

**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

1. Одлука Наставно-научног већа

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука, број 01-2209/3-6 од 25.11.2015. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације под називом:

„Утицај генског полиморфизма метаболичких ензима CYP3A5, CYP2C8 и CYP1A2, на ефикасност и безбедност терапије карбамазепином код деце“

кандидата др Драгане Драгаш Миловановић, у саставу:

1. **Проф. др Драган Миловановић**, председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија,
2. **Проф. др Слободан Обрадовић**, члан, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Педијатрија,
3. **Проф. др Александар Рашковић**, члан, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Фармакологија и токсикологија.

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Научно-наставном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу следећи

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Кандидат, др Драгана Драгаш Миловановић, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Кратка биографија кандидата

Др Драгана Драгаш Миловановић је рођена 03. марта 1976. године у Београду. Основну школу и Гимназију је завршила у Београду. Медицински факултет Универзитета у Београду уписала је 1995., а завршила марта 2003. године са просечном оценом 8,94. Лекарски стаж је обавила у КБЦ „Земун“, а стручни испит положила 2004. године. Последиломске студије је уписала 2003. на Медицинском факултету у Београду, смер имунологија, а 2009. године прелази са магистарских студија Медицинског факултета у Београду на другу годину академских студија на Медицинском факултету у Крагујевцу, изборно подручје неуронауке.

Од 2003. ради хонорарно у компанији Ergomed Clinical Research Ltd., на пословима координатора у клиничким испитивањима, и волонтира као клинички лекар у КБЦ „Земун“. Од 2005. запослена је у компанији Ергомед д.о.о Нови Сад, на пословима сарадника у клиничким испитивањима (монитор).

У тој компанији од 2008. ради на пословима пројект менаџера у неколико клиничких испитивања. Од 2014. године запослена је на пословима наставника практичне наставе у Високој здравственој школи струковних студија у Београду. Говори, чита и пише енглески језик, пасивно користи немачки језик, користи рачунар у домену апликативног софтвера.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Утицај генског полиморфизма метаболизућих ензима CYP3A5, CYP2C8 и CYP1A2, на ефикасност и безбедност терапије карбамазепином код деце“

Предмет: Испитивање утицаја генских варијација на концентрацију лека у крви и ефикасност и безбедност терапије након постизања равнотежног стања код педијатријских пацијената лечених од епилепсије стандардним дозама карбамазепина, као и дефинисање популационог фармакокинетичког модела клиренса карбамазепина на основу утицаја фармакогенетичких и демографских карактеристика пацијената (узраст, пол и телесна тежина).

Хипотезе:

1. Варијабилност гена *CYP3A5*, *CYP2C8* и *CYP1A2* кодирајућих за ензиме који метаболишу карбамазепин утиче на концентрацију лека у крви, као и на безбедност и ефикасност терапије карбамазепином код педијатријских пацијената.
2. Употреба алгорита дозирања карбамазепина на основу фармакогенетских и демографских карактеристика пацијената може побољшати ефикасност и безбедност терапије.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавио рад *in extenso* у часопису категорије најмање М52 који се објављује на једном од од водећих светских језика, у којем је кандидат први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

1. Dragas Milovanovic D, Radosavljevic I, Radovanovic M, Milovanovic JR, Obradovic S, Jankovic S, Milovanovic D, Djordjevic D. CYP3A5 polymorphism in serbian paediatric epileptic patients on carbamazepine treatment. Serbian Journal of Experimental and Clinical Research 2015; 16 (2): 93-9. М52, 1,5 бодова

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Карбамазепин се скоро у потпуности метаболише у јетри, при чему најзначајнији метаболички путеви укључују оксидацију ензимима групе CYP (енгл. „cytochrome P450“) 3A4, 3A5, 2C8 и 1A2, Од наведених, CYP3A5, CYP2C8 и CYP1A2 су полиморфни, а по утицају на ензимску активност и заступљености у белој популацији посебно се издвајају алели *CYP3A5**3 (g.6986A>G) и *2 (g.27289C>A), *CYP2C8**3 (g.416G>A) и *5 (g.475delA) и *CYP1A2**1F (g.-163C>A) и *1C (-3860G>A). Додатно, ензим CYP1A2 познат је по својој индуцибилности и великој учесталости варијантних алела у нашој популацији.

Због значајних разлика у фармакокинетици и фармакодинамици лекова које одвајају педијатријску од осталих група болесника, раније прихватљива екстраполација података о ефикасности и безбедности лека добијених из клиничких студија на одраслима данас је замењена потребом да се деца схвате као посебна популација и лече у складу са принципима медицине засноване на доказима управо из те популације.

Узевши у обзир наведено, али и чињеницу да је у Србији карбамазепин један од најчешће примењиваних антиепилептика, а педијатријска популација у томе најзаступљенија, претпоставка је да у нашој средини утицај генетике на ефекат карбамазепина код деце оболеле од епилепсије заслужује да буде додатно истражен.

2.5. Значај и циљ истраживања са становишта актуелности у одређеној научној области

Циљеви:

1. Испитивање утицаја варијација гена *CYP3A5*, *CYP2C8* и *CYP1A2* кодирајућих за ензиме који метаболишу карбамазепин на концентрацију лека у крви након постизања равнотежног стања, као и на безбедност и ефикасност терапије, код педијатријских пацијената лечених од епилепсије стандардним дозама карбамазепина.
2. Дефинисање популационог фармакокинетичког модела клиренса карбамазепина на основу утицаја фармакогенетичких и демографских карактеристика пацијената (узраст, пол и телесна тежина).

Значај:

Предложена студија ће имати велики значај за индивидуализацију дозирања карбамазепина код педијатријских пацијената лечених од епилепсије. Испитивање генских варијација ће омогућити поузданије сагледавање њиховог евентуалног утицаја на концентрацију лека у крви и ефикасност и безбедност терапије након постизања равнотежног стања. Ова сазнања ће помоћи да се одреди најоптималнији популациони фармакокинетички модела клиренса карбамазепина у нашој педијатријској популацији. Имајући у виду одсуство сличних података код нас, предложена докторска дисертација ће у свему бити оригинални допринос у овој области фармакотерапије.

2.6 Веза са досадашњим истраживањима

Претходна фармакогенетска истраживања указала су на повезаност између варијација појединих гена и исхода у лечењу епилепсије карбамазепином, али су многа од њих резултирала нејасним или међусобно сасвим супротним закључцима. На пример, студија која је укључила Корејанце оболеле од епилепсије показала је да се у одсуству ензима *CYP3A5* постижу за трећину више концентрације карбамазепина у крви, за разлику од студије спроведене на јапанској популацији, која је показала супротно. Описани опречни закључци највероватније су бар делом последица неодговарајућег дизајна студије, јер клинички значајне резултате могу пружити само студије које истовремено истражују утицај већег броја потенцијалних фактора.

Са друге стране, учесталост варијација појединих гена и/или ефикасност ензима значајно се разликује међу популацијама при чему генетске варијације могу имати различите ефекте на терапију у различитим етничким групама чак и независно од разлика у учесталости.

Поменуте интеретничке разлике најбоље илуструје познати утицај полиморфизма *HLA-B*1502* на развој Стивенс-Џонсоновог синдрома и токсичне епидермалне некролизе у лечењу карбамазепином, који је уочен код становника у Азији, али не и код осталих популација. Јасно је да резултати добијени испитивањем пацијената одређене етничке припадности не морају бити применљиви и на све остале, због чега је неопходно студије проширити и на друге популације. Додатан проблем у ефикасном и безбедном дозирању карбамазепина чини и недостатак студија на педијатријској популацији пацијената. Прилагођавање дозе лека врши се током примене терапије, а за то време пацијент је изложен ризику како од настанка епилептичних напада, тако и од појаве нежељених дејстава лека, који је код деце знатно већи него код одраслих. И поред ових сазнања клиничке студије у педијатријској популацију су веома ретке.

2.7 Методе истраживања

2.7.1 Врста студије

Истраживање ће бити спроведено у виду ретроспективно-проспективне интервентне клиничке студије IV фазе, на Клиници за педијатрију Клиничког центра Крагујевац. Испитаници који добровољно пристану на учешће у студији, и притом задовоље све критеријуме за укључивање и ниједан критеријум за неукључивање, биће укључени у истраживање.

2.7.2 Популација која се истражује

У истраживање ће бити укључено 40 педијатријских пацијената са дијагностикованом епилепсијом и индикованим карбамазепином као терапијом. Регрутовање испитаника ће се обавити на Клиници за педијатрију Клиничког центра „Крагујевац“, а након добијања сагласности Факултета медицинских наука у Крагујевцу и Агенције за лекове и медицинска средства Србије. Трајање студије зависиће од броја доступних пацијената који задовољавају критеријуме за укључивање. Учешће у студији биће добровољно и пацијенти ће бити укључени у студију тек након што бар један од родитеља тј. старатеља (законски заступник детета) и/или потенцијални испитаници (уколико су старији од 7 година) потпишу формулар Информисаног пристанка.

2.7.2 Узорковање

Да би био укључен у студију, потенцијални испитаник ће морати да испуни све следеће критеријуме: 1) старост испитаника до 20 година, 2) дијагностикована је парцијална или генерализована тоничко-клоничка епилепсија, 3) карбамазепин је индикован у терапији и 4) испитаник и његов законски заступник сагласни су са учешћем у студији.

Потенцијални испитаник неће бити укључен у студију уколико задовољи макар један од следећих искључујућих критеријума: 1) присуство познатих контраиндикација за примену карбамазепина, 2) употреба других лекова за које се зна да ступају у интеракције са карбамазепином или сока од грејпфрута, 3) присуство преткоморско-коморског блока, супресије костне сржи или порфирије, 4) дијагноза апсанса или миоклоничке епилепсије, 5) присуство повишеног очног притиска, 6) етничка припадност кинеском или тајландском народу, 7) трудноћа или дојење.

Испитаник који је претходно био укључен у студију ће бити искључен из даљег учешћа у студији уколико задовољи макар један од следећих критеријума: 1) испитаник је доживео озбиљну нежељену реакцију на лек или је његова безбедност на било који други начин угрожена даљим учешћем у студији, 2) испитаник је из било ког разлога одлучио да се повуче из студије, 3) истраживачи су проценили да испитаник треба да буде повучен из студије. Узимање узорак крви за анализе обавиће се у Служби за клиничку фармакологију Клиничког центра „Крагујевац“. Мерење концентрације карбамазепина у серуму биће спроведено методом високо специфичне течне хроматографије (енгл. *high performance liquid chromatography*, HPLC), а генотипизација најзначајнијих варијација гена *CYP3A5*, *CYP2C8* и *CYP1A2* методом ланчаног умножавања ДНК (енгл. *polymerase chain reaction*, PCR). Све наведене анализе обавиће се на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

2.7.3 Варијабле које се мере у студији

У студији ће се као независне варијабле испитивати:

- Варијације *CYP3A5**3 (g.6986A>G) и *2 (g.27289C>A), *CYP2C8**3 (g.416G>A) и *5 (g.475delA) и *CYP1A2**1F (g.-163C>A) и *1C (-3860G>A), и то PCR методом и њеним модификацијама, као што су алел-специфични PCR (енгл. *allele-specific PCR*, AS-PCR) или PCR уз примену рестрикционих ензима (енгл. *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*, PCR-RFLP).
- Демографске карактеристике пацијената (узраст, пол и телесна тежина).

Зависне варијабле које ће се испитивати у студији биће:

- Концентрација карбамазепина у серуму мерена методом HPLC
- Ефикасност лечења процењена детаљном анамнезом о контроли епилептичких напада током трајања студије.

2.7.4 Снага студије и величина узорка

За потребе израчунавања студијског узорка узети су подаци студије која се бавила испитивањем утицаја присуства генетске варијације *CYP3A5**3 на серумску концентрацију карбамазепина у равнотежном стању код корејских пацијената са епилепсијом. Користећи средње вредности и стандардне девијације измерене концентрације карбамазепина код пацијената са функционалним *CYP3A5* ензимом (9.94 ± 3.38 ng/mL) наспрам хомозиготних и хетерозиготних носилаца варијантног нефункционалног алела *CYP3A5**3 (13.07 ± 4.46 ng/mL), уз $\alpha=0,05$ и снагу студије од 0,8 израчуната је потребна величина узорка од око 20 испитаника по групи, односно укупно 40 испитаника.

2.7.5 Статистичка обрада података

За статистичку анализу података користиће се програми Statistica® (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA) и NONMEM® (ICON, Даблин, Ирска). За поређење опсервираних и очекиваних фреквенција алела користиће се χ^2 тест (Hardy-Weinberg равнотежа). За утврђивање утицаја генотипа на серумску концентрацију карбамазепина и клинички одговор на терапију користиће се Student-ов, t-test за независне групе или једносмерна и факторијелна анализа варијансе. У свим тестовима статистичка значајност биће одређена вредношћу $p \leq 0,05$, а 95% границе поверења рачунаће се према модификованој Wald методи. Резултати ће бити приказани табеларно или графички.

2.8 Очекивани резултати докторске дисертације

У терапији епилепсије, дневне дозе лека пацијенту се прилагођавају тек након започете терапије, а за то време пацијент је изложен ризику како од настанка епилептичних напада, тако и од појаве нежељених ефеката лека. Могућност да оптималну дозу карбамазепина унапред одредимо значајно би унапредила ефикасност и безбедност лечења и побољшала квалитет живота пацијента. Овде предложена студија заснива се на претпоставци да реакција детета на примену карбамазепина зависи и од његовог фармакогенетског профила. Уколико се ова хипотеза покаже тачном, једноставна и трајна анализа као што је генотипизирање може омогућити прецизније дозирање лека и допринети побољшању ефикасности и безбедности терапије.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Уколико испитаник тек започиње лечење, карбамазепин ће бити уведен у терапију у препорученој дози која одговара узрасту и телесној тежини пацијента. Испитаницима који су на стабилној дози карбамазепина доза неће бити мењана током ове посете. Месец дана након увођења карбамазепина у терапију (на контролном прегледу), од испитаника ће у Служби за клиничку фармакологију Клиничког центра „Крагујевац“ бити узет узорак крви за рутинске лабораторијске анализе, за мерење концентрације лека у серуму и генотипизацију. Узорци ће се чувати на -20°C до извођења анализа. Други контролни преглед биће заказан за две недеље. На овом прегледу ће се, на основу резултата мерења концентрације карбамазепина у серуму, проценити дозни режим и по потреби прилагодити доза лека. Трећи контролни преглед биће заказан за месец дана, када ће се од испитаника узети нови узорак крви за мерење концентрације лека у серуму а у време непосредно пре узимања следеће дозе карбамазепина. Додатан узорак крви узеће се за рутинску лабораторијску анализу следећих лабораторијских параметара: С-реактивног протеина (CRP), броја еритроцита, хемоглобина, хематокрита, броја леукоцита, броја тромбоцита, глукозе, уреје, креатинина, холестерола, липопротеина велике густине (HDL), липопротеина мале густине (LDL), триглицерида, аспартат аминотрансферазе (AST), аланин аминотрансферазе (ALT), натријума, калијума, калцијума и фосфора), у циљу откривања могућих нежељених ефеката карбамазепина. Од испитаника, односно њихових родитеља (старатеља), биће поново узета и детаљна анамнеза о контроли епилептичких напада, након евентуалног прилагођавања дозе лека. Наредни контролни прегледи биће заказани по потреби. Сви прикупљени подаци ће се користити за анализу тицаја генотипа на серумску концентрацију карбамазепина и клинички одговор на терапију коришћењем одговарајућих статистичких метода.

2.10. Предлог ментора

За ментора се предлаже проф. др Наташа Ђорђевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија.

2.11 Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Неуронауке

2.12 Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Драган Миловановић**, председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија,
2. **Проф. др Слободан Обрадовић**, члан, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Педијатрија,
3. **Проф. др Александар Рашковић**, члан, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Фармакологија и токсикологија.

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

1. На основу досадашег научног рада и публикованих радова др Драгана Драгаш Миловановић испуњава све услове прописане Статутом Факултета медицинских наука, Статутом Универзитета у Крагујевцу и Законом о високом образовању за одобрење теме и израду докторске дисертације;
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Предложена теза је оригинално научно дело где ће се детаљно испитати утицаја генетских варијација на концентрацију лека у крви и ефикасност и безбедност терапије након постизања равнотежног стања код педијатријских болесника лечених од епилепсије стандардним дозама карбамазепина;
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза бити од особитог научног и практичног значаја у циљу прецизније индивидуализације дозирања карбамазепина код педијатријских болесника лечених од епилепсије.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата **др Драгане Драгаш Миловановић** под називом **„Утицај генског полиморфизма метаболишућих ензима CYP3A5, CYP2C8 и CYP1A2, на ефикасност и безбедност терапије карбамазепином код деце“** и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. **Проф. др Драган Миловановић**, председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија

2. **Проф. др Слободан Обрадовић**, члан, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Педијатрија

3. **Проф. др Александар Рашковић**, члан, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Фармакологија и токсикологија.

У Крагујевцу, 18.12.2015.. године