапију код оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије“

Предмет: Хронична лимфоцитна леукемија (ХЛЛ) је малигно обољење хематопоетског ткива, које се манифестује као клонска експанзија В лимфоцита. ХЛЛ се карактерише изузетно хетерогеним клиничким током и одговором на терапију, у чему генетички профил пацијента има важну улогу. Главну препреку успеху терапији која се користи у лечењу канцера је резистенција на лекове (енг. Multi Drug Resistance, MDR). Резистенција на лекове се различито манифестује код пацијената и генетички је детерминисана. Два главна механизма учествују у резистенцији на лекове који се примењују у лечењу канцера: повишена експресија протеина који су ефлуксне пумпе и не дозвољавају улазак лека у ћелију (пумпна резистенција), и повишена активност антиапоптотског система (апоптотска резистенција).

У овој студији ће се изучавати фармакогенетички маркери укључени у резистенцију на хемиотерапију код пацијената оболелих од ХЛЛ и њихов утицај на терапијски одговор. Анализираће се експресија *ABCBI* гена као значајног протеина

ћелијске мембране који учествује у ефлуксу лекова из ћелија као и утицај две варијанте у *ABCB1* гену (rs1045642 и rs20132582) на његову експресију. Поред тога изучаваће се и експресија *BCL2* и *BAX* гена, која може да укаже на статус апоптотског система у ћелијама пацијената оболелих од ХЛЛ. Ова студија ће допринети знању о значају изабраних фармакогенетичких маркера за одговор на хемиотерапију код пацијената оболелих од ХЛЛ и за индивидуализацију терапије код ових болесника.

Хипотезе: Молекуларни маркери, експресија *ABCB1* гена и полиморфизам две варијанте у *ABCB1* гену (rs1045642 и rs20132582), као и експресија *BCL2* и *BAX* гена, утичу на терапијски одговор и исход лечења код пацијената оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, Мр фармације Ксенија Вучићевић, је објавила рад у целини у часопису категорије М52, у коме је први аутор, чиме је стекао услов за пријаву докторске дисертације.

Vucicevic K, Jakovljevic V, Colovic N, Tosic N, Kostic T, Glumac I, Pavlovic S, Karan-Djurasevic T, Colovic M. Expression of Bcl2 Gene in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients. Serbian Journal of Experimental Clinical Research. 2015, 16(3): 187-191 (**M52**).

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Хронична лимфоцитна леукемија (ХЛЛ) је малигно обољење хематопоетског ткива, које се манифестује као клонска експанзија зрелих $CD5^+ CD19^+ CD23^+ sIgM^{+/-}$ В лимфоцита, што доводи до њихове акумулације у крви, костној сржи и секундарним лимфним органима.

MDR има важну улогу у иницијацији тумора и његовој прогресији кроз повећану пролиферацију и инхибицију апоптозе. Различити механизми дају допринос *MDR*, укључујући повишену експресију протеина који су ефлуксне пумпе и не дозвољавају улазак лека у ћелију (пумпна резистенција) и повишена активност антиапоптотског система (апоптотска резистенција). П-гликопротеин (енг. P-gp; кодиран геном *MDR1/ABCB1*), и други протеини асоцирани са резистенцијом на терапију, припадају суперфамилији протеина који везују *ATP* (енг. ATP-binding cassette, ABC). Ови протеини транспортери (одговорни за пумпну резистенцију) учествују у ефлуксу лекова, као што су антрациклини, доксорубин и флударабин, који се користе у лечењу канцера дојке, оваријума, као и леукемија.

Претходна истраживања су показала повишену експресију *ABCB1* гена у пацијената са акутном леукемијом и хроничним мијелопролиферативним болестима.

Највећу пажњу у изучавању апоптозе у ХЛЛ привукла је Bcl2 фамилија протеина, како због њихове централне улоге у регулацији апоптозе, тако и због чињенице да су у ХЛЛ детектоване генетичке и епигенетичке промене, као и аберантна експресија бројних чланова ове фамилије.

Bcl2 ("B-cell CLL/lymphoma 2") је типичан анти-апоптотски члан Bcl2 фамилије. Експримира се у многим типовима ћелија, укључујући Б и Т лимфоците. Bcl2 је кодиран геном који је лоциран на хромозому 18q21.3 и састоји се од 3 егзона. Леукемични Б лимфоцити већине ХЛЛ пацијената (преко 80%) експримирају висок ниво Bcl2.

Bax ("Bcl2-associated X protein") је типичан про-апоптотски члан Bcl2 фамилије. Експримира се у многим типовима ћелија, укључујући Б и Т лимфоците. Bax је кодиран геном који је лоциран на хромозому 19q13.3-q13.4 и састоји се од 6 егзона. Као и у случају *Bcl2*, експресија *Bax* није показала конзистентну асоцијацију са клиничким карактеристикама ХЛЛ. У неким студијама је детектована асоцијација повишеног нивоа *Bax* са индолентним током болести или одговором на хемотерапију.

2.5. Значај и циљ истраживања

Циљ ове студије је да анализира утицај фармакогенетичких маркера укључених у резистенцију на хемиотерапију (експресија *ABCB1* гена и полиморфизам две варијанте у *ABCB1* гену (rs1045642 и rs20132582), као и експресија *BCL2* и *BAX* гена) на терапијски одговор код пацијената оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије.

Ова студија ће допринети знању о значају изабраних фармакогенетичких маркера за одговор на хемиотерапију код пацијената оболелих од ХЛЛ и за индивидуализацију терапије код ових болесника.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Највећа препрека успеху лечења малигних болести је постојање варијанти болести које испољавају резистенцију на хемиотерапију (енг. multidrug resistance, MDR). *MDR* има важну улогу у иницијацији тумора и његовој прогресији кроз повећану пролиферацију и инхибицију апоптозе. Различити механизми дају допринос *MDR*, укључујући повишену експресију протеина који су ефлуксне пумпе и не дозвољавају улазак лека у ћелију (пумпна резистенција) и повишена активност антиапоптотског система (апоптотска резистенција). Р-гликопротеин (енг. P-gp; кодиран геном *MDR1/ABCB1*), и други протеини асоцирани са резистенцијом на терапију, припадају суперфамилији протеина који везују *ATP* (енг. ATP-binding cassette, ABC).

Претходна истраживања су показала повишену експресију *ABCB1* гена у пацијената са акутном леукемијом и хроничним мијелопролиферативним болестима.

Показано је да варијанте (енг. single nucleotide polymorphisms, SNP) у *ABCB1* гену могу да доведу до промене у експресији овог гена, што утиче на модулацију у одговору на лекове и клинички ток хематолошких малигнитета. Повишен Bcl2/Bax однос код ХЛЛ пацијената је детектован у многим студијама, иако је показивао знатну хетерогеност међу пацијентима и преклапање са здравим контролама. Повишен Bcl2/Bax однос је показао асоцијацију са прогресивним током болести и резистенцијом на хемотерапију.

Истраживања су показала да симултано снижавање експресије *BCL2* и *BAX* је рационална стратегија за имплементацију анти-канцер терапије.

Поред тога, досадашња истраживања су сугерисала да постоји повезаност између аберантне експресије *ABCB1* гена и регулације апоптозе преко Bcl2 и Bax протеина. Међутим, механизам који лежи у основи ове повезаности није познат.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

Експериментална студија која обухвата анализу молекуларно-генетичких маркера у мононуклеарним ћелијама периферне крви пацијената оболелих од ХЛЛ и здравих контрола.

2.7.2. Популација која се истражује

Планирано истраживање би обухватило узорке (мононуклеарне ћелије периферне крви) 50 ХЛЛ болесника и 50 здравих испитаника који чине контролну групу. Узорци представљају архивски биолошки материјал из биобанки Лабораторије за молекуларну биомедицину Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду. Биобанке су формиране у току пројеката Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (2007-2016), а коришћење узорака из биобанке у сврху изучавања молекуларних маркера код пацијената оболелих од ХЛЛ је одобрила Етичка комисија Клиничког центра Србије у Београду. Дијагноза је постављана на основу стандардних цитоморфолошких, цитогенетичких и иминофенотипских критеријума.

2.7.3. Узорковање

Биобанка, поред биолошког материјала садржи и базу података у којој се налазе клинички подаци о пацијентима (пол, старост, BINET стадијум, ток болести (прогресивна, стабилна), време од постављања дијагнозе до прве терапије, време удвостручавања броја лимфоцита (LDT), CD38, серумски бета 2 микроглобулин, LDH (лактат дехидрогеназа)).

Како ће се у студији пратити генетички маркери резистенције на лекове, терапија код болесника који не прате мора бити униформна. Стога су у студију укључени само болесници лече би ФЦ протоколом (флударабин + циклофосфамид). Процена одговора на терапију се врши након 6 циклуса хемиотерапије (након 6-7 месеци лечења) и пацијенти

су подељени у групе према одговору на терапију на оне који су постигли комплетну или парцијалну ремисију. Комплетна или парцијална ремисија се утврђује на основу различитих лабораторијских параметара (нивоа хемоглобина, нивоа тромбоцита, нивоа лимфоцита...).

2.7.4. Варијабле

1. Анализа ДНК варијанти у *ABCBI* гену (rs1045642 и rs20132582) биће урађена методом ланчане реакције полимеризације, после које следи анализа методом дигестије рестрикционим ензимима (енг. Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP).

2. Анализа нивоа експресије *ABCBI*, *BCL2* и *BAX* гена методом реверзне транскрипције и ланчане реакције полимеразе у реалном времену на нивоу РНК (цДНК) (енг. Real-Time Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR)

2.7.5. Снага студије и величина узорка

За прорачун укупног узорка коришћен је Т-тест за везани узорак, двоструко. За одређивање величине узорка се користи програм G*Power 3.0.10. За прорачун је узета жељена снага студије од 0,8 (минимум 80%), вероватноћа да ће се направити грешка типа I (алфа=0,05), за двострани тест упарених узорака, обзиром на то да не постоји конкретно студија која се бави целокупним проблемом, узима се препоручена вредност за средњу величину ефекта од 0,5. И добија се да је минимална величина узорка 34 испитаника. Међутим, могућности су биле такве, да је било могуће узрак повећати на 50 испитаника, у циљу побољшања квалитета резултата и експерименталног испитивања, усваја се да коначна бројка испитаника и буде 50.

За поређење резултата експерименталне групе са контролном, с обзиром на могућности, усваја се да ће контролна група имати 10 испитаника.

2.7.6. Статистичка обрада података

За статистичку обраду резултата биће коришћен статистички програм *SPSS for Windows*. Од дескриптивних статистичких параметара користиће се: средња вредност и стандардна грешка ("standard error mean"; SEM), распон вредности променљивих (минимум, максимум) и медијана вредности. За истраживање јачине везе између две непрекидне променљиве користиће се метод Спирманове корелације рангова. За испитивање везе између категоријских променљивих користиће се непараметарски тестови: Хи-квадрат тест независности (χ^2 -тест) и Фишеров егзактни тест. Од статистичких тестова за поређење група користиће се параметарски тест: t--тест и непараметарски тест: Ман-Витнијев тест (Тест суме рангова). Статистичка значајност разлике биће постављена на нивоу од $p < 0.05$.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Добијени резултати ће допринети разумевању улоге молекуларно-генетичких фармакогенетичких маркера (варијанте у *ABCB1* гену (rs1045642 и rs20132582), експресија *ABCB1*, *Bcl2* и *Bax* гена) у одговору на хемиотерапију код пацијената оболелих од ХЛЛ. Ова студија ће расветлити да ли постоји синергистичко дејство генетичких маркера пумпне и апоптотске резистенције на лекове код стандардних протокола лечења ХЛЛ. Знања стечена у овом истраживању би могла бити проверена у проспективним клиничким студијама које би довеле до индивидуализацију терапије код болесника са ХЛЛ.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Знања стечена у овом истраживању би могла бити проверена у проспективним клиничким студијама које би довеле до индивидуализацију терапије код болесника са ХЛЛ.

Одређивањем утицаја нивоа експресије *ABCB1* гена, присуства варијанти у *ABCB1* гену (rs1045642 и rs20132582), нивоа експресије, као и релативног односа *Bcl2* и *Bax*-а, очекује се да наведене промене утичу на одговор на терапију флударабином код пацијената оболелих од ХЛЛ, затим покажу разлику у постизању комплетне и парцијалне ремисије и укажу на разлику стања ових пацијената у случају присуства или одсуства наведених експресија, полиморфизама и односа гена.

3.0 Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације се предлаже проф. др Соња Павловић научни саветник и водећи истраживач у Лабораторији за молекуларну биомедицину у Институту за молекуларну генетику и генетичко инжињерство Универзитета у Београду.

Проф. Др Соња Павловић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и испуњава услове за ментора докторских дисертација у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1 Компетентност ментора

Радови проф. др Соње Павловић који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Kotur N, Stankovic B, Kassela K, Georgitsi M, Vicha A, Leontari I, Dokmanovic L, Janic D, Krstovski N, Klaassen K, Radmilovic M, Stojiljkovic M, Nikcevic G, Simeonidis A, Sivolapenko G, Pavlovic S, Patrinos GP, Zukic B. 6-mercaptopurine influences TPMT gene transcription in a TPMT gene promoter variable number of tandem repeats-dependent manner. *Pharmacogenomics*. 2012; 13(3):283-95.
2. Karan-Djurasevic T, Palibrk V, Kostic T, Spasovski V, Nikcevic G, Srzentic S, Colovic M, Colovic N, Vidovic A, Antic D, Mihaljevic B, Pavlovic S, Tosic N. Mutational status

- and gene repertoire of IGHV-IGHD-IGHJ rearrangements in Serbian patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2012; 12(4): 252-60.
3. Karan-Djurasevic T, Palibrk V, Zukic B, Spasovski V, Glumac I, Colovic M, Colovic N, Jurisic V, Scorilas A, Pavlovic S, Tosic N. Expression of Bcl2L12 in chronic lymphocytic leukemia patients: association with clinical and molecular prognostic markers. *Med Oncol.* 2013; 30(1): 405.
 4. Pavlovic S, Zukic B, Stojiljkovic-Petrovic M. Molecular genetic markers as a basis for personalized medicine. *J Med Biochem.* 2014; 33: 8-21.
 5. Kotur N, Dokmanovic L, Janic D, Stankovic B, Krstovski N, Tosic N, Katsila T, Patrinos GP, Zukic B, Pavlovic S. 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
 6. Vucicevic K, Jakovljevic V, Colovic N, Tosic N, Kostic T, Glumac I, Pavlovic S, Karan-Djurasevic T, Colovic M. Expression of Bcl2 Gene in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients. *Serbian Journal of Experimental Clinical Research.* 2015, 16(3): 187-191
 7. Vucicevic K, Jakovljevic V, Colovic N, Tosic N, Kostic T, Glumac I, Pavlovic S, Karan-Djurasevic T, Colovic M. Association of Bax Expression and Bcl2/Bax Ratio With Clinical And Molecular Prognostic Markers in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Med Biochem.* 2015; 35(2): 150-157.
 8. Ristić S, Radojković M, Kostić T, Spasovski V, Pavlović S, Cemerikić-Martinović V. JAK2V617F Mutation in a Patient with B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia and Prefibrotic Primary Myelofibrosis. *Srp Arh Celok Lek.* 2015 Nov-Dec;143(11-12):739-43.
 9. Mizzi C, Dalabira E, Kumuthini J, Dzimiri N, Balogh I, Başak N, Böhm R, Borg J, Borgiani P, Bozina N, Bruckmueller H, Burzynska B, Carracedo A, Cascorbi I, Deltas C, Dolzan V, Fenech A, Grech G, Kasiulevicius V, Kádaši L, Kučinskas V, Khusnutdinova E, Loukas YL, Macek M Jr, Makukh H, Mathijssen R, Mitropoulos K, Mitropoulou C, Novelli G, Papantoni I, Pavlovic S, Saglio G, Setric J, Stojiljkovic M, Stubbs AP, Squassina A, Torres M, Turnovec M, van Schaik RH, Voskarides K, Wakil SM, Werk A, Del Zompo M, Zukic B, Katsila T, Lee MT, Motsinger-Rief A, McLeod HL, van der Spek PJ, Patrinos GP. A European spectrum of pharmacogenomic biomarkers: Implications for clinical pharmacogenomics. *PLoS One.* 2016 Sep 16;11(9):e0162866. doi: 10.1371/journal.pone.0162866.
 10. Viennas E, Komianou A, Mizzi C, Stojiljkovic M, Mitropoulou C, Muilu J, Vihinen M, Grypioti P, Papadaki S, Pavlidis C, Zukic B, Katsila T, van der Spek PJ, Pavlovic S, Tzimas G, Patrinos GP. Expanded national database collection and data coverage in the FINDbase database worldwide database for clinically relevant genomic variation allele frequencies. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jan 4;45(D1):D846-D853. doi: 10.1093/nar/gkw949.

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Клиничка и експериментална хирургија

5. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Предраг Ђурђевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник;
2. Проф. др Драгана Јанић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Педијатрија, члан;
3. Проф. др Снажана Цупара, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија, члан;

Закључак и предлог комисије

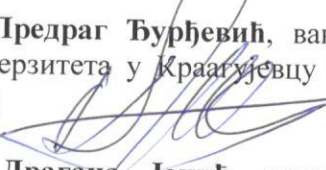
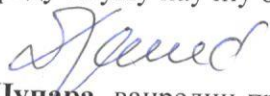
На основу досадашњег научно-истраживачког рада и остварене публикације, мр фармације Ксенија Вучићевић испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.

Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања је прецизно постављен, а научна методологија је јасна и прецизна.

Комисија сматра да ће предложена докторска теза имати значајан научни и практични допринос у намери да се утврде разлике у клиничком току и исходу лечења након стандардне и микродисектомије. Добијени резултати би могли допринети бољем разумевању улоге молекуларно-генетичких фармакогенетичких маркера (варијанте у *ABCB1* гену (rs1045642 и rs20132582), експресија *ABCB1*, *Bcl2* и *Bax* гена) у одговору на хемиотерапију код пацијената оболелих од ХЛЛ. Ова студија ће расветлити да ли постоји синергистичко дејство генетичких маркера пумпне и апоптотске резистенције на лекове код стандардних протокола лечења ХЛЛ. Знања стечена у овом истраживању би могла бити проверена у проспективним клиничким студијама које би довеле до индивидуализацију терапије код болесника са ХЛЛ.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата мр фармације Ксеније Вучићевић под називом „ Експресија гена *ABCB1* и гена регулатора апоптозе као фактора резистенције на хемиотерапију код оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије“, и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. Проф. др **Предраг Бурђевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник;

2. Проф. др **Драгана Јанић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Педијатрија, члан;

3. Проф. др **Снежана Цупара**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија, члан.
