

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 09.07.2018. godine, broj 5940/17, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Uticaj polimorfizama MDR1 gena na metabolizam kalcineurinskih inhibitora i funkciju presađenog bubrega“

kandidata dr Milice Kravljača, zaposlene u Klinici za nefrologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Mentor je prof. dr Radomir Naumović, a komentor prof. dr Vera Pravica.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Višnja Ležaić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Nevena Divac, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Igor Mitić, profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Milice Kravljača napisana je na ukupno 87 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 35 tabela i 19 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je naveden kratak osvrt na razvoj transplantacije bubrega kao najboljeg načina lečenja bolesnika u terminalnoj fazi hronične bolesti bubrega. Napisan je značaj kalcineurinskih inhibitora za transplantaciju bubrega, njihov mehanizam delovanja i farmakokinetičke osobine. Detaljno je opisan proteinski nosač ovih lekova, P-glikoprotein, njegova funkcija i distribucija u tkivima, zatim moguće interakcije kalcineurinskih inhibitora sa drugim lekovima.

Posebna pažnja je posvećena genskim polimorfizmima značajnim za metabolizam kalcineurinskih inhibitora. Opisani su polimorfizmi CYP3A gena, koji kodiraju sintezu najvažnijih enzima za metabolizam kalcineurinskih inhibitora, a zatim i polimorfizmi MDR1 gena odgovornog za sintezu P-glikoproteina. Posljednje poglavlje uvoda posvećeno je farmakodinamici kalcineurinskih inhibitora i njenoj povezanosti za genskim polimorfizmima, sa posebnim osvrtom na akutno odbacivanje i neželjene efekte ovih lekova.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od ispitivanja učestalosti pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama MDR1 gena i njihovih haplotipova, kao i uticaja polimorfizama MDR1 gena na farmakokinetiku kalcineurinskih inhibitora, na učestalost akutnog odbacivanja i odložene funkcije alografta. Zatim je ispitivan uticaj polimorfizama MDR1 gena na funkcija i nastanak insuficijencije alografta, ali i na neke o neželjenih efekata ovih lekova.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o neinterventnom retrospektivnom opservacionom ispitivanju koje je sprovedeno u Klinici za nefrologiju Kliničkog centra Srbije i Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Detaljno su opisani kriterijumi za uključenje u studiju. Svi pacijenti su dali pisani pristanak pre uključjenja u studiju. Opisani su imunosupresivni protokoli i način praćenja koncentracije kalcineurinskih inhibitora u krvi. Definisani su akutno odbacivanje i odložena funkcija alografta. Navedeno je koji su biohemijski parametri funkcije alografta praćeni. Opisan je način izolacije molekula DNK i identifikacije pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama MDR1 gena. Navedene su sve korišćene statističke metode.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 131 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Ispitivanje učestalosti pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama MDR1 gena je pokazalo da su se za sva tri ispitivana polimorfizma (C1236T, G2677T/A, C3435T) heterozigoti javili sa najvećom učestalošću. Učestalosti genotipova za polimorfizme G2677T/A i C3435T bile su u skladu sa očekivanim na osnovu Hardi-Vajnebergovog ekvilibrijuma, dok su učestalosti genotipova C1236T polimorfizma odstupale od očekivanih. Od 10 identifikovanih haplotipova, četiri najučestalija su bila CGC (45,38%), TTT (30,01%), CTT (8,42%) i CGT (7,12%).

Pokazano je da kod bolesnika koji su primali ciklosporin A nije bilo uticaja polimorfizama MDR1 gena na dozu leka, a da polimorfizam G2677T/A ima najznačajniji uticaj na doziranje takrolimusa. Nosiocima TT genotipa su bile potrebne značajno veće doze ovog leka za dostizanje ciljnog nivoa u krvi u odnosu na GG homozigote i heterozigote. To je potvrđeno i nižim odnosom nivoa i doze takrolimusa. Multivarijantna regresiona analiza je pokazala da je G2677T/A polimorfizam jedini nezavisan prediktor doze takrolimusa od dvadesetog dana nakon transplantacije pa do kraja perioda praćenja. „Varijant homozigoti“ su i za polimorfizam C3435T imali najveće dozne zahteve i najmanji skor nivoa i doze u odnosu na CC homozigote i heterozigote. Nosioци CTT/TTT diplotipa, dakle TT homozigoti na poziciji G2677T/A i C3435T, zahtevali su veće doze leka u odnosu na ostale diplotipove i to statistički značajno u ranom posttransplantacionom periodu.

Analiza uticaja polimorfizama MDR1 gena na učestalost akutnog odbacivanja i odložene funkcije alografta pokazala je da nije bilo značajne razlike u učestalosti ove dve komplikacije nakon transplantacije bubrega kod različitih genotipova ni pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama ni diplotipova MDR1 gena.

Polimorfizmi MDR1 gena nisu uticali na funkciju presađenog bubrega kod bolesnika koji su primali takrolimus. S druge strane, pokazan je uticaj polimorfizama na funkciju presađenog bubrega kod bolesnika koji su primali ciklosporin A. Najbolju funkciju, mereno vrednošću kreatinina u serumu među bolesnicima koji su primali CsA, imali su divlji homozigoti za sva tri polimorfizma MDR1 gena.

Bolesnici sa različitim genotipovima i diplotipovima nisu se međusobno razlikovali po vrednostima glukoze, kalijuma, mokraćne kiseline, holesterola kao ni aminotransferaza u serumu. Bolesnici koji su primali takrolimus i bili CC homozigoti za polimorfizam C1236T

imali su više vrednosti triglicerida u odnosu na heterozigote. TT homozigoti za polimorfizam G2677T/A imali su veće koncentracije triglicerida u odnosu na druga dva genotipa, osim u prvom mesecu nakon transplantacije. Ta razlika bila je najizraženija šest meseci nakon transplantacije (GG vs. GT $p = 0,04$). „Varijant homozigoti“ su i za polimorfizam C3435T imali najviše vrednosti triglicerida, izuzev prvog meseca i druge godine posle transplantacije. Cox-ova univarijantna proporcionalna regresiona analiza nije pokazala ni pojedinačne nukleotidne polimorfizme ni diplotipove MDR1 gena, kao ni druge ispitivane faktore rizika (godine, pol, vrstu transplantacije, akutno odbacivanje, odloženu funkciju alografta, posttransplantacioni dijabetes melitus, arterijsku hipertenziju) kao prediktore nastanka insuficijencije alografta. Kada je ispitivan uticaj različitih faktora na nastanak insuficijencije presađenog bubrega kod svih bolesnika, nezavisno od vrste kalcineurinskog inhibitora koji su primali, Kaplan-Majerova kriva je pokazala da je akutno odbacivanje jedini značajan prediktor nastanka insuficijencije alografta ($p = 0,001$), dok uticaj odložene funkcije alografta nije dostigao statističku značajnost ($p = 0,06$).

Analiza duročnog preživljavanja pokazala da je pet godina nakon transplantacije 70% ispitivanih bolesnika imalo normalnu funkciju alografta, a taj procenat je bio oko 40% 20 godina nakon transplantacije.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Tri najznačajnija polimorfizma MDR1 gena za metabolizam kalcineurinskih inhibitora (C1236T, G2677T/A, C3435T) su bili predmet analize ove disertacije, i to su i najčešće ispitivani polimorfizmi MDR1 gena u literaturi. Učestalosti genotipova pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama na prvom mestu zavise od rasne pripadnosti, pa se rezultati dobijeni u ovoj disertaciji vezano za učestalosti polimorfizama MDR1 gena uglavnom nisu značajno razlikovale u odnosu na druge evropske narode, osim za polimorfizam C1236T (Gumus-Akay i sar. 2008.).

Kalcineurinski inhibitori imaju veliku interindividualnu i intraindividualnu varijabilnost, te je bilo vrlo važno ispitati uticaj polimorfizama MDR1 gena na farmakokinetiku ovih lekova. Podaci o uticaju polimorfizama MDR1 gena na doze kalcineurinskih inhibitora u literaturi su različiti. Neke studije su u skladu sa rezultatima ove disertacije i pokazuju da su „varijant homozigotima“ bile potrebne najveće doze takrolimusa da bi dostigli ciljni nivo leka u krvi (Cheung i sar. 2006.). Druge opet pokazuju da su veći dozni zahtevi vezani za „divlje

homozigote“ (Wei-lin i sar. 2006). Međutim, analizom nekih od tih studija uočava se važna razlika u odnosu na ovu disertaciju. Naime, svi ispitanici uključeni u ispitivanje u okviru ove disertacije bili su CYP3A5*3 homozigoti za razliku od pomenutih studija, pa navedene razlike u rezultatima mogu biti posledica uticaja CYP3A5 polimorfizama. Za razliku od većine drugih studija, rezultati ove disertacije nedvosmisleno ukazuju da G2677T/A polimorfizam ima najveći uticaj na metabolizam takrolimusa o odnosu na druga dva polimorfizma MDR1 gena. Prema rezultatima ove disertacije kao i u drugim studijama, najmanji uticaj na doze takrolimusa imao je polimorfizam C1236T (Fredericks i sar. 2006, Anglicheau i sar. 2003.). U isto vreme, rezultati ovog rada nisu pokazali uticaj polimorfizama MDR1 gena na metabolizam ciklosporina, što nije pokazano ni u drugim studijama (Bandur i sar. 2008, Jiang i sar. 2008.).

U literaturi nema podataka o uticaju pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama MDR1 gena na učestalost akutnog odbacivanja presađenog bubrega (Hesselink DA i sar. 2008, Fredericks i sar.2006.), što nije pokazano ni u rezultatima ove disertacije.

Rezultati ove disertacije pokazuju da polimorfizmi MDR1 gena nisu imali uticaj na funkciju alografta kod bolesnika koji su primali takrolimus. Izostanak uticaja na funkciju zabeležen je i u drugim studijama (Hesselink DA i sar. 2008, Glowacki i sar. 2011.). Međutim, funkcija alografata se razlikovala kod nosioca različitih genotipova MDR1 gena koji su primali ciklosporin A. Najbolju funkciju, mereno vrednošću kreatinina u serumu, imali su „divlji homozigoti“. Ovaj rezultat je izuzetno važan jer uticaj polimorfizama MDR1 gena na funkciju presađenog bubrega kod bolesnika koji su primali ciklosporin A nije pokazan u drugim studijama (Bouamar i sar. 2011, Hebert i sar. 2003.).

Kada je analiziran uticaj pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama i haplotipova MDR1 gena na nastanak insuficijencije alografta, Cox-ova univarijantna proporcionalna regresiona analiza nije pokazala ove faktore kao prediktore nastanka insuficijencije alografta. Ni grupa nemačkih autora, koja je ispitivala uticaj polimorfizma G2677T/A na funkciju bubrega kod bolesnika sa presađenim srcem, a koji su primali kalcineurinske inhibitore, ne nalazi povezanost genotipa ovog polimorfizma sa nastankom insuficijencije bubrega (Klauke i sar. 2008.).

Dobro je poznato da akutno odbacivanje predstavlja faktor rizika za nastanak insuficijencije alografta i pogoršava njegovo dugoročno preživljavanje. Rezultati ovog ispitivanja nisu pokazali da akutno odbacivanje predstavlja faktor rizika za nastank insuficijencije alografta ni kod bolesnika koji su primali takrolimus kao ni kod onih koji su primali ciklosporin.

Međutim, kada je uticaj akutnog odbacivanja na nastanak insuficijencije alografta analiziran kod svih bolesnika bez obzira na kalcineurinski inhibitor koji su dobijali, rezultati ove disertacije su potvrdili značaj akutnog odbacivanje za nastanak isuficijencije alografta. Naime, Kaplan–Majerova kriva pokazala je značajnu razliku u broju bolesnika i vremenu nastanka insuficijencije alografta kod onih koji su imali akutno odbacivanje u odnosu na one koji ga nisu imali, što je u skladu sa podacima u mnogim drugim radovima (de Fijter i sar. 2010, Koo i sar. 200, Mengel i sar. 2007.).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Kravljaca M, Perovic V, Pravica V, Brkovic V, Milinkovic M, Lausevic M, Naumovic R. The importance of MDR1 gene polymorphisms for tacrolimus dosage. Eur J Pharm Sci. 2016; 83:109-122.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Uticaj polimorfizama MDR1 gena na metabolizam kalcineurinskih inhibitora i funkciju presađenog bubrega“ dr Milice Kravljaca, predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uticaja polimorfizama MDR1 gena na farmakokinetiku kalcineurinskih inhibitora i funkciju presađenog bubrega. Rezultati ove disertacije su prvi podaci o učestalosti sve tri polimorfizma MDR1 gena značajna za metabolizam kalcineurinskih inhibitora kod bolesnika sa presađenim bubregom u Srbiji, što je osnov za poređenje sličnih analiza sprovedenih u zemljama sa stanovništvom druge etničke i rasne pripadnosti. Poseban značaj ima činjenica da je ovo jedna od retkih analiza koja je ispitivala uticaj polimorfizma MDR1 gena u populaciji CYP3A5*3 homozigota.

Imajući u vidu činjenicu da kalcineurinski inhibitori predstavljaju osnov imunosupresivne terapije nakon transplantacije bubrega i da uspeh transplantacije u velikoj meri zavisi od balansa između optimalnog imunosupresivnog efekta i minimalne toksičnosti ovih lekova, vrlo je važno poznavati sve faktore koji utiču na njihovo doziranje. U rezultatima ove disertacije je pokazano da G2677T/A polimorfizam MDR1 gena primaoca bubrega ima najveći uticaj na farmakokinetiku takrolimusa i da predstavlja jedini nezavisni prediktor doziranja ovog leka. Posebno treba istaći da, iako nije pokazan uticaj polimorfizama MDR1 gena na doziranje ciklosporina, rezultati ove disertacije pokazuju da su polimorfizmi MDR1 gena uticali na funkciju presađenog bubrega kod bolesnika koji su primali ciklosporin, što indirektno ukazuje na direktan uticaj genskih polimorfizama na farmakodinamiku ovog leka.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Milice Kravljača i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 12.12.2018.

Članovi Komisije:

Prof. dr Višnja Ležaić

Prof. dr Nevena Divac

Prof. dr Igor Mitić

Mentor:

Prof. dr Radomir Naumović

Komentor:

Prof. dr Vera Pravica
