

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ  
КРАГУЈЕВАЦ**

**1. Одлука Изборног већа**

Одлуком Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, број 05-1644/2 од 07.03.2012. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Драгане Драгаш, под називом:

**„Утицај генетског полиморфизма метаболичких ензима CYP3A4, CYP3A5, CYP2C8, CYP1A2, ERH1 и UGT2B7 на ефикасност и безбедност терапије карбамазепином код деце“**

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Драган Миловановић**, председник, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија,
2. **Проф. др Слободан Обрадовић**, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Педијатрија,
3. **Доц. др Наташа Ђорђевић**, члан, доцент Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија,
4. **Доц. др Михајло Јаковљевић**, члан, доцент Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија,
5. **Доц. др Александар Рашковић**, члан, доцент Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Фармакологија и токсикологија (у међувремену изабран у више звање)

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Изборном већу Медицинског факултета у Крагујевцу следећи

**2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације**

Кандидат, др Драгана Драгаш, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Медицинског факултета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

**2.1. Кратка биографија кандидата**

Др Драгана Драгаш 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. Последипломске 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., као координатор у клиничким испитивањима. Од 2005. запослена је у компанији Ергомед д.о.о Нови Сад, као сарадник у клиничким испитивањима (монитор), од 2008. ради као пројект менаџер у неколикоклиничких испитивања, а од 2009. стиче и звање регулаторног менаџера у Ергомеду. 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 генетског полиморфизма метаболичких ензима CYP3A4, CYP3A5, CYP2C8, CYP1A2, EPHX1 и UGT2B7 на ефикасност и безбедност терапије карбамазепином код деце“

**Предмет:** Испитивање утицаја генетских 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 и утврђивање алгоритма дозирања на основу утицаја фармакогенетских и демографских карактеристика пацијената.

### Хипотезе:

1. Варијабилност гена *CYP3A4*, *CYP3A5*, *EPHX1*, *UGT2B7*, *CYP1A2* и *CYP2C8* кодирајућих за ензиме који метаболишу карбамазепин (*CYP3A4*, *CYP3A5*, мЕН, *UGT2B7*, *CYP1A2* и *CYP2C8*) утиче на концентрацију лека у крви, као и безбедност и ефикасност терапије карбамазепином код педијатријских пацијената.
2. Употреба алгоритма дозирања карбамазепина на основу фармакогенетских и демографских карактеристика пацијената може побољшати ефикасност и безбедност терапије.

## 2.3. Подобност кандидата

Кандидат је објавио један рад у целини у часопису са рецензијом, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

1. Dragaš D, Milovanović DR. Istorijat infuzija. PONS Medicinski Časopis 2011; 8(3): 103-105. (0 бодова, није на листи МНО)

## 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Карбамазепин се скоро у потпуности (до 99%) метаболише у јетри, при чему најзначајнији метаболички путеви укључују оксидацију ензимима групе CYP (енгл. „cytochrome P450“) 3A4, 3A5, 2C8 и 1A2, хидроксилацију микрозомалном епоксид-хидролазом (енгл. microsomal epoxide hydrolase, EPHX1) и глукуронидацију ензимом UGT2B7 (енгл. uridine 5'-diphosphate-glycosyltransferase 2B7).

Сви наведени гени су мање или више полиморфни, а по утицају на ензимску активност и заступљености у белој популацији посебно се издвајају алели *CYP3A4\*1B* (g.-392A>G); *CYP3A5\*3* (g.6986A>G) и \*2 (g.27289C>A); *CYP1A2\*1F* (g.-163C>A) и \*1C (-3860G>A); *CYP2C8\*3* (g.416G>A) и \*5 (g.475delA); *EPHX1* варијанта c.416A>G; *UGT2B7\*2* (c.802C>T).

Због значајних разлика у фармакокинезици и фармакодинамици лекова које одвајају педијатријску од осталих група пацијената, раније прихватљива екстраполација података о ефикасности и безбедности лека добијених из клиничких студија на одраслима данас је

заменења потребом да се деца схвате као посебна популација и лече у складу са принципима Медицине засноване на доказима.

Узевши у обзир наведено, али и чињеницу да је у Србији карбамазепин један од најчешће примењиваних антиепилептика, а педијатријска популација у томе најзаступљенија, верујемо 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 *CYP3A4*, *CYP3A5*, *EPHX1*, *UGT2B7*, *CYP1A2* и *CYP2C8* кодирајућих за ензиме који метаболишу карбамазепин на концентрацију лека у крви, те безбедност и ефикасност терапије након постизања равнотежног стања 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 генетских 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. Сви добијени резултати, збирно, ће се користити за утврђивање алгорита дозирања на основу утицаја фармакогенетских и демографских карактеристика пацијената. 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 на повезаност између варијација појединих гена и исхода у лечењу епилепсије карбамазепином, али су многа од њих су резултирала нејасним или међусобно сасвим супротним закључцима. На пример, студија која је укључила Кореанце 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 интернетичке 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 Азијата, 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. Познато је да је ризик од појаве нежељених ефеката медикаментозне терапије код деце и до четири пута већи него код одраслих, али да су, упркос томе, клиничке студије на деци веома ретке.

## 2.7 Методе истраживања

### 2.7.1 Врста студије

Истраживање ће бити спроведено у виду проспективне интервентне клиничке студије IV фазе. На Клиници за педијатрију Клиничког центра Крагујевац потенцијалним испитаницима биће презентоване детаљне информације о студији и понуђено да потпишу формулар Информисаног пристанка. Од испитаника који добровољно пристану на учешће, а притом задовољавају све критеријуме за укључивање у истраживање и ниједан критеријум за неукључивање, биће прикупљени подаци о телесној тежини, узрасту, полу и етничкој припадности.

### 2.7.2 Популација која се истражује

У истраживање ће бити укључено 158 педијатријских пацијената са дијагностикованом епилепсијом и индикованим карбамазепином као терапијом. Регрутовање испитаника ће се обављати на Клиници за педијатрију Клиничког центра Крагујевац, а почеће након добијања сагласности Медицинског факултета 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 сами 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 од 2 до 18 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 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 ће бити искључен из студије 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.

### 2.7.3 Варијабле које се мере у студији

У студији ће се као независне варијабле испитивати:

- Варијације гена *CYP3A4*, *CYP3A5*, *EPHX1*, *UGT2B7*, *CYP1A2* и *CYP2C8* и то *CYP3A4\*1B* (g.-392A>G); *CYP3A5\*3* (g.6986A>G) и \*2 (g.27289C>A); *CYP1A2\*1F* (g.-163C>A) и \*1C (-3860G>A); *CYP2C8\*3* (g.416G>A) и \*5 (g.475delA); *EPHX1* варијанта c.416A>G; *UGT2B7\*2* (c.802C>T), методом ланчаног умножавања ДНК (енгл. polymerase chain reaction, PCR) и њеним модификацијама, као што су алел-специфични PCR (енгл. allele-specific PCR, AS-PCR), PCR уз примену рестрикционих ензима (енгл. polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) или PCR у реалном времену (енгл. real-time polymerase chain reaction, RT-PCR).
- Демографске карактеристике пацијената (узраст, пол и телесна тежина)

Зависне варијабле које ће се испитивати у студији биће:

- Концентрација карбамазепина у серуму мерена методом високо специфичне течне хроматографије (енгл. high performance liquid chromatography, HPLC)
- Ефикасност лечења процењена детаљном анамнезом о контроли епилептичких напада након увођења лека у терапију
- Квалитет живота и нежељена дејства лека утврђени помоћу одговарајућих упитника

#### 2.7.4 Снага студије и величина узорка

За потребе израчунавања студијског узорка узети су подаци недавне студије која се бавила испитивањем утицаја присуства генетске варијације *CYP1A2\*1F* (g.-163C>A) на активност кодираног ензима у српској популацији (15). Користећи средње вредности и стандардне девијације, уз  $\alpha=0,05$  и снагу студије од 0,8 израчуната је потребна величина узорка од 79 испитаника по групи, односно укупно 158 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  $\chi^2$  тест (Hardy-Weinberg равнотежа). За утврђивање утицаја генотипа на серумску концентрацију карбамазепина и клинички одговор на терапију користиће се једносмерна и факторијелна анализа варијансе. У свим тестовима статистичка значајност биће одређена вредношћу  $p<0,05$ , 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

Карбамазепин ће бити уведен у терапију у препорученој дози која одговара узрасту и телесној тежини пацијента. Контролни преглед биће заказан за месец дана. Месец дана након увођења карбамазепина у терапију, од испитаника ће у Служби за клиничку фармакологију Клиничког центра Крагујевац бити узет узорак крви за анализе. Укупно ће бити узето 8 mL крви, од чега 5 mL за редовно мерење концентрације лека у серуму, а 3 mL за генотипизацију. Узорци ће се чувати на -20°C до увођења анализа.

Мерење концентрације карбамазепина у серуму биће спроведено методом високо специфичне течне хроматографије (енгл. high performance liquid chromatography), а генотипизација најзначајнијих варијација гена *CYP3A4*, *CYP3A5*, *EPHX1*, *UGT2B7*, *CYP1A2* и *CYP2C8* методом ланчаног умножавања ДНК (енгл. polymerase chain reaction, PCR) и њеним модификацијама, као што су алел-специфични PCR (енгл. allele-specific PCR, AS-PCR), PCR уз примену рестрикционих ензима (енгл. polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) или PCR у реалном времену (енгл. real-time polymerase chain reaction, RT-PCR). Све наведене анализе обавиће се на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу. Додатан узорак крви узеће се за рутинску лабораторијску анализу (Централна лабораторија Клиничког центра Крагујевац) у циљу откривања могућих нежељених ефеката карбамазепина путем процене основних лабораторијских параметара. Од испитаника односно њихових родитеља (старатеља) биће узета и детаљна анамнеза о контроли епилептичких напада након увођења терапије.

Контролни преглед биће заказан за недељу дана, када ће се, на основу резултата мерења концентрације карбамазепина у серуму, извршити се прилагођавање дозе лека. Следећи контролни преглед биће заказан за месец дана. Месец дана након прилагођавања дозе карбамазепина, а у време непосредно пре узимања следеће дозе, од испитаника ће у Служби за клиничку фармакологију Клиничког центра Крагујевац бити узет нови узорак крви (5 mL) за контролно мерење концентрације лека у серуму. Додатан узорак крви узеће се за рутинску лабораторијску анализу (Централна лабораторија Клиничког центра Крагујевац) у циљу откривања могућих нежељених ефеката карбамазепина путем процене основних лабораторијских параметара.

Од испитаника односно њихових родитеља (старатеља) биће поново узета и детаљна анамнеза о контроли епилептичких напада након прилагођавања дозе лека. Наредни контролни преглед биће заказан по потреби. Прикупљени подаци ће се користити за анализу тицаја генотипа на серумску концентрацију карбамазепина и клинички одговор на терапију коришћењем одговарајућих статистичких метода.

## 2.10. Име ментора

Доц. др Наташа Ђорђевић, члан, доцент Медицинског факултета 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 Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија,
2. **Проф. др Слободан Обрадовић**, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Педијатрија,
3. **Доц. др Наташа Ђорђевић**, члан, доцент Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија,
4. **Доц. др Михајло Јаковљевић**, члан, доцент Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија,
5. **Доц. др Александар Рашковић**, члан, доцент 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 испуњава све услове прописане Статутом Медицинског факултета, 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 испитити утицаја генетских варијација на концентрацију лека у крви и ефикасност и безбедност терапије након постизања равнотежног стања код педијатријских пацијената 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 пацијената лечених од епилепсије;
4. Комисија предлаже Изборном већу Медицинског факултета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата **др Драгане Драгаш** под називом **„Утицај генетског полиморфизма метаболичких ензима CYP3A4, CYP3A5, CYP2C8, CYP1A2, EPHX1 и UGT2B7 на ефикасност и безбедност терапије карбамазепином код деце“** и одобри њену израду.

## ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. **Проф. др Драган Миловановић**, председник, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија,
2. **Проф. др Слободан Обрадовић**, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Педијатрија,
3. **Доц. др Наташа Ђорђевић**, члан, доцент Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија,
4. **Доц. др Михајло Јаковљевић**, члан, доцент Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија,
5. **Доц. др Александар Рашковић**, члан, доцент Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Фармакологија и токсикологија.

У Крагујевцу, 29.03.2012. године